

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



IL-6'NİN ADAMTS-8 GEN İFADESİ ÜZERİNE ETKİSİNİN
BELİRLENMESİ

NURİYE KÖTÜZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Jüri Üyeleri :

Prof. Dr. Feray KÖÇKAR..... (Tez Danışmanı)

Dr. Öğr.Üyesi Meltem ALPER.....(Eş Danışman)

Prof. Dr. Rahşan İLİKÇİ SAĞKAN

Doç. Dr. Sümeyye AYDOĞAN TÜRKOĞLU

BALIKESİR, OCAK-2022

ETİK BEYAN

Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak tarafımda hazırlanan “**IL-6’NIN ADAMTS-8 GEN İFADESİ ÜZERİNE ETKİSİNİN BELİRLENMESİ**” başlıklı tezde;

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

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

NURİYE KÖTÜZ

(imza)

ÖZET

IL-6'NIN ADAMTS-8 GEN İFADESİ ÜZERİNE ETKİSİNİN BELİRLENMESİ
YÜKSEK LİSANS TEZİ
NURİYE KÖTÜZ
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI
(TEZ DANIŞMANI: PROF.DR.FERAY KÖÇKAR)
(EŞ DANIŞMAN: DR.ÖĞR.ÜYESİ MELTEM ALPER)
BALIKESİR, OCAK - 2022

Kolorektal kanser dünya çapında en sık görülen kanserlerden biridir. ADAMTS-8 önemli bir anjiyoinhibitör genidir. IL-6 sitokinin kolorektal kanser ile ilişkili olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur. Bu tezin amacı, IL-6 sitokinin ADAMTS-8 gen ekspresyonu üzerindeki etkisini belirlemektir. MTT deneyi, 10 ng/mL, 20 ng/mL ve 40 ng/mL'lik farklı konsantrasyonlarda IL-6'nın HCT-116 proliferasyonu üzerindeki etkisini incelemek için kurulmuştur. IL-6 sitokininin HCT-116 hücre proliferasyonu üzerinde istatistiki olarak önemli bir fark oluşturmadığı belirlenmiştir. IL-6'nın 20 ng/mL konsantrasyonunda ADAMTS-8 gen ekspresyonu üzerindeki etkisi, western blot ve gerçek zamanlı PCR teknikleri kullanılarak protein ve mRNA düzeyinde belirlenmiştir. IL-6 ADAMTS-8 mRNA seviyesinde 1, 3 ve 24. saatlerde istatistiksel olarak anlamlı olarak artış gösterdiği belirlenmiştir. IL-6 sitokini ADAMTS-8 protein seviyesinde artan bir etki oluşturmaktadır. IL-6'nın ADAMTS-8 gen ifadesi üzerinde gösterdiği bu etkinin hangi yoldan gösterdiği ile ilgili yolak inhibisyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. IL-6 farklı yolak inhibitörleri ile uygulandığında MEK inhibitörü ADAMTS-8 mRNA seviyesinin 0.5 kat azaldığı sonucuna varılmıştır. PI3K inhibitörü olarak Worthmannin inhibitörü uygulandığında 2-7 kat, p38 MAP kinaz inhibitörü olarak PD169 inhibitörü uygulandığında, 2-10 kat, JNK inhibitörü olarak SP600125 inhibitörü uygulandığında 2-7 kat artış, NFkB inhibitörü uygulandığında 20-30 kat artışı ADAMTS-8 geninin mRNA düzeyinde belirlenmiştir.

ANAHTAR KELİMELELER: Adamts-8, kolorektal kanser, IL-6, HCT-116

Bilim Kod / Kodları : 20610

Sayfa Sayısı : 53

ABSTRACT

DETERMINATION OF THE EFFECT OF IL-6 ON ADAMTS-8 GENE EXPRESSION

MSC THESIS

NURİYE KÖTÜZ

BALIKESİR UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE

BİOLOGY EDUCATION

(SUPERVISOR: PROF. DR. FERAY KÖÇKAR)

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

BALIKESİR, JANUARY - 2022

Colorectal cancer is one of the most common cancers worldwide. ADAMTS-8 is an important angioinhibitory gene. There are studies showing that IL-6 cytokine is associated with colorectal cancer. The aim of this thesis is to determine the effect of IL-6 cytokine on ADAMTS-8 gene expression. The MTT assay was set up to examine the effect of IL-6 at different concentrations of 10ng/mL, 20 ng/mL and 40 ng/mL on the proliferation of HCT-116. It was determined that IL-6 cytokine did not make a statistically significant difference on HCT-116 cell proliferation. The effect of IL-6 on ADAMTS-8 gene expression at 20 ng/mL concentration was determined at the protein and mRNA level using western blot and real-time PCR techniques. It was determined that IL-6 ADAMTS-8 mRNA level increased statistically at 1, 3 and 24 hours. The IL-6 cytokine has an increased effect on the ADAMTS-8 protein level. Pathway inhibition studies have been carried out to determine from which pathway IL-6 exerts this effect on ADAMTS-8 gene expression. It was concluded that MEK inhibitör ADAMTS-8 mRNA level decreased 0.5-fold when IL-6 was applied with different pathway inhibitors. 2-7 fold when Worthmannin inhibitor is applied as PI3K inhibitor, when PD169 inhibitor was applied as a p38 MAP kinase inhibitor, 2-10 fold increase was determined when SP600125 inhibitor was applied as JNK inhibitor, 2-7 fold increase when NFKB inhibitor was applied, 20-30 fold increase was determined in the mRNA level of ADAMTS-8 gene.

KEYWORDS: Adamts-8, Colorectal Cancer, IL-6, HCT-116

Science Code / Codes : 20610

Page Number : 53

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
ŞEKİL LİSTESİ	v
TABLO LİSTESİ	vi
SEMBOL LİSTESİ	vii
ÖNSÖZ	ix
1. GİRİŞ	1
1.1 Kanserde ADAMTS Gen Ailesi	4
1.1.1 Kanserde ADAMTS Gen Organizasyonuna Bakış	5
1.1.1.1 Kanserde ADAMTS Geninin Rolü.....	5
1.1.1.2 Kanserde ADAMTS-8 Geninin Yapısı ve Önemi.....	7
1.2 IL-6.....	7
1.2.1 IL-6/STAT3 Yolu	8
1.2.1.1 IL-6'nın Kolorektal Kanserde Tümör Uyarıcı Etkisi	10
1.2.1.2 Kolorektal Kanser Hücre Hattı HCT-116.....	10
2.TEZ AMACI	11
3. Yöntemler	12
3.1Deney Malzemeleri.....	12
3.1.1 Deney Çalışmalarında Kullanılan Solüsyonlar.....	12
3.1.1.1 Deney Çalışmalarında Kullanılan Laboratuvar Cihazları	15
3.2 Yöntem	16
3.2.1 Deney Araçlarının Sterile Edilmesi.....	16
3.2.2 Deneyde yapılan Hücre Düzeyindeki Çalışmalar.....	16
3.2.2.1 Hücre Kültürü Malzeme Sterilizasyonu	16
3.2.2.2 Fosfat Tamponlu Salin (PBS) Hazırlama	17
3.2.2.3 Fetal Sığır Serum(FBS) Hazırlanması.....	17
3.2.2.4 Hücre Kaldırma Solüsyonunun Hazırlanması	17
3.2.2.5 Hücre Büyütme Sahasının Hazırlanması.....	17
3.2.2.6 Hücre Kültürü Çalışmalarında Kullanılan Hücre Hattı	17
3.2.2.7 Hücre Soyunu Açma İşlemi.....	18
3.2.2.8 Hücrenin Büyütülmesi.....	18
3.2.2.9 Hücrelerin Soyunu Devam Ettirme İşlemi	18
3.2.2.10 Tripan Mavisi Boyama Canlı Hücrelerin Belirlenmesi.....	18
3.2.2.11 Hücrelerin Stoklanma İşlemi	19
3.2.2.12 Hücresel Düzeyde Çalışmada Deneylerin Planı	19
3.2.2.13 Deneyde Kullanılacak RNA için İzole Aşamasındaki İşlemler	21
3.2.2.14 Deneyde Kullanılacak RNA'yı Elde Etme İşlemi.....	21
3.2.2.15 Deneyde kullanılacak RNA Miktarı ve Konsantrasyon Ölçümü	21
3.2.2.16 RNA Jel Elektroforezi	21
3.2.2.17 RNA'dan cDNA Sentezleme İşlemi.....	23
3.2.2.18 RNA'dan cDNA Kontrolü için PZR	23
3.2.2.19 Real-Time PZR (qRT-PZR)	24
3.2.2.20 RT-PZR'm Analizi	26
3.3 Deneyde DNA analizi yöntemleri	26

3.3.1 Deneyde DNA Jel Elektroforezi.....	26
3.3.2 Protein Analizi.....	27
3.3.2.1 Protein Ekstraktı Hazırlama İşlemi	27
3.3.2.2 Bradford Yöntemi ile Protein Konsantrasyon Ölçümü	28
3.3.2.3 Western Blot için Jel Hazırlama.....	29
3.3.2.4 Proteinlerin Transfer İşlemi.....	32
3.3.2.5 Proteinlerin Membrana Sabitleme ve İşaretlenmesi işlemi	32
3.3.2.6 Western Blot Görüntüleme Sistemi.....	33
3.3.2.7 Western Blot Analizi	33
3.3.2.8 Proliferasyon analizi için ((3-(4,5-dimethylthiozoly-2)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) testi.....	33
3.3.2.9 Proliferasyon analizi için ((3-(4,5-dimethylthiozoly-2)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) kimyasalının stoktan hazırlanması.....	33
3.3.2.10 İzopropanol çözücü solüsyonunun hazırlanması.....	33
4.BULGULAR	34
4.1. IL-6 farklı konsantrasyonlarda HCT-116 kolon kanseri hücrelerinde proliferasyonu üzerine etkisinin belirlenmesi.....	34
4.2. IL-6 Sitokininin ADAMTS-8 Geni Üzerindeki Etkisi	35
4.2.1. IL-6 sitokininin ADAMTS-8 gen ekspresyonuna etkisinin mRNA düzeyinde belirlenmesi	35
4.2.1.1 IL-6 sitokininin ADAMTS-8 gen ekspresyonuna etkisinin protein düzeyinde belirlenmesi.....	37
4.2.1.2 IL-6 Sitokininin İnhibitörlerinin ADAMTS-8 Geni Üzerindeki Etkisinin mRNA Seviyesinde Belirlenmesi	38
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	41
6.KAYNAKLAR (IEEE).....	43
EKLER	50
EK A : DNA marker	51
EK B: Protein marker	52
ÖZGEÇMİŞ	53

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1.1: Kolorektal kanserin aşamaları	2
Şekil 1.2: DNA metilasyonu, iltihabın kolorektal kansere dönüşümünü düzenler	3
Şekil 1.3: ADAMTS ailesi şeması	4
Şekil 1.4: ADAMTS genlerinin kanser önleyici etkilerinin şematik gösterimi	6
Şekil 1.5: IL-6/JAK/STAT3 sinyal yolu	9
Şekil 1.6: Tez çalışma diyagramı	11
Şekil 1.7: HCT116 hücre hattı(20x).....	18
Şekil 1.8: Thoma Lamı.....	19
Şekil 1.9: IL-6 farklı üç konsantrasyonunun HCT-116 hücre hattı proliferasyonu üzerine etkisi.....	34
Şekil 2.1: RNA jel elektroforez sonucu	35
Şekil 2.2: H β -2 Polimeraz Zincir Reaksiyonu	36
Şekil 2.3: IL-6(20 ng) HCT-116 hücre hattında ADAMTS-8 geni üzerine etkisinin mRNA düzeyinde ifadesi	36
Şekil 2.4: (a)Beta aktin western sonucu. (b)ADAMTS-8 bandı	37
Şekil 2.5: IL-6(20ng) HCT-116 hücre hattında ADAMTS-8 genine protein seviyesinde ifadesi	37
Şekil 2.6: IL-6 inhibitör RNA jel elektroforezi.....	39
Şekil 2.7: IL-6 inhibitörlerinin H β -2 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) sonucu.....	39
Şekil 2.8: IL-6 inhibitörlerinin ADAMTS-8 genine mRNA düzeyinde etkisi.....	40

TABLO LİSTESİ

	<u>Sayfa</u>
Tablo 3.1: Hücre Kültüründe Kullanılan Malzemeler	12
Tablo 3.2: RNA Deneylelerinde Kullanılan Malzemeler	13
Tablo 3.3: cDNA Sentezi Malzemeleri	13
Tablo 3.4: Western Blot Tekniği için Solüsyonlar	14
Tablo 3.5: Laboratuvar cihazları.....	15
Tablo 3.6: RNA jel için ana stok 10X FA tampon çözelti hazırlama.....	22
Tablo 3.7: RNA jel için 1 X FA tank tampon çözelti hazırlama	22
Tablo 3.8: cDNA sentezlenmesi ve sentezleme basamakları	23
Tablo 3.9: cDNA'ların Kontrol İşlemi için PZR kurulması	23
Tablo 4.1: cDNA için HB-2 PZR program şartları	24
Tablo 4.2: Real-Time PZR malzemeleri.....	24
Tablo 4.3: RT-PZR döngü değerleri.....	25
Tablo 4.4: Tez kapsamında kullanılan ekspresyon primerleri.....	25
Tablo 4.5: İnhibisyon Deneyi Son Konsantrasyon	25
Tablo 4.6: DNA jel analizi deney malzemeleri	27
Tablo 4.7: RIPA solüsyonları ve malzemeleri.....	28
Tablo 4.8: Protein konsantrasyon solüsyonu hazırlama	28
Tablo 4.9: Bradford standart eğrisi	29
Tablo 5.1: SDS jel malzemeleri	30
Tablo 5.2: Protein analizi için kullanılan kimyasallar	30
Tablo 5.3: Protein analizi için kullanılan kimyasallar	31

SEMBOL LİSTESİ

ABCG	: ATP bağlayıcı kaset taşıyıcı G
ADAMTS	: A Disintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin motifs
AKT/PKB	: Protein kinaz B
AP-1	: Aktivatör protein-1
APS	: Amonyum persülfat
°C	: Santigrat
CAC	: Kolit ile ilişkili Kolorektal Kanser
CA-IX	: Karbonik anhidraz 9
CIN	: Kromozomal kararsızlık
CIMP	: CpG adası metilatör fenotipi
DEPC	: Dietilpirokarbonat
DNMT1	: DNA metiltransferaz 1
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle Medium
EGFR	: Epidermal büyüme faktörü reseptörü
EGTA	: Etilen glikol tetraasetik asit
ER	: Östrojen reseptörü
ERK	: Hücre dışı sinyalle düzenlenen kinaz
Et-Br	: Etidyum bromür
FBS	: Fetal Sığır Serumumu
Fra-1	: Fos ile ilgili antijen-1
G	: Gram
HONE1	: Cellosaurus hücre hattı
IGFBP2	: İnsülin benzeri büyüme faktörü bağlayıcı protein-2
IEC'ler	: Bağırsak epitel hücreleri
IL-6	: İnterlökin-6
JAK	: Janus Kinaz
KHDAK	: Küçük Hücreli Olmayan Akciğer Kanseri
KRK	: Kolorektal kanser
LMP1	: Gizli zar proteini 1
LncRNA	: Uzun kodlanmayan RNA'lar
MAPK	: Mitojenle aktive olan protein kinaz
Mcl-1	: Miyeloid hücre lösemi-1
MiRNA	: MikroRNA
MSI	: Mikro Uydu Kararsızlığı
MOPS	: (3-(N-morpholino)propanesulfonic acid)
MTT	: (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide)
NcRNA	: Kodlanmayan RNA (ncRNA)
NaAc	: Sodyum Asetat
NF-KB	: Nükleer faktör-kappaB
Ng	: Nanogram
NPE hücreleri	: Nazofaringeal Epitel Hücreleri
PBS	: Fosfat Tamponlu Salin
PIAS	: Aktive STAT'ın protein inhibitörü
PI3K	: Fosfoinositid 3-kinaz
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
SOCS	: Sitokin sinyallemesinin baskılayıcısı
STAT3	: Sinyal Dönüştürücü ve Transkripsiyon 3 Aktivatörü
TBE	: Tris-Borik asit-Edta

TE : Tripsin Edta
TSR : Trombospandin tekrar bölgesi
VEGF : Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü

ÖNSÖZ

Bu tez süreci dünyaca etkilenen büyük pandemi nedeni ile bir miktar zaman kaybı yaşatsa da bu zorlu süreçte hem maddi hem manevi olarak yanımda olan ve ulaşımımı sağlayan babam AHMET KÖTÜZ'e her türlü güçlükte ayağa kalkmamı sağlayan annem SİBEL KÖTÜZ'e ve enerji kaynağım biricik kardeşim BUĞRA KÖTÜZ'e, ve bu zorlu süreçte her daim yanımda yol göstermeye çalışan ve tez deneylerini kısa sürede toparlamamda yardımcı olan danışmanım Prof. Dr. Feray KÖÇKAR'a, hücre büyütürken yaşadığım zorlukta yön değiştirmemde kilit rol oynayan eş danışmanım Dr. Meltem ALPER'e, tez sürecinde oldukça yardımcı olan Doç.Dr.Sümeyye AYDOĞAN TÜRKOĞLU'na ve bu süreçte deneylerin aksamaması için her türlü desteği veren FK. Lab aile ekibine teşekkür ediyorum. Aynı zamanda bu tez deneyi sürecinde birebir yanımda olup her türlü desteği veren yeri gelince bir abla yeri gelince bir hoca olan Dr. Kübra PASPAL EROĞLU'na ve birlikte deney yaptığımız yeri gelince sevinçlerimizi yeri gelince üzüntümüzü paylaştığımız her zaman her anımıza tanık olduğumuz kardeş olsak bu kadar olur diyeceğimiz 3 sene boyunca aynı odayı paylaştığım Dr.Burcu EFE DAŞKAN'a ve bu süreçte her anıma tanık olan bana yeri gelip kanka yeri gelip abi olan doğru yolu göstermeye çalışan aynı odayı paylaştığım Dr.Serhad ONAT'a, tez sürecinde program yükleme maceramda yardımcı olan yine yol gösteren yeri gelince bir abi olan Dr. Mesut ACAR'a, tez sürecinde bana yardımcı ve destek olan yeri gelince bir abla ve yeri gelince hoca olan Dr.Fatma POYRAZ'a, yüksek lisansa başladığımda bana laboratuvarla ilgili nasıl çalışacağıma dair yol gösteren arkadaşım ve aynı zamanda hocam Derya KESKİN'e, laboratuvarla ilgili ihtiyacım olan her türlü malzemeyi sağlayan hem abla hem hoca olan Dr.Esra TOKAY'a ve Dr.Nelin HACIOĞLU'na, tez sürecinde ilgilenen gerek bazı deneysel konularda fikir aldığım abla yeri geldiğinde hoca olan Dr. Derya Okuyan, deney sürecinde cihazlarda yardımcı olmaya çalışan hocam Nadir KAPLAN'a, yine projede yer aldığım can ekip arkadaşlarım Yasemin KELEŞ'e ve Feyza Nur SAV'a tez sürecinde analizlerimde program yüklerken ve zorlu zamanda yardımcı oldukları için, real time yaparken her seferinde hatırlatan Aylin TÜRKOĞLU 'na, yine yüksek lisans arkadaşlarım olan her daim dertleştiğimiz Hatice ERDOĞAN, Selin KOÇ ve deneysel sevinçlerimiz ve üzüntülerimizi paylaştığımız Tünzale YILMAZ'a teşekkür ederim. Yüksek lisans zamanlarında destek olan diğer ekip arkadaşlarım Merve ERCEVAHİR, Ehed AYMAZ ve Kamil TOK'a teşekkür ederim. Deney sürecinde arka planda rahat çalışmamızı sağlayan bildiğim bilmediğim herkese teşekkür ederim. Yüksek lisans sürecinde heyecanıma, mutluluğuma, üzüntüme her anıma ortak olan herkese teşekkür ederim.

Balıkesir, 2022
NURİYE KÖTÜZ

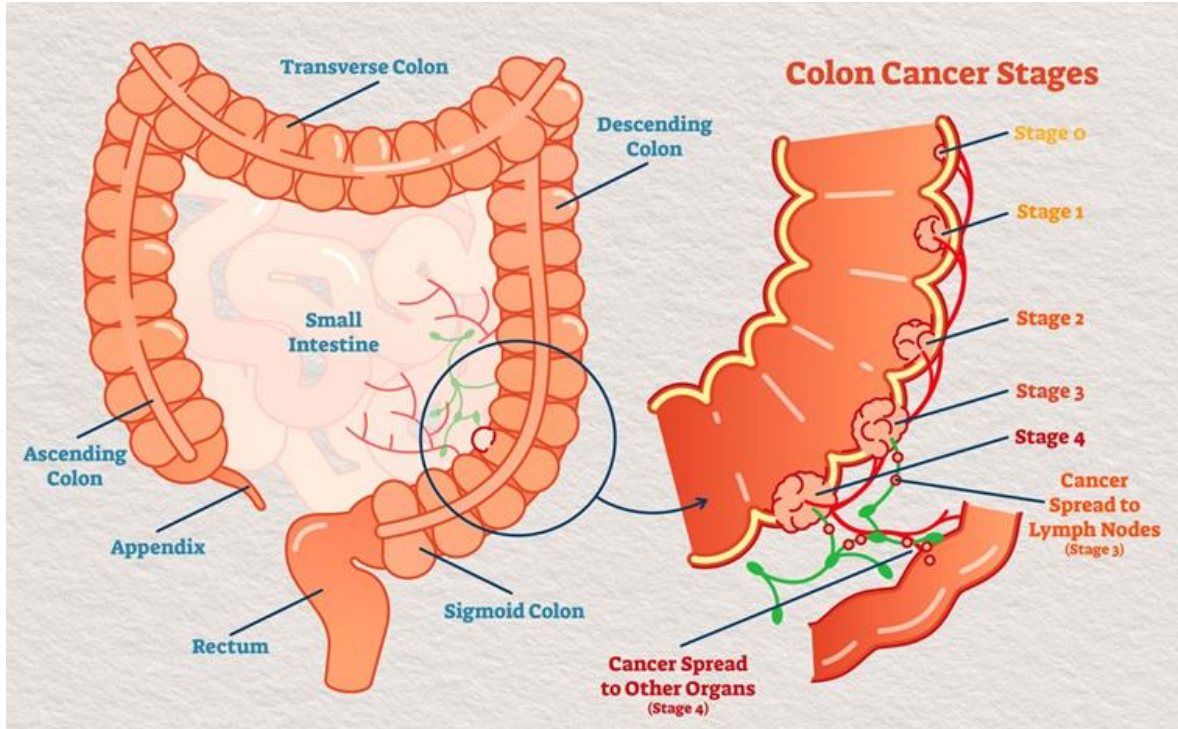
1. GİRİŞ

Kolorektal kanser (KRK), en yaygın üçüncü kanser ve kansere bağlı ölümlerin dördüncü en yaygın nedenidir. Batı ülkelerinde, çoğu KRK vakası insidansı yıldan yıla arttığı tespit edilmektedir. KRK geliştirme riski yaş, kronik hastalık öyküsü, yaşam tarzı gibi kişisel özellikler veya alışkanlıklarla ilişkilidir. Bu bağlamda, bağırsak mikrobiyotasının ilgili bir rolü vardır ve disbiyoz durumları, kronik bir iltihaplanma mekanizması yoluyla kolorektal karsinogenezi indükleyebilir. KRK'ya onkogenleri, tümör baskılayıcı genleri ve DNA onarım mekanizmalarıyla ilgili genleri hedef alan mutasyonlar neden olur. Mutasyonun kaynağına bağlı olarak kolorektal karsinomlar sporadik (%70); kalıtsal (%5) ve ailesel (%25)'dir. Bu duruma yol açan patojenik mekanizmalar, kromozomal kararsızlık (CIN), mikro uydu kararsızlığı (MSI) ve CpG adası metilatör fenotipi (CIMP) olmak üzere üç tipte toplanabilir. Bu KRK tipleri içinde, yaygın mutasyonların, kromozomal değişikliklerin ve translokasyonların önemli hücre içi yolakları etkilediği bildirilmiştir. Gen mutasyonlarına ek olarak, uzun kodlanmayan RNA'lar (lncRNA) veya mikroRNA (miRNA) gibi kodlanmayan RNA (ncRNA)'lardaki değişiklikler de karsinogenez sürecinin farklı adımlarına katkıda bulunabilir ve biyobelirteç olarak kullanıldığında öngörücü bir değere sahip olabilir. Prognozu ve tedavi seçimini iyileştirmek için farklı gen panelleri geliştirilmektedir. Genellikle cerrahi rezeksiyon ardından vasküler endotelyal büyüme faktörüne (VEGF) ve epidermal büyüme reseptörüne (EGFR) karşı monoklonal antikolar ile kombine kemoterapi uygulanmaktadır. Geleneksel kemoterapinin yanı sıra, tedavi etkinliğini artırmak ve yan etkileri azaltmak için alternatif tedaviler (agaroz tümör makroboncukları, anti-inflamatuar ilaçlar, probiyotikler ve altın bazlı ilaçlar gibi) halen araştırılmaktadır [1].

İnsan kanserlerinde en yaygın epigenetik olay olan DNA metilasyonu, tersine çevrilebilirliği nedeniyle potansiyel tedaviler olarak epigenetik tedavilerin geliştirilmesine olan ilgiyi artırmıştır (Şekil 1.1-1.2). Tedavi stratejilerinde büyük ilerlemeler kaydedilmesine rağmen KRK, yüksek morbidite ve mortalite özelliği ile hayatı tehdit eden baskın malignite olmaya devam etmektedir. Anormal şekilde eksprese edilen sitokinler de dahil olmak üzere bağışıklık sisteminin işlev bozukluğunun, KRK patogenezi ve ilerlemesi ile güçlü bir şekilde ilişkili olduğu yaygın olarak kabul edilmiştir [2].

19 üye içeren insan ADAMTS (A Disintegrin ve Metalloproteinase with Trombospondin motifs) ailesi, doku morfogenezinde ve patofizyolojik yeniden şekillenmede, inflamasyonda ve vasküler biyolojide önemli roller oynar [3]. Son yıllarda artan kanıtlar, ADAMTS genlerinin kanser gelişimi ve ilerlemesinde rol oynadığını ve hem destekleyici hem de antagonistik etkilerin belirgin olduğunu göstermektedir [4-8]. Ayrıca, tümör baskılayıcı olarak işlev gören ADAMTS üyelerinin, örneğin KRK'da ADAMTS-5, ADAMTS-9 ve ADAMTS-18 mide, kolorektal ve pankreas kanserlerinde, ADAMTS-12 kolon kanserinde farklı kökenlerden gelen tümörlerde epigenetik susturulduğu tespit edilmiştir [9-13].

ADAMTS-8, kromozom 11q24'te yer alır ve yakın zamanda aday bir tümör baskılayıcı gen olarak tanımlanmıştır. ADAMTS8'in beyin tümörleri, meme tümörleri, küçük hücreli dışı akciğer karsinomu, baş boyun kanseri, mide kanseri, hepatoselüler karsinom ve nazofaringeal azalmış ekspresyonu olduğu ve tümör baskılanması ile ilişkili olduğu rapor edilmiştir [14-20]. ADAMTS-8'in KRK'daki ifadesi ve işlevi hakkında detaylı çalışma bulunmamaktadır.

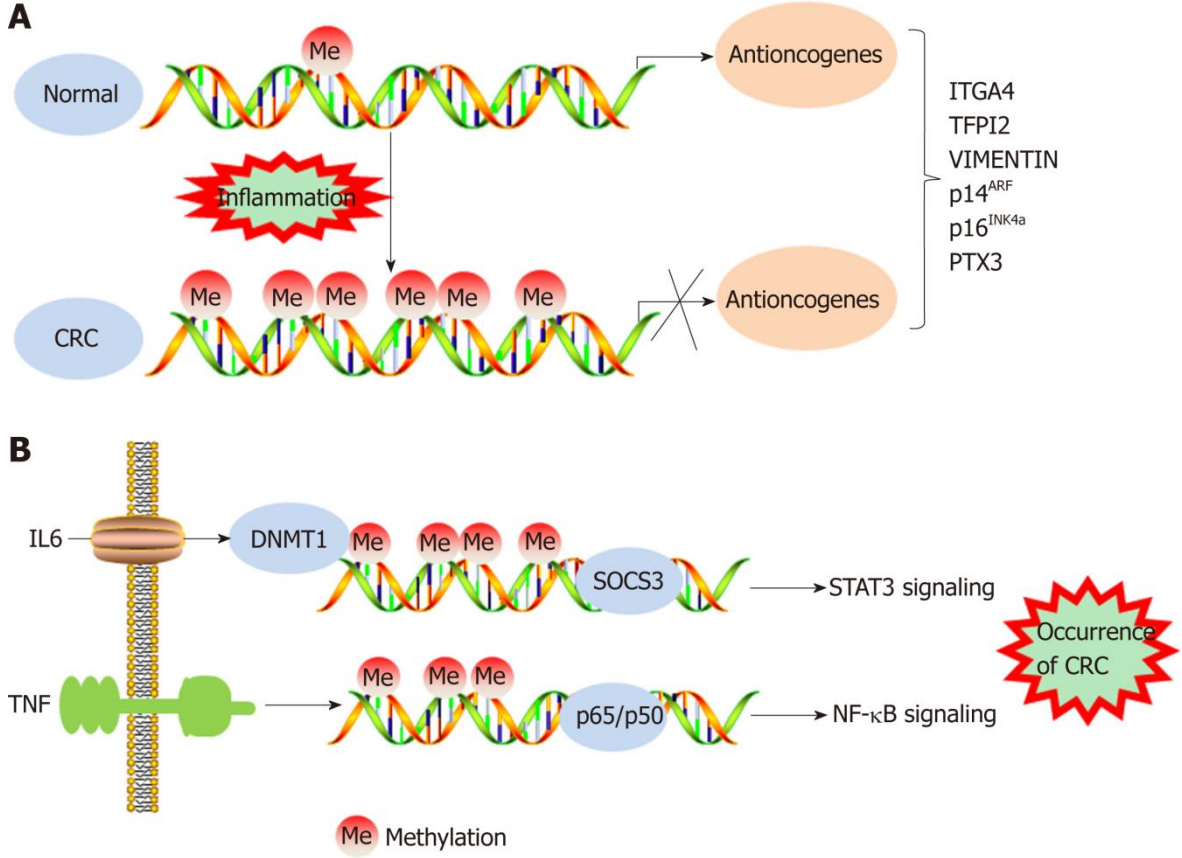


Şekil 1.1:Kolorektal kanserin aşamaları [21].

Kolorektal kanser yayılma seviyelerine göre 4 evrededir. 1.evrede kanser bağırsak duvarına gelmiş ama kolon dışına yayılamamıştır. 2.evrede kanser tüm bağırsak katlarına ulaşmış ama lenf nodlarına yayılım gerçekleşmemiştir. 3.evrede sadece yakın lenf

nodlarına yayılıp diğer organ ya da lenf nodlarına metastaz yapmamıştır. 4.evre daha ileri evre olup artık uzak organlara metastaz yapmıştır (Şekil 1.1).

WNT, MAPK, SMAD, DNA onarımı yollarındaki mutasyonlar tümör aşırı büyümesini indükleyebilir, karsinojenezi başlatabilir.

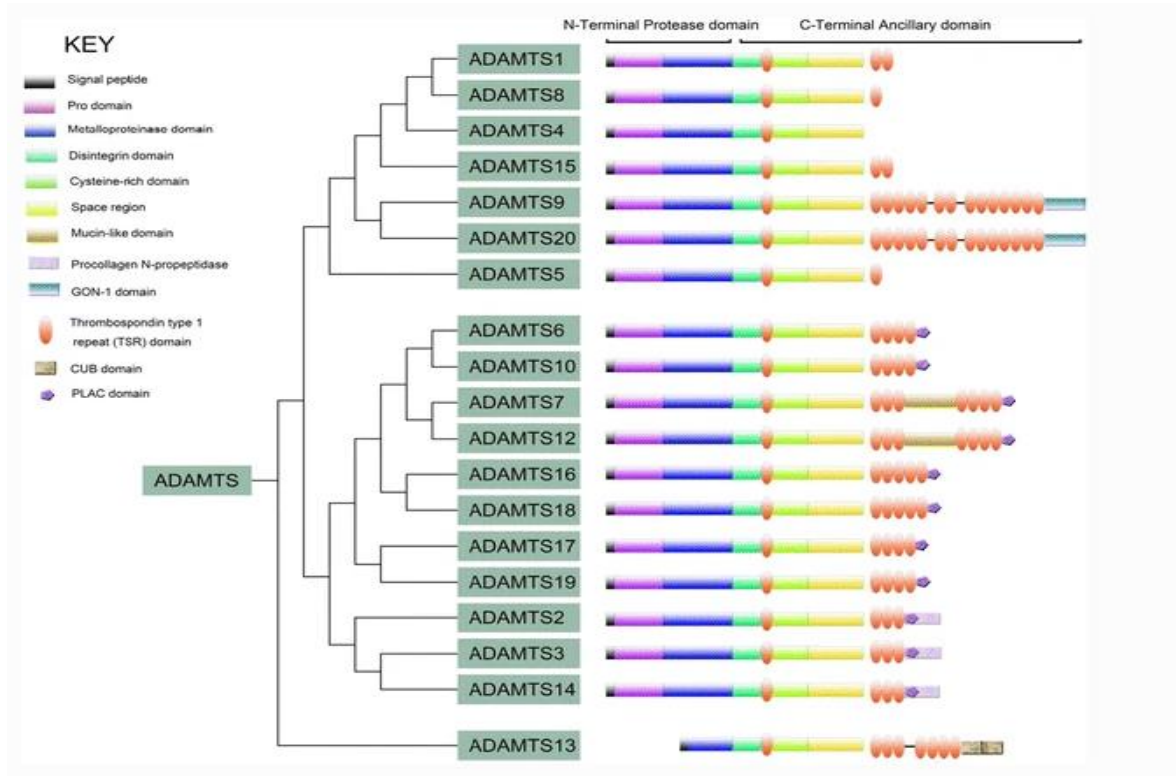


Şekil 1.2: DNA metilasyonu, iltihabın kolorektal kansere dönüşümünü düzenler [22].

A: DNA hipermetilasyon seviyeleri, antionkogenlerin ekspresyonunu inhibe ederek kolorektal kanser (CRC) oluşumuna neden olur; B: İnflamatuvar sitokinler, DNA metilasyonu ile CRC oluşumunu teşvik etmek için STAT3/NF-κB sinyalinin düzenlenmesini sağlar. CRC: Kolorektal kanser; IL-6: İnterlökin-6; DNMT1: DNA metiltransferaz 1; SOCS3: Sitokin sinyalleşmesinin baskılayıcısı 3.

1.1 Kanserde ADAMTS Gen Ailesi

ADAMTS gen ailesi, çeşitli gelişimsel ve homeostatik süreçlerde yer alan 19 salgılanmış metaloproteinaz ailesidir (Şekil 1.3). ADAMTS enzimleri, doku morfogenezinde ve patofizyolojik yeniden modellemede, enflamasyonda ve vasküler biyolojide çeşitli rollere sahiplerdir. ADAMTS'ler substratlarına göre agrekanazlar veya proteoglikanazlar, prokollajen N-propeptidazlar, kıkırdak oligomerik matris protein parçalayan enzimler, von-Willebrand Faktör proteinaz ve bir grup substratı bilinmeyen enzimler olarak 5 sınıfa ayrılır. ADAMTS-8, ADAMTS-1, ADAMTS-5, ADAMTS-4, ADAMTS-15, ADAMTS-9 ve ADAMTS-20 -agrekanaz sınıfına-, ADAMTS-2, ADAMTS-3, ADAMTS-14-prokollajen N-propeptidazlar sınıfına-, ADAMTS-7 ve ADAMTS-12 -kıkırdak oligomerik matris protein parçalayan enzimler sınıfına-, ADAMTS-13 -von-Willebrand Faktör proteinaz sınıfına- ve ADAMTS-6, ADAMTS-10, ADAMTS-16, ADAMTS-17, ADAMTS-18 ve ADAMTS-19 - substratı bilinmeyen enzimler-sınıfına üyedir. Bazı aile üyelerindeki kusurlar, kalıtsal genetik bozukluklara yol açarken, bazılarının anormal ifadesi veya işlevi artrit, kanser ve kardiyovasküler hastalık ile ilişkilidir [23].



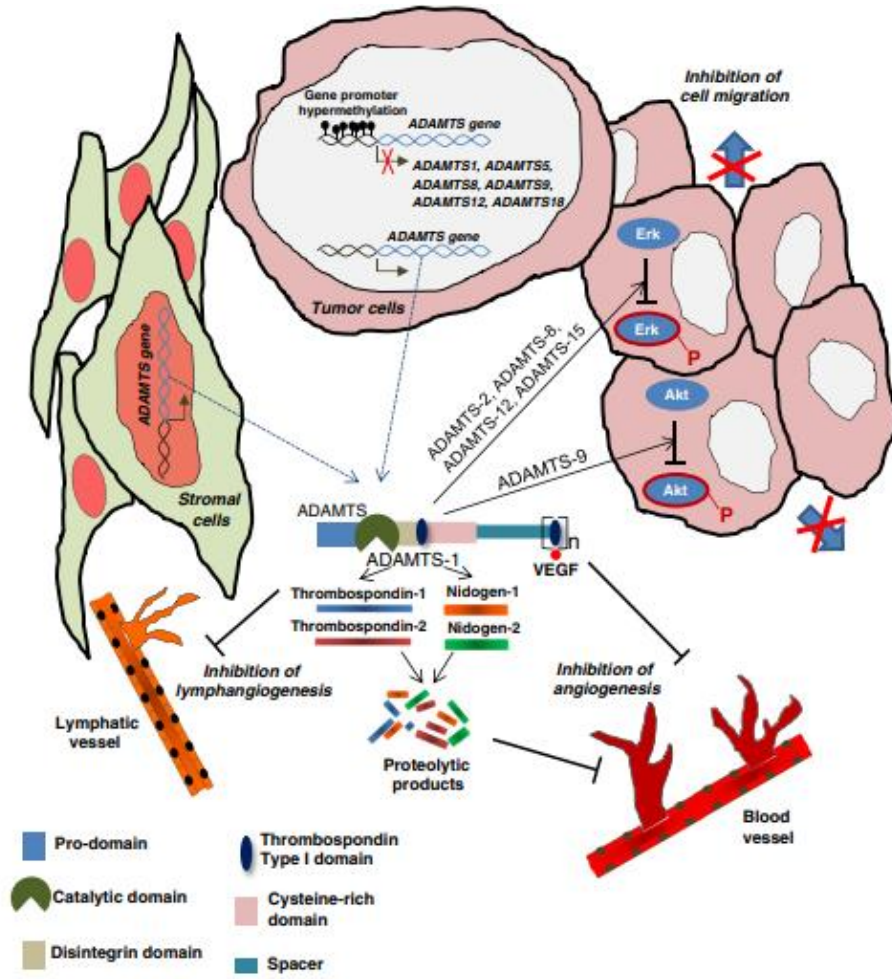
Şekil 1.3: ADAMTS ailesi şeması [24].

1.1.1 Kanserde ADAMTS Gen Organizasyonuna Bakış

1.1.1.1 Kanserde ADAMTS Geninin Rolü

ADAMTS gen yapısı genel olarak proteaz bölge ve yardımcı bölgeden oluşur. Tüm ADAMTS'ler, amino terminalinden aşağıdakileri içeren bir bileşik alan organizasyonuna sahiptir (Şekil 1.3): bir sinyal peptidi ve ardından değişken uzunlukta bir pro-domain; bir metaloproteinaz alanı; parçalayıcı benzeri bir alan; bir merkezi trombospondin tip 1 dizi tekrarı (TSR) motifi sistein açısından zengin bir alan ve ardından bir spacer bölgeden oluşur. N-terminal uç, endoplazmik retikulumdan salgılanmasını sağlayan sinyal peptidi ve proteaz domainini içerirken bu bölge substrat spesifitesini belirlemektedir; C-terminal uçta ise, "ancillary domain", disintegrin domain, trombospondin tekrar bölgesi (TSR), sistein domain gibi yardımcı bölümler yer alarak bu uç enzim lokalizasyonunu belirlemektedir [24, 25].

ADAMTS'ler, hem onkojenik hem de tümör koruyucu işlevlerle ilişkili olan karmaşık hücre dışı proteazlardır. Bu enzimler kanser ve stromal hücreler tarafından salgılanabilir ayrıca çoklu mekanizmalarla tümör mikroçevresini değiştirmeye katkıda bulunabilir. Bu nedenle, ADAMTS'ler çok çeşitli hücre dışı matris bileşenlerini veya düzenleyici faktörleri parçalayabilir ve bunlarla etkileşime girebilir. Bu sayede hücre yapışmasını, göçünü, çoğalmasını ve anjiyogenezi etkiler. ADAMTS'lerin antitümör etkilerine karşı protümör etkileri, hücreden salgılanan substratlarının veya etkileşen ortaklarının doğasına bağlı olabilir. Bununla birlikte, son yıllarda ADAMTS'lerin tümör biyolojisindeki önemli ilerlemelere rağmen, bu proteazların kanser büyümesini güçlendirmek veya tümörün gerilemesini indüklemek ve tümör mikro-ortamını nasıl etkileyebileceğini tam olarak anlamak için daha mekanik ve fonksiyonel çalışmalar gereklidir [26].



Şekil 1.4: ADAMTS genlerinin kanser önleyici etkilerinin şematik gösterimi[26]

Bu etkiler esas olarak ADAMTS-1 için tanımlanmıştır. Anjiyojenik süreçleri inhibe eden veya tümör teşvik edici sinyal yollarını bloke eden antitümör özellikler sergileyebilir. Bu etkiler, katalitik aktiviteye bağlı (trombospondin-1 ve trombospondin-2 ve nidogen-1 ve nidogen-2) gibi hücre dışı bileşenlerin bozulması veya bağımsız (VEGF inhibisyonu) olabilir (Şekil 1.4). Birkaç ADAMTS geni, farklı kökenlerden gelen tümörlerde epigenetik modifikasyon yoluyla susturulur. ADAMTS'lerin yapısal alanları belirtilmiştir [26].

ADAMTS'lerin antitümör etkileri, farklı kökenlerden gelen tümörlerde epigenetik olarak susturulmuş birkaç ADAMTS geninin bulunması gerçeğiyle de anlaşılabilir (Şekil 1.4). ADAMTS-1 pankreas, kolorektal ve akciğer kanserinde; ADAMTS-5 kolorektal kanserde; ADAMTS-8 beyinde; tiroid, akciğer, nazofaringeal, yemek borusu, mide ve kolorektal kanserlerde; ADAMTS-9 özofagus, nazofaringeal, mide, kolorektal ve pankreas kanserlerinde ve ayrıca multipl miyelomda; ADAMTS-12 kolon kanserinde ve ADAMTS-

18 mide, kolorektal, pankreas, özofagus ve nazofaringeal karsinomlarda yüksek oranda promotör metilasyonu gösterir [27-41].

Bununla birlikte, ADAMTS genlerinin tümörlerde sıklıkla mutasyona uğrayıp uğramadığını belirlemek ve ayrıca bu mutasyonların kanser gelişimindeki fonksiyonel etkilerini değerlendirmek için ek çalışmalar gerekli olacaktır.

ADAMTS'ler tarafından düzenlenen moleküler mekanizmalar hakkında daha derin bir bilgi, bu metaloproteazların tümörjenezdeki gerçek etkisinin daha iyi anlaşılmasına katkıda bulunacaktır. Bu süreçlerin açıklığa kavuşturulması, daha spesifik ve az toksik kişiselleştirilmiş antitümör tedavilerinin tanıtılmasına yardımcı olacaktır.

1.1.1.2 Kanserde ADAMTS-8 Geninin Yapısı ve Önemi

ADAMTS-8 (METH2), ADAMTS-1 ile benzerlik yapısını paylaşır ve ADAMTS ailesinin önemli anjiyoinhibitör üyelerinden biri olduğu bulunmuştur. ADAMTS-8'in ADAMTS-1'den farkı C-terminalinde yalnızca bir TSR alanına sahip olmasıdır. ADAMTS-8, insan kromozomunda 11q24.3 yer alır [42]. Genel olarak, bu proteinazların anti-anjiyojenik rolüne TSR'lerin katıldığı düşünülmüştür[43]. ADAMTS-8 meme karsinomu, küçük hücreli olmayan akciğer kanseri (KHDAK) ve beyin kanserleri dahil olmak üzere farklı kanser türünde azalmış ifade göstermektedir [44]. Meme karsinomunda, neoplastik olmayan doku ile karşılaştırıldığında ADAMTS-8 ekspresyonunun azaldığı gösterilmiştir; ayrıca, daha yüksek ADAMTS-8 seviyeleri, daha kötü bir prognozla bağlantılı görünmektedir [45]. ADAMTS8 ile ilişkili hastalıklar arasında Keshan Hastalığı yer alır [46].

1.2 IL-6

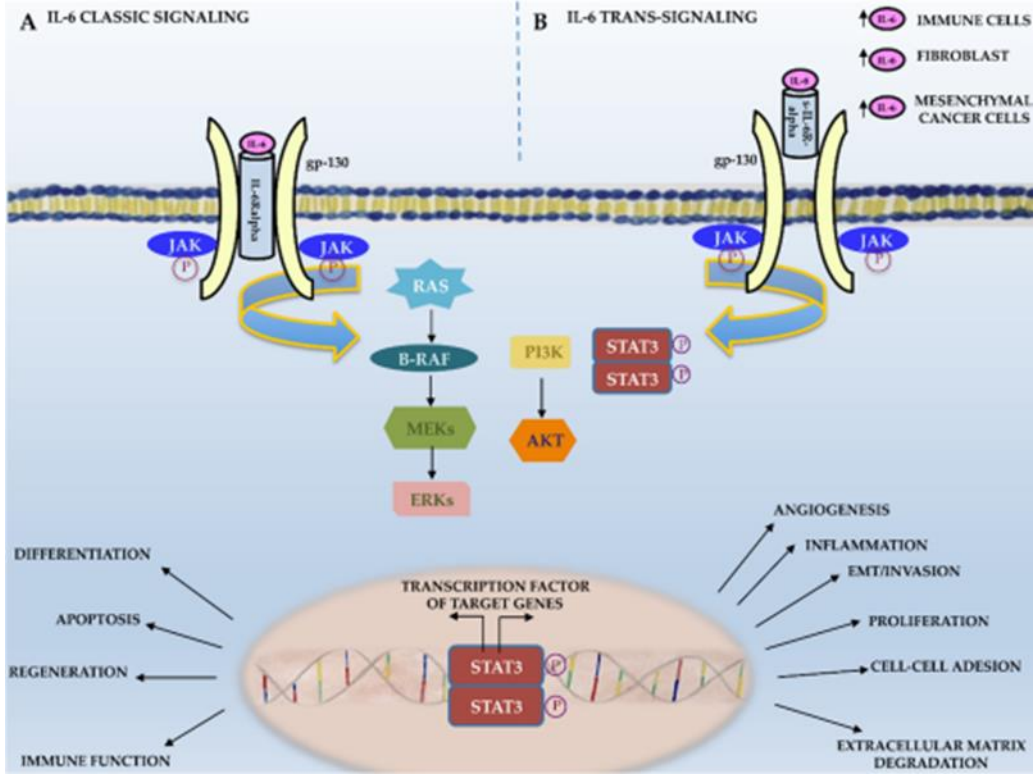
IL-6 ailesi, IL-6, IL-11, IL-27, IL-31, lösemi inhibitör faktör (LIF), onkostatın M (OSM), siliyer nörotrofik faktör (CNTF), kardiyotrofin benzeri sitokin faktör 1 (CLCF) ve kardiyotrofin 1 (CT-1) içerir ve bu ailenin üyeleri yapısal olarak benzerdir [47-48]. IL-6 ailesi, enfeksiyon, kronik enflamasyon, otoimmünite ve kanser gibi çeşitli hastalıklarda ortaya çıkan rolü nedeniyle son zamanlarda geniş ilgi görmüştür. Başlangıçta B-hücre

uyarıcı faktör 2 (BSF-2) olarak adlandırılan IL-6, 1988'de New York Bilimler Akademisi tarafından resmi olarak IL-6 adını almıştır [49].

IL-6, esas olarak makrofajların yanı sıra kemik iliğinden türetilen miyofibroblastlar (BMF'ler), dendritik hücreler, intestinal epitel hücreler ve miyeloid hücreler tarafından üretilir [50-51].

1.2.1 IL-6/STAT3 Yolu

IL-6 immün regülasyon, hematopoez, inflamasyon ve tümör oluşumunda rol oynayan bir pleiotropik sitokindir [51]. IL-6, iki alt birimden oluşan reseptörü ile kompleksler oluşturarak aşağıdaki sinyal yollarını aktive eder. Bu reseptörler moleküler ağırlığı 80 kDa olan bir ligand bağlayıcı protein IL-6R (IL-6Ra veya CD126 olarak da adlandırılır); ve moleküler ağırlığı 130 kDa olan bir sinyal iletici glikoprotein-130 (gp130, IL-6Rb, CD130) içerir [52]. Klasik IL-6 sinyal yolunda, hücre dışı IL-6 ve zara bağlı IL-6R (mIL-6R), gp130'un bağlandığı bir kompleks oluşturmak üzere birleşerek iki IL-6, iki IL-6R ve iki gp130 molekülünden oluşan bir izo-heksamerik kompleks yapını oluşturur. Bu kompleks Janus kinazını (JAK) aktive eder, bu da STAT3'ün dimerize olmasına ve hedef genlerin ekspresyonunu değiştirmek için çekirdeğe yer değiştirmesine neden olur [50]. Klasik yolun ana işlevi, akut faz yanıtı sırasında anti-inflamatuar etkileri indüklemektir [51]. Alternatif olarak, IL-6'nın mIL-6R yerine çözünür IL-6R'ye (sIL-6R) bağlanması dışında klasik yolla aynı olan trans IL-6 sinyali oluşabilir [52]. Çözünür reseptör sIL-6R, mIL-6R'nin sınırlı proteolizi veya IL-6R mRNA'nın alternatif eklenmesiyle üretilir [53]. Trans sinyallemenin ana işlevi, bir inflammatuar yanıtı desteklemektir, dolayısıyla bu yolun KRK gibi kanserlere katkıda bulunduğu görülmektedir (Şekil 1.5) [54-56].



Şekil 1.5: IL-6/JAK/STAT3 sinyal yolu [58].

IL-6 aktivasyonunun iki modu vardır: (A) klasik sinyal yolu: IL-6, hedef hücrelerde IL-6R'ye bağlanır. Daha sonra IL-6 ve IL-6R kompleksi gp130 ile temas eder; (B) sinyal iletim yolu: IL-6 reseptörünün (sIL-6R) çözünür bir türü IL-6'ya bağlanır ve gp130 ile etkileşime girer.

Böylece her ikisi de dimerizasyonu indükler ve sinyalleşmeyi başlatır. IL-6'nın sinyal transdüksiyonu, JAK aktivasyonunu içerir, ardından sinyal transdüserlerinin ve STAT3 aktivatörlerinin transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonuna yol açar. Normalde STAT3 sitoplazmada bulunur. STAT3 fosforile edilir ve daha sonra JAK, EGFR, IL-6 reseptör aktivasyonu gibi yukarı sinyal yollarıyla aktive edildiğinde STAT ailesinin diğer üyeleri ile dimerler oluşturur. Aktive edilmiş STAT3 kompleksi daha sonra konsensüs DNA elemanları ile birleşerek STAT3 hedef genlerinin (siklin D1, Bcl-xL, c-myc, McI1, survivin ve VEGF dahil) transkripsiyonunu başlatarak sitoplazmadan çekirdeğe yer değiştirir. STAT3, kanser hücresi proliferasyonu, farklılaşması, istilası, iltihaplanması ve bağışıklık fonksiyonunda yer alan onkojenik bir transkripsiyonel faktör olarak kabul edilir. STAT aktivasyonunun aralığını ve süresini birçok faktör etkileyebilir.

1.2.1.2 IL-6'nın Kolorektal Kanserde Tümör Uyarıcı Etkisi

Araştırmalar, IL-6'nın gp130 ile birleştirildiğinde KRK'nın ilerlemesini başlıca üç sinyal yolunda, Shp2-Ras-ERK, JAK1/2-STAT3 ve PI3K-Akt-mTOR'da düzenlediğini göstermektedir. Bu yolların çoğunda ortak olan faktör, STAT3'tür [57]. Yakın tarihli bir çalışma, IL-6 tarafından aktive edilen STAT3'ün fibroblast aktivasyonunda kritik bir rol oynadığını da kanıtlamıştır [58]. Treatise on Febril Disease'de yayınlanan geleneksel bir Çin tıbbi olan Wu Mei Wan (WMW) üzerine yapılan son bir çalışmada, NF-κB/IL6-STAT3 sinyal yolu önemli bir rol oynamaktadır. AOM/DSS (Azoksimetan (AOM)/Dekstran sodyum sülfat (DSS)) ile indüklenen CAC (Kolit ile ilişkili Kolorektal Kanser) fare modelinde, 10 Çin bitkisinden olan bir karışım olan WMW(Wu Mei Wan), büyük bir iyileştirici etki gösterdiği bulunmuştur. Bu çalışmada, WMW'nin tümör baskılama mekanizması araştırılırken NF-κB/IL-6/STAT3 yoluna büyük ölçüde odaklanılmıştır [59].

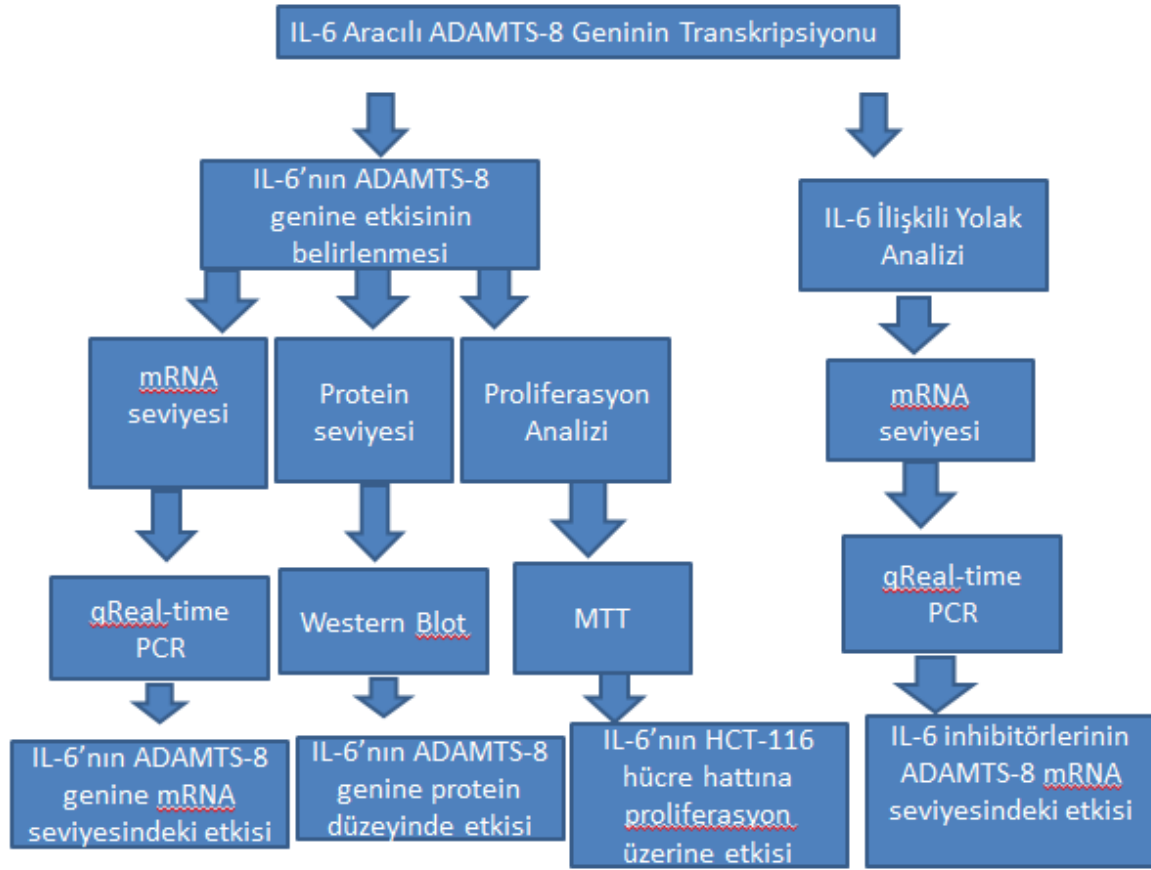
KRK'nın ilerlemesinde, tümörün her aşamasının düzenlenmesi bu moleküler yollar aracılığıyla gerçekleştirilebilir. Örneğin, bir çalışma NF-κB-IL6-STAT3 yolunun KRK'yı desteklediğini kanıtlamıştır [60]. IL-6/STAT3/ERK sinyal yolunun aktivasyonu, KRK'nın anjiyogenezini, göçünü ve çoğalmasını kolaylaştırır. IL-6, JAK2/STAT3 yolunu aktive ederek, β-katenin/Wnt sinyal yolu yoluyla KRK hücrelerinde EMT'yi indükler [61]. IL-6R/STAT3/MIR34A geri besleme döngüsü, KRK hücrelerinin EMT ve metastazı için gereklidir [62]. STAT3 yolu aracılığıyla, eksojen IL-6, KRK hücrelerinin metastazı için uygun bir mikroçevre oluşturmak için tümör kaynaklı IL-6'nın salgılanmasını indükler [63]. Başka bir çalışma, IL-6'nın müsin salgılanmasını kontrol ederek yukarıda açıklanan ortama katkıda bulunduğunu bulmuştur [64]. Güncel bir çalışmada, IL-6'nın hipoksi altında KRK'nın ilaç direncine dahil olduğu gösterilmiştir [65]. IL-6 ve diğer sitokinler arasındaki ilişki kapsamlı bir şekilde incelenmiştir. Örneğin, IL-6, VEGF ekspresyonu yoluyla KRK'da tümör anjiyogenezini artırır [66].

1.2.1.3 Kolorektal hücre hattı HCT-116

HCT-116 kolon kanser hücre hatlarından biri olup morfolojik olarak epitel özellikle adherent hücre tipine sahiptir [67]. Bu hücre hattı daha çok terapötik araştırma ve ilaç taramalarında kullanılmaktadır [68]. HCT116 hücreleri, KRAS proto-onkojeninin 13. kodonunda mutasyon vardır ve gen tedavisi araştırmaları için uygundur [69].

2.TEZ AMACI

Tezin amacı IL-6'nın ADAMTS-8 gen ifadesi üzerine etkisinin belirlenmesidir. IL-6 sitokini üç farklı konsantrasyonda (10 ng/mL, 20 ng/mL, 40 ng/mL) uygulanarak HCT-116 hücre hattında proliferasyon üzerine etkisine bakılmıştır. IL-6 (20 ng/mL) ADAMTS-8 mRNA düzeyinde etkisine bakmak için ve inhibisyon yolak analizi için 5 farklı inhibitör (MEK, Wortmannin, PD163, SP600125, NFKB) kullanılarak real-time PCR kurulmuştur. IL-6 (20 ng/ mL) ADAMTS-8 gen ifadesi üzerine etkisine protein düzeyinde analiz için western blot tekniği kullanılmıştır.



Şekil 1.6: Tez çalışma diyagramı

3. Yöntemler

3.1 Deney Malzemeleri

3.1.1 Deney Çalışmalarında Kullanılan Solüsyonlar

Tablo 3.1: Hücre Kültüründe Kullanılan Malzemeler

Tripan mavisi solüsyonu, Sigma
FBS-FCS, Gibco
Dimetil sülfoksit (DMSO), Merck (Sigma-Aldrich)
Antibiyotik-Antimiyotik Solüsyon, Gibco
DMEM, Gibco
25-75 cm ² flaskı, Almanya
Filtre (Filtropur) 0.20 µM, Almanya
Sığır Serum Albümini (BSA), Sigma
Steril 15-50 mL Falkon, İsoLab
Tris Base, Sigma
EDTA, Sigma-Aldrich
25 mL Cam Pipet,Almanya
6 kuyulu plaka SPL, Life Sciences
Pastör Pipeti, IsoLab
Ependorf, İsolab
PBS Tableti, VWR Amresco
Human IL-6 Recombinant Protein, Gibco
Sigma Monoclonal Anti b aktin antibody
Santa Cruze m IGK BP HRP

Tablo 3.2: RNA Deneylerinde Kullanılan Malzemeler

DEPC, Sigma
Agaroz Sigma, Prona
2-β Merkaptöetanol, Merck
2 X RNA yükleme boyası, Thermo scientific
İnsülin Enjektörü Bd Micro-Fine
MOPS (3-(N-morpholino)propanesulfonic acid), Sigma
%99 Formaldehit, Sigma
EDTA, Sigma
%37'lik (12.3M) Formaldehit, Fluka
NaAc (Sodium Acetate), Sigma
Sodyum Dodesil Sülfat (SDS), Sigma Aldrich
Etidyum bromür (Et-Br), Fisher BioReagent
Etanol, Merck
GeneJET RNA Pürifikasyon Kit, Thermo scientific

Tablo 3.3:cDNA Sentezi Malzemeleri

Oligo dT, Thermo scientific
Taq DNA Polimeraz (rekombinant), Thermo scientific
dNTPmix solüsyon, NEB
5X Reaksiyon Tamponu, Thermo scientific
MgCl ₂ , Thermo scientific
10X Taq Tamponu K+MgCl ₂ - Thermo scientific
Agaroz Sigma, Prona
RealQ Plus 2X Master karışım, Ampliqon
RiboLock RNaz İnhibitör, Thermo scientific
GeneRuler 1 kb DNA marker, Fermantas
96 kuyulu plaka jelatini, Thermo scientific
6X DNA Yükleme Boyası, Thermo scientific
RevertAid Reverse Transkriptaz Enzimi, Thermo scientific
Beyaz, 96 kuyulu plaka, LightCycler480

Tablo 3.4:Western Blot Tekniği için Solüsyonlar

4x Laemmli Örnek Tamponu (4XLSB), Bio-Rad
Akrilamid Bis-Akrilamid (37.5:1), Sigma
Protein Marker (Rainbow Marker), Thermo scientific
Amonyum Persülfat (APS), Fisher Scientific
PVDF Membran 0.45 µm, Millipore
%90'lık İzopropanol, Merck
2-Beta Merkaptotanol, Merck
TEMED (1,2-bis- (dimetilamino) etan), Bio-Rad
TWEEN® 20, Sigma
SDS (Sodyum dodesil sülfat), Sigma
Pierce™ ECL, Thermo Scientific
2-Beta Merkaptotanol, Sigma
ADAMTS-8 Monoklonal Antikor, Thermo scientific
Yağsız Süt Tozu (non-fat dry Milk), Santa Cruz

3.1.1.1 Deney Çalışmalarında Kullanılan Laboratuvar Cihazları

Tablo 3.5: Laboratuvar cihazları

+4 ° C ve -20° C Buzdolabı Arçelik, Türkiye
-80 ° C dolabı, Wise Cryo
Hücre Kültürü Kabini (Hava filtreli) TelStar BIOII, İspanya
Ultrasonik su banyosu, PlusLab
Mikroskop Nikon, Japonya
Santrifüj Nüve
CO ₂ İnkübatör Nuaire, ABD
Vorteks Velp, Scientifica
Isıtıcı Blok Major Science
Isıtıcı Manyetik Karıştırıcı, Heidolph
Soğutmalı Mikro Santrifüj, Hanil Science
pH metre, Hanna
İnkübatör, Memmert
Elektroforez Kaynakları ,Thermo Scientific
Otoklav HMC, HIRAMAYA
PZR Thermocycler, Thermo
µDrop™ Plate, Thermo Fisher Scientific, Multiskango
Light- Cycler 480 Real-Time PCR, Roche Life Science
UVP Görüntüleme Sistemi, BioSpectrum
Spektrofotometre, Thermo Fisher Scientific, Multiskango
UV Görüntüleme sistemi, Vilber Lourmat
SDS-PAGE Araçları, Bio-Rad
Otomatik Pipet Thermo, Eppendorf, Finnpiette
Hassas terazi, Sartorius
Çalkalayıcı, Thermo Scientific
Buz Makinası Hoshizaki, Japonya
Mikrodalga fırın ,Arçelik

3.2 Yöntem

3.2.1 Deney Araçlarının Sterile Edilmesi

Deneyde kullanılan solüsyonlar, pipet uçları, ependorflar, hücre kültürü kavanozu otoklavda 121°C 1 sa otoklavlanıp 80 °C etüvde kurutulmuştur. Pipet uçları dizilmeden önce kutu içi %70 alkollenerek iyice silinip kurulanmıştır. Gerektiğinde pipet uç kutuları ve ependorf kavanozları içi kirli ise deterjanla yıkanıp iyice temizlenmiştir ve peçeteyle kurulanmıştır. Laboratuvar bençler çalışma öncesi %70 alkollenerek iyice peçeteyle silinmiştir. Her çalışma öncesi temiz önlük giyilip ve steril eldivenle işe girilmiştir. Etiketleme olayına dikkat edilmiştir. Deney öncesi pipetler iyice %70 lik alkolle silinip peçeteyle kurulanmıştır.

3.2.2 Deneyde yapılan Hücre Düzeyindeki Çalışmalar

Laminar flow'da çalışmadan önce 30 dk. UV açılarak ortamın sterilizasyonu sağlanmıştır. Daha sonra laminar flow içi alt ve üst tablolar %70 lik alkolle iyice silinerek peçeteyle kurulanmıştır. Aynı zamanda hücre kültüründeki CO2 inkübatörü ve laminar flow içi önce seyreltilmiş çamaşır suyu ile silinip tüm aparatlarıyla birlikte iyice kurulayıp en son %70 lik alkolle silinip peçeteyle kurulanmıştır. Aynı zamanda deney öncesi hücre kültüründe çalışma yapılırken laminar flowa alınan bütün malzemeler uç kutuları, atık kavanozu, pipetler, ependorf kavanozları, hücre kültüründe kullanılan solüsyonlar ve besiyer şişeleri %70 alkollenip iyice silinerek peçeteyle laminar flowa alınmıştır. Fetal bovine serum laminar flowa alınmadan önce su banyosunda termometre 37°C'ye ayarlanmıştır ve iyice çözüldükten sonra laminar flowa %70 lik alkolle temizlenip kurularak alınmıştır. TE -20 °C'den bir gün önce çıkarılıp +4 °C dolaba koyup çözüldükten sonra aynı şekilde %70 etil alkollenip kurularak içeri alınmıştır. Ayrıca hücre kültürü solüsyonları 0.20 µm filtreden geçirilerek deneye başlanmıştır. Besiyeri hazırlığında penisilin streptomisin antibiyotiği kullanılmıştır. Antibiyotikler -20°C'de olup oda sıcaklığında iyice çözüldükten sonra %70 alkolle silinip iyice kurularak flowa alınmıştır.

Hücre kültüründe protokole göre işlem gerçekleştirilmiştir

3.2.2.1 Hücre Kültürü Malzeme Sterilizasyonu

Hücre düzeyinde çalışmalar için gerekli prosedür uygulanmıştır.

3.2.2.2 Fosfat Tamponlu Salin (PBS) Hazırlama

PBS tablet, kutusundaki bilgiye göre hazırlanmıştır. 500 mL şişeye PBS tablet kutusundaki talimata uygun distile suya konulup iyice çalkalanıp çözünmesi sağlanmıştır. Hücre kültüründe kullanırken 50 mL ependorfa kullanılacağı kadarıyla alikotlama yapılarak kullanılmıştır.

3.2.2.3 Fetal Sığır Serum(FBS) Hazırlanması

FBS ısı ile inaktive olmayan ana stok termometre 56 °C'ye ayarlanıp 1 sa su banyosunda inaktive edilmiştir. 50 mL steril falkona laminar flowda alikot edilmiştir. Ağzı parafilmle kapalı ve etiketlenerek -20 °C'de muhafaza edilmiştir.

3.2.2.4 Hücre Kaldırma Solüsyonunun Hazırlanması

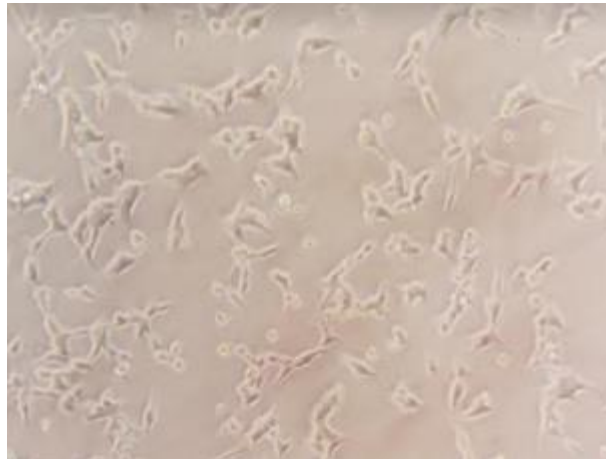
500 mL şişeye PBS solüsyonu distile su ile hazırlanmıştır. Otoklavlandıktan sonra 1.25 g tripsin, 1 g EDTA eklenmiştir. Steril filtrelerden geçirilerek 50 mL'lik falkonlara alikot edilip parafilmle sarıldı ve etiketlenmiştir. -20 °C buzdolabında saklanmıştır.

3.2.2.5 Hücre Büyütme Sahasının Hazırlanması

HCT116 kolon kanseri hücre hattı, Gibco DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) içinde büyütülmüştür. Kullanılacağı zaman steril filtreden geçirilmiştir. +4°C'de parafilmle kapalı ve saklanmıştır.

3.2.2.6 Hücre Kültürü Çalışmalarında Kullanılan Hücre Hattı

HCT116 insan kolon kanseri hücre hattı kullanılmıştır (Şekil 1.7).



Şekil 1.7: HCT116 hücre hattı (20x)

3.2.2.7 Hücre Soyunu Açma İşlemi

-80°C dolaptan çıkarılan hücreler, 37 °C su banyosunda çözündürülmüştür. Çözürülen hücre croviyal tüpten alınıp 15 mL falkondaki besiyeri ile yavaşça pipetajlanıp 1000 rpm'de 5 dk. hücreler santrifüjlenmiştir ve süpernatant dikkatlice dökülmüştür. Pellette medyum kalmamasına dikkat edilmiştir. 25 mL flaska son hacim 5 mL olacak şekilde DMEMle tamamlanmıştır. Flaska hücre soyu adı, açan kişi adı ve pasaj no 0 olarak yazılmıştır ve hücre açılma tarihi etiketlenmiştir. Hücre flaskı dikkatli şekilde sarsmadan inkübatöre kaldırılmıştır.

3.2.2.8 Hücrenin Büyütülmesi

-80 derin dondurucudan alınan hücrenin 37 °C su banyosunda çözürüldükten sonra 15 mL falkon içindeki DMEMle hızlıca buluşturulması ve 1000 rpmde 5 dk. santrifüj edip süpernatantı boşaltıp pelleti 3 mL hacimde çözüp, 75 cm² 'lik flasklarda son hacmi 15 mL DMEM olacak şekilde ya da 25 cm²'lik flasklara son hacmi 5 mL DMEM olacak şekilde inkübatörde büyütülmüştür. Morfolojik özellikleri, doluluk durumlarına bakılmıştır ve besiyerlerinin berraklığı, bulanıklıkları incelenmiştir.

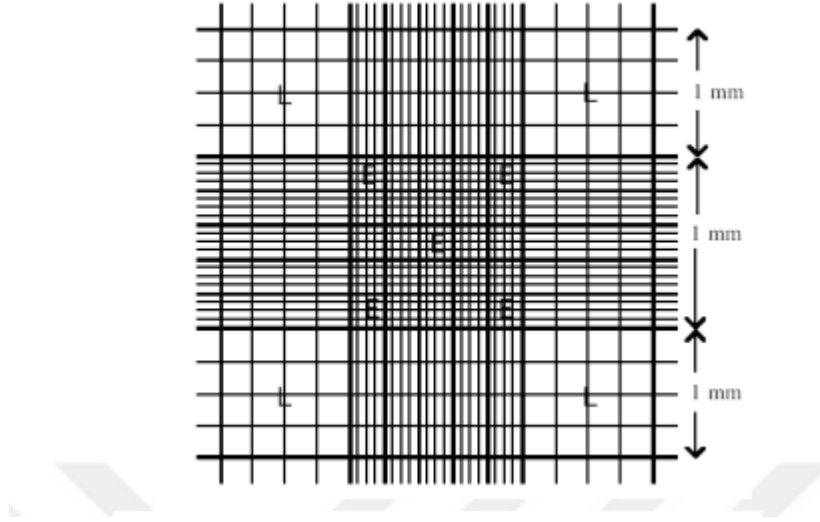
3.2.2.9 Hücrelerin Soyunu Devam Ettirme İşlemi

Hücrelerin flaskta doluluklarına mikroskopta bakılarak kontrol edildikten sonra işleme başlanmıştır. Flasklardaki medyum atık kavanoza değmeden flaskın ağzı dikkatlice dökülmüştür, hangi flaskla çalışılıyorsa o miktarda PBS ile flask iyice yarma hareketi ile yıkanmıştır. Sonra PBS kalıntısı kalmayacak şekilde iyice flasktan atılmıştır iyice ve yine flask hacmine göre TE eklenmiştir ve 4-5 dk. ya da hücrenin tamamen kalktığına emin oluncaya kadar ara ara mikroskopta incelenmiştir ve inkübatöre kaldırılmıştır. Sonra eklenen TE'nin 2 katı kadar DMEM eklenmiştir ve iyice al ver yapılmıştır. Hepsi alınarak 15 mL steril falkona konulmuştur. 1000 rpmde 5 dk. santrifüjlenmiştir. Süpernatant dökülmüştür atık kavanoza değmeden iyice üstten atılmıştır. Pellet 3 mL iyice çözülmüştür ve geri kalan hacim DMEM ile tamamlanmıştır.

3.2.2.10 Tripan Mavisi Boyama Canlı Hücrelerin Belirlenmesi

Canlı hücrelerin sayımı için thoma lamı kullanılmıştır. Pellet alındıktan sonra 10 mL temiz medyumla iyice pipetajlanarak 1 mL steril 1.5 mL ependorfa alınmıştır. Oradan 50 µL iyice pipetajlanarak alınmıştır ve üzerine 50 µL tripan mavisi boyası konulmuştur ve iyice

karışması için pipetajlanmıştır. Buradan 10 µL çekilip thoma lamına konulmuştur mikroskopta şeffaf hücreler sayılmıştır ve hesaplama ona göre yapılmıştır.



Şekil 1.8: Thoma Lamı

1 mL’de sayılan toplamdaki hücre sayısı aşağıdaki yöntem ile bulunmuştur:

$$\text{Formül} = \text{Sayılan canlı hücre sayısı} \times 2 \times 10^4$$

3.2.2.11 Hücrelerin Stoklanma İşlemi

Hücreler %80-90 civarı olduğunda medyum atık kavanozuna değmeden üstten boşaltılmıştır. İlgili flask hacmine göre PBS ile iyice yıkama yapılmıştır ve boşaltılmıştır. Sonra ilgili flask hacmine göre TE eklenmiştir. 3-4 dk. inkübatöre kaldırılmıştır. Ara ara mikroskopta kontrol edilmiştir. Hücre tamamının kalkmasına göre laminar flowda eklenen TE’nin 2 katı DMEM eklenmiştir ve al ver yapıp tüm yüzeyde TE’nin etkisi yok edilmeye çalışılmıştır. Hepsi alındıktan sonra steril 15 mL falkona konulmuştur. 1000 rpm’de 5 dk. santrifüj edilmiştir. Pellet önce 900 µL FBS ile çözdürülüp sonra 100 µL DMSO (Dimetil sülfoksit) ile iyice pipetajlanıp pellet iyice çözülmüştür ve croviyal tüpe konulmuştur. Croviyal tüp kaçınıcı pasajda dondurulduğu, dondurulan tarih, donduran kişi adı etiketlenmiştir. Ağız parafilmelenmiştir ve hızlıca -80 °C dolabındaki stok kutusuna konulmuştur.

3.2.2.12 Hücresel Düzeyde Çalışmada Deneylerin Planı

%80-90 doluluk oranı gözlemlendikten sonra ve hücrelerin sağlıklı olduğuna emin olduktan sonra thoma lamında hücre sayımı işlemi gerçekleştirilmiştir. RNA izolasyonu için 25 cm²’lik ve protein izolasyon deneyi için 6 kuyucuklu plaka kullanılmıştır.

RNA izolasyonu için 6 tane 25cm² lik flask kontrol, 1.sa, 3.sa, 6.sa, 24.sa, ve 48.sa, 20 ng/mL IL-6 uygulaması için 2.000.000 olacak şekilde HCT-116 kolon kanseri hücreleri sayım yapılarak paylaştırılmıştır ve inkübatöre kaldırılmıştır. Ertesi sabah hücrelerin tutunmasına ve kontamine olmama durumlarına göre bütün flasklar %0.1 BSA'lı DMEM'e alınmıştır. Kontrol hariç hepsine aynı anda IL-6 20 ng/mL uygulanmıştır. Belirtilen zaman dilimlerinde pelletler alınmıştır ve -80°C' e etiketlenerek kaldırılmıştır.

Protein izolasyonu için HCT-116 hücreleri 6 kuyulu plakaya her bir kuyu 500.000 hücre olacak şekilde kontrol, 1.sa, 3.sa, 6.sa, 24.sa ve 48.sa IL-6 20 ng/mL olacak şekilde paylaştırılmıştır. İnkübatöre kaldırılıp ertesi gün hücrelerin tutunup tutunmamasına ve olmadığı mikroskopta kontrol edilmiştir. Kontrol hariç diğer saatlere IL-6 20 ng/mL sitokin uygulanmıştır ve inkübatöre kaldırılmıştır. Her saat diliminde hücreler kontrol edildikten sonra 150 µL RİPA ile kazıma yapıp etiketlenip -80°C e kaldırıldı. Aynı gün içinde Bradford ile protein konsantrasyonu ölçüldü ve alikotlama yapıp -80 °C dolaba etiketleyip kaldırıldı.

MTT deneyi için 96 kuyulu plakaya her bir kuyucuk 10.000 hücre olacak şekilde 3 ayrı plakaya 24 sa, 48 sa ve 72 sa olacak şekilde plate out yapılmıştır. Ertesi gün hücrelerin kontamine olup olmadığı kontrol edilip mikroskopta %0.01 BSA'lı DMEM'e alınıp 1 sa inkübatörde beklenmiştir. 1 saat sonra tüm plakalara kontroller 12 tekrarlı, IL-6 sitokini 10 ng/mL, 20 ng/mL ve 40 ng/mL 6 şar kuyu olacak şekilde 3 farklı son konsantrasyon kontroller hariç tutularak uygulanmıştır. Belli saatte hücreler kontrol edilip 24.saat için herbir kuyudan 100 mikrolitre çekilip 10 mikrolitre MTT uygulanmıştır. 4 saat inkübatörde bırakılmıştır. 4 saat sonra bütün medyum atılmıştır ve izopropanol içeren çözücü ile iyice formazan kristalleri çözünmesi için shaker cihazına konulup 30 dk. beklenmiştir ve iyice pipetaj yapılarak kristallerin çözünmesi sağlanmıştır. 550 nm de absorbans alınmıştır.

RNA izolasyonu için 7 tane 25 cm² lik flask kontrol, IL-6 20 ng/mL, tüm inhibitörlerle (MEK inhibitörü, Worthmanin, SP600, PD169 ve NFkB inhibitörü) olacak şekilde her bir flask 2.000.000 olacak şekilde HCT-116 kolon kanseri hücreleri sayım yapılarak paylaştırıldı ve inkübatöre kaldırılmıştır. Ertesi sabah hücrelerin tutunmasına ve kontamine olmama durumlarına göre bütün flasklar %0.1 BSA'lı DMEM'e alınmıştır. Kontrol hariç hepsine aynı anda IL-6 20 ng/mL uygulanmıştır. 45 dk. sonra inhibitörler hesaplanıp

flasklara uygulanmıştır ve 2 saat sonra pellet alma işlemi uygulandı bütün flasklara protokole göre -80 °C de etiketlenerek kaldırılmıştır.

3.2.2.13 Deneyde Kullanılacak RNA için İzole Aşamasındaki İşlemler

Dietil pirokarbonat (DEPC)'lı su 1000 mL saf su içeren şişeye 1000 µL konulup 1 gece 37°C etüvde bırakılıp ertesi gün otoklav yapılmıştır. RNA izolasyonu için bu solüsyon ortamdaki Rnazları inhibe etmeleri yönünden önemlidir ve RNA izolasyonundan önce çalışılan benç, deney malzemeleri ve eldivenler bu solüsyonla muamele edilip iyice kurulanmalıdır.

3.2.2.14 Deneyde Kullanılacak RNA'yı Elde Etme İşlemi

İzolasyon öncesi RNA'lar -80°C'den alınıp buza alınmıştır. Ortam ve deney malzemeleri %70 lik alkolle alkollenmiştir. DEPC ile ortam ve deney malzemeleri muamele edilip iyice kurulanmıştır. RNA pelletleri Thermo Scientific GeneJET RNA Purification Kit protokolü uygulanarak son elüsyon 40 µL ile alınmıştır. Elüsyon aşaması 2 kez al ver yapılarak uygulanmıştır. Elde edilen RNA örnekleri, -80°C'ye kaldırılmıştır.

3.2.2.15 Deneyde kullanılacak RNA Miktarı ve Konsantrasyon Ölçümü

RNA konsantrasyon ölçmede µDrop™ plaka kullanılmıştır. Spektroda 260 nm ve 280 nm de RNA elüsyon konsantrasyonları aşağıdaki formüle göre ölçülmüştür.

RNA konsantrasyon ölçüm formülü = $A_{260} \times \text{sulandırma katsayısı} \times 40 \text{ ng/mL}$, Saflık = A_{260} / A_{280}

3.2.2.16 RNA Jel Elektroforezi

Elde edilen RNA ları kontrol etmek için formaldehit RNA jel elektroforezi yapılmıştır. Deney öncesi malzemeler, jel tankı önce DEPC li su ile sonra % 0.5 SDS ile muamele ve yine DEPC ile iyice durulama yapılmıştır. %70 lik alkolle en son güzelce yıkanmıştır ve iyice peçeteyle tüm aparatlar kurulanmıştır. Labta kullanılan RNA jel için gerekli protokol uygulanarak jel hazırlanmıştır. Örnekler jele yüklendikten sonra 80 V 45 dakika yürütülmüştür ve UV jel görüntüleme sistemi ile görüntülenmiştir.

Tablo 3.6: RNA jel için ana stok 10X FA tampon çözelti hazırlama

10x FA Tampon Çözelti Malzemesi	Stok solüsyon	Son konsantrasyon
EDTA (pH:8) Sodyum asetat (NaAc)	0.5 M	0.05 M
MOPS (pH:7)	1 M	0.01M
Solüsyon % 0.1 DEPC içeren saf su ile hazırlanmıştır ve en son pH:7.0'ye ayarlanmıştır. Otoklav yapıldıktan sonra kullanılmıştır.	1M	0.2M

Tablo 3.7: RNA jel için 1 X FA tank tampon çözelti hazırlama

10 X FA Jel Tamponu	Son konsantrasyon:1 X
%37 'lik (12.3 M) Formaldehit 1000 mL'ye % 0.1 DEPC içeren su ile tamamlanmıştır. Otoklav yapıldıktan sonra kullanılmıştır.	Son konsantrasyon: 0.25 M

3.2.2.17 RNA'dan cDNA Sentezleme İşlemi

Elde edilen RNA'lardan cDNA 2 aşamada gerçekleştirilmiştir. Örnekler -20 °C'ye kaldırılmıştır.

Tablo 3.8: cDNA sentezlenmesi ve sentezleme basamakları

Kullanılan Reaksiyon İçeriği ve Miktarı	Son Konsantrasyon
Kalıp RNA	Ölçülen konsantrasyon 1000 ng RNA olacak şekilde hesaplanmıştır.
dH ₂ O (Enjeksiyonluk dH ₂ O)	X
Oligo (dT)	1 µL
Son hacim	12.5 µL
1.Basamak: İlk reaksiyon için PZR cihazında 65 °C'de 5 dk. inkübe edilmiştir.	
5 X Reaksiyon Tamponu (1 mL)	1 X
dNTP karışım (2,5 mM)	1 mM
RiboLock RNaz İnhibitör (40 U/ µL)	20 U/ µL
RevertAid Reverse Transkriptaz (200 U/ µL)	10 U/ µL
Toplam hacim	20 µL
2.Basamak: 42°C'de 1 saat ve 70°C'de 10 dk. işleme tutuldu.	

3.2.2.18 RNA'dan cDNA Kontrolü için PZR

cDNA'ların çalıştığı HB-2 PZR ile kontrol edildikten sonra ADAMTS-8 ekspresyon primerleri ile real-time PZR kurulmuştur.

Tablo 3.9: cDNA'ların Kontrol İşlemi için PZR kurulması

PZR Solüsyon	Numune	PK	NK
10 X Tampon(+KCl-MgCl ₂)	5 µL	5 µL	5 µL
dNT karışım (2.5 mM each)	1 µL	1 µL	1 µL
Hβ-2 Reverse Primeri (50 pmol/ µL)	1 µL	1 µL	1 µL
Hβ-2 Forward Primeri(50 pmol/ µL)	1 µL	1 µL	1 µL
MgCl ₂ (25 mM)	4 µL	4 µL	4 µL
cDNA kalıbı	1 µL	1 µL	-
dH ₂ O	36.5 µL	36.5 µL	37.5 µL
Taq DNA Polimeraz (rekombinant) (5U/µL)	0.5 µL	0.5 µL	0.5 µL
Son Hacim	50 µL	50 µL	50 µL

Tablo 4.1: cDNA için HB-2 PZR program şartları

PZR şartları	Sıcaklık	Süre	Döngü
Başlangıç Denatürasyonu	94 °C	2 dk.	1
Denatürasyon	94 °C	30 s	
Bağlanma	58 °C	30 s	30 döngü
Uzama	72 °C	30 s	
Final Uzama	72 °C	10 dk.	
Son Bekletme	+4 °C		

3.2.2.19 Real-Time PZR (qRT-PZR)

LightCycler® 480 Sistemi (Roche Life Science) cihazı kullanılarak gerekli veriler sağlanmıştır. mRNA ekspresyonunun analizi için kullanılmıştır. ADAMTS-8 ve Hβ-2 komplementer DNA ile üçlü tekrar çalışılmıştır. Real time plakasında her bir kuyucuğa yüklenen son hacim 12.5 µL'dir (Tablo 3.8, 3.9 ve 3.10).

Tablo 4.2: Real-Time PZR malzemeleri

RT-PZR Malzemeleri	Son konsantrasyon	Hacim
Kalıp	20 ng	1 µL
RealQ Plus 2X Master Mix	1 X	6,25 µL
İleri Primer(ADAMTS-8) (Hβ-2)	10 pmol	0,5 µL
Steril dH2O (Enjeksiyonluk su)	-	4,25 µL
Reverse Primer(ADAMTS-8) (Hβ-2)	10 pmol	0,5 µL
		12,5 µL

Tablo 4.3: RT-PZR döngü değerleri

Sıcaklık	Süre	Döngü
Başlangıç İnkübasyonu 95 °C	15.01 sn	1
Amplifikasyon 95-55-72 °C	30-30-30 sn	40
Erime eğrisi 95-65-97 °C	1 dk	Sürekli 1
Soğutma 40 °C	30 sn	1

Tablo 4.4: Tez kapsamında kullanılan ekspresyon primerleri

HB2 Forward primer	5'-TTTCTGGCCTGGAGGCTATC-3'
HB2 Reverse primer	5'-CATGTCTCGATCCCACTTAACT-3'
ADAMTS-8 Exp3F	5'-GATGCGTCCATGGCTGCCTCCTA
ADAMTS-8 Exp3R	5'-TGCCAGTTGCAGAAGTTACGCAG-3'

Tablo 4.5: İnhibisyon Deneyi Son Konsantrasyon

● MEK inhibitörü: 10 µM
● Wortmannin (PI3K inhibitör): 1µM
● PD163 (p38 MAP kinase inhibitörü): 20 µM
● SP600125 (JNK inhibitör): 20 Mm
● NFKB inhibitörü:5 mM

3.2.2.20 RT-PZR'ın Analizi

Microsoft Excel elektronik tablo programına RT- PZR cihazlarından sağlanan CT (eşik döngüsü) değerleri aktarılmıştır. IL-6 (20 ng/mL) ve inhibitörlerinin ADAMTS-8 gen ekspresyonuna mRNA seviyesinde etkisine bakmak üç tekrarlı çalışılmıştır. Gerekli hesaplamalar yapılarak en son deney grubu değerleri kontrol gruplarına oranlanarak IL-6'nın ADAMTS-8 genine kaç kat etki ettiği hesaplanmıştır.

3.3 DNA analizi yöntemleri

3.3.1 Deneyde DNA Jel Elektroforezi

5X TBE ana stoktan hesaplamayla 0.5X TBE olacak şekilde seyreltilerek DNA jel elektroforezi için kullanılır (Tablo 3.11). 1 g agaroz, 100 mL 0.5X TBE içinde mikrodalgada 1-2 dk. kaynatılarak tamamen şeffaf olana dek kaynatılır. Jel ılıman olunca içine 3 µL etidyum bromür eklenir. İyice çalkalanarak jel tankın içine dökülür. Jel iyice donduktan sonra örnek yüklemesi yapılır ve 90 V 30 dk. yürütülür. Örnekler yüklenmeden önce 6x DNA boyası ile boyanır ve marker (Thermo SM0311) en başa yüklenir. UV jel görüntüleme cihazında görüntüleme alınır.

Tablo 4.6: DNA jel analizi deney malzemeleri

Solüsyonlar	Yapılışı
5X TBE	1000 ml behere 27.5 g Borik asit (Sigma), 54 g Tris Base (Sigma), 20 mL 0.5M'lık EDTA (pH:8) eklenmiştir. 800 mL distile dH ₂ O ile manyetik karıştırıcıda çözülmüştür. pH'ı 8.0'e ayarlanmıştır. Balon jode 1000 mL distile su ile kalan tamamlanmıştır. Otoklav yapılmıştır.
1 kb(Thermo SM0311)	DNA ladder 1 µL*10 6X TriTrack DNA Loading Dye 1 µL*10 Deionized water 4 µL*10 ----- 60 µL olacak şekilde ependorfa hazırlanarak kullanılmıştır.-20 °C de saklanmıştır.
0.5X TBE	Ana stoktan gerekli hesaplamalar yapılarak solüsyon hazırlanmıştır. Otoklava atıldıktan sonra kullanılmıştır.

3.3.2 Protein Analizi

Bu teknik, spesifik proteini ayırmak ve tanımlamak için kullanılır. Temeli (1) büyüklüğüne göre ayırma, (2) proteini membrana transferi ve (3) hedef proteini belirlemek için ilgili antikolar kullanarak işaretlemektir.

3.3.2.1 Protein Ekstraktı Hazırlama İşlemi

Hücre kültüründe protein ekstrakt çalışmalarında 6 kuyulu plakada kazıma yöntemi kullanılmıştır. Önce medyum iyice çekildi sonra soğuk PBS ile 2 sefer yıkama yapılmıştır ve RIPA tampon 150 µL eklenmiştir. Hücre kazıma aparatıyla iyice kazınarak protein ekstraktı elde edilmiştir. Hücreler soğutulmuş ependorflara alınmıştır. Buz üzerinde 45-60 dk beklenirken ara ara iyice pipetajlama yapılmıştır. +4 °C 13.500 rpmde 10 dk. santrifüj yapıp süpernatant soğutulmuş ependorflara alınmıştır. Konsantrasyon ölçümü Bradford yöntemi ile belirlenip 595 nm de absorbans alınmıştır.

Tablo 4.7: RIPA solüsyonları ve malzemeleri

Son Konsantrasyon
140 mM NaCl (7 mL)
1 mM EGTA (Etilen glikol tetraasetik asit) (500 µL)
10 mM Tris Cl pH:8 (Trizma® base) (500 µL)
%1 Triton x100 (500 µL)
1 mM EDTA (100 µL) + Proteaz inhibitörü (2 tablet)
% 0.1 Sodyum deoksikolat (0.05 g)
% 0.1 SDS (Sodyum dodesil sülfat) (10 mL)
10 mM Tris Cl pH:8 (Trizma® base) (500 µL)
-20°C de muhafaza edilmiştir.

3.3.2.2 Bradford Yöntemi ile Protein Konsantrasyon Ölçümü

96 kuyulu plaka kullanılarak 250 µL Bradford boyası 5 µL -80°C derin dondurucudan alınıp iyice çözünmüş protein örneği yüklenerek 10 dk. karanlık ortamda bekletilip renk tamamen maviye dönünce 595 nm de absorbans alındı (Tablo 3.14). İlgili hesaplama yapılarak yükleme için her biri 20 µg olacak şekilde alikotlama yapıldı.

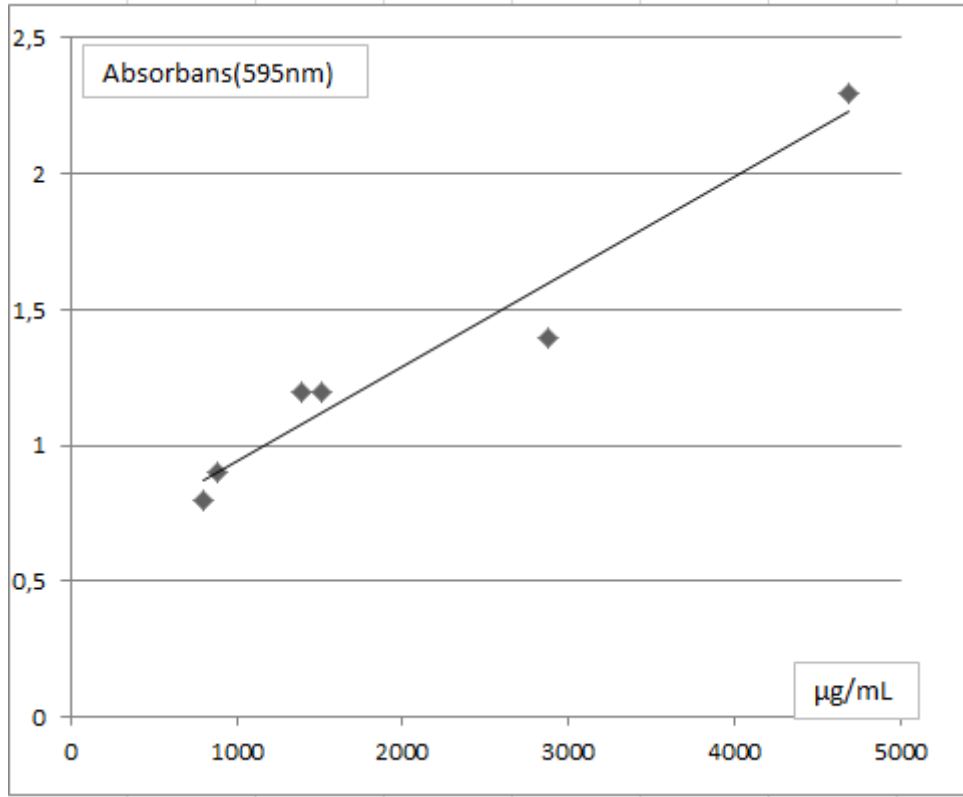
Bradford hesap

$$Y=0.0005x+0.0559$$

Y=örnek-kör yazılır.x yalnız bırakılır.

Tablo 4.8: Protein konsantrasyon solüsyonu hazırlama(devam)

Solüsyonlar
0.1 g Coomassie Brilliant Blue
50 mL % 95'lik Etanol
100 mL % 95'lik Fosforik asit
Kimyasal malzemeler steril dH2O ile 1L'ye tamamlanır. Işıksız ortamda saklanır.



Tablo 4.9: Bradford standart eğrisi

3.3.2.3 Western Blot için Jel Hazırlama

Alt tampon, üst tampon, 10x yürütme tamponu, %10 SDS, 10X TBS stok solüsyonlar önceden hazırlanıp otoklavlanmıştır. Transfer buffer ve amonyum persülfat gibi solüsyonlar o gün taze hazırlanmıştır.

Western için kullanılacak malzemelerin temizliğine dikkat edilmiştir. Aparatta düzenekler kurulmuştur. Alt jeli belli bir kısma kadar koyup donması için yaklaşık 45 dk.-1 saat bekleddikten sonra üst jeli döküp tarak dikkatlice yerleştirilmiştir. Tarak jel donduktan sonra dikkatlice çıkarılmıştır ve son yükleme miktarı 25 µL olacak şekilde protein miktarı 20 µg olacak şekilde hesaplanmıştır. Protein örnekleri boya ile karıştırıp 95 °C 5 dk. denatüre edilip ağızları parafilmlenerek hemen jele yüklenmiştir. 120 V 'da yürütülmüştür.

Tablo 5.1: SDS jel malzemeleri

(2 jel için)	%10'luk Ayırma Jeli	Üst Jeli
ddH ₂ O	3.07 mL	5 mL
Akrilamid-Bisakrilamid (37.5:1)/ (19:1)	0.625 mL	2.5 mL
%10 APS	50 µL	100 mL
Tampon	1.25 mL	2.5 mL
TEMED	5 µL	10 mL

Tablo 5.2: Protein analizi için kullanılan kimyasallar

Kullanılan Solüsyon
Alt Tampon
0.4 g SDS, 19.8 g Tris hassas terazide tartılmış olup pH:8.8'e ayarlanmıştır. +4°C'te saklanır.
Örnek Yükleme boyası
100 µL 2-Beta Merkaptolanol, 900 µL 4XLSB için kullanılmıştır.
Üst Tampon
0.4 g SDS ,6.6 g Tris hassas terazide tartılmıştır. pH:6.8'e ayarlanmıştır. +4°C'te saklanır.

Tablo 5.3: Protein analizi için kullanılan kimyasallar

Kullanılan Solüsyon	İçeriğın Hazırlanması
10X running tamponu	Solüsyon için 144.4 g glisin,30.3 g Tris, terazide tartılmıştır. pH:8.3'e ayarlanarak steril dH2O ile 1 L'ye tamamlanmıştır. +4°C buzdolabında saklanmıştır.
Coomassie Brilliant Mavi R250 Boya	0.1L %95'lik Etanol, 0.25 g Coomassie Brilliant Blue 250, % 10 Asetik Asit karışımı hazırlanmıştır. Oda sıcaklığında saklanmıştır.
%10 SDS çözeltisi	50 g SDS hassas terazide tartılmıştır. Üzerine 500 mL steril dH2O eklenmiştir. Oda sıcaklığında saklanmıştır.
1X Yürütme tamponu	10X running tamponunda seyreltme yapılarak solüsyon hazırlanmıştır. Oda sıcaklığında saklanmıştır.
Transfer tamponu	200 mL metanol;100 mL 10X yürütme tampon; steril dH2O ile 1L'ye tamamlanmış olup içerisine en son 500 µL %10 SDS solüsyonu eklenmiştir. Taze hazırlanmış olarak -20°C'de saklanmıştır.
1X TBS-(% 0.1) Tween20 tampon solüsyonu	100 mL 10X TBS tamponu, 900 mL saf dH2O ile 1 L'ye tamamlanmış olup içerisine 1000 µL Tween20 solüsyonu eklenmiştir. +4°C 'de saklanmıştır.
10X TBS tampon solüsyonu	87.6 g NaCl , 24.22 g Tris terazide tartılmıştır. En son pH:7.5'e ayarlanarak saf suyla 1000 mL'ye tamamlanmıştır. +4°C'de saklanmıştır.
Bloklama tampon solüsyonu	Tampon hazırlanırken 20 mL 1XTBS-tween20 solüsyonuna 1 g yağsız süt tozu eklenmiştir. +4°C'de saklanmıştır.

3.3.2.4 Proteinlerin Transfer İşlemi

Kurutma kağıdından jel büyüklüğünde 6 parça kesilmiştir. Kesilen kurutma kağıtları ve aparatları, süngerleri transfer bufferda iyice ıslatılmıştır ve bir süre bekletilmiştir. Transfer buffer kullanılmadan önce -20°C soğutulmuştur. PVDF (0.45 µM milipore) membrandan 8.5*5.2 ebatlarında parça kesilmiştir ve methanol içinde 1 dk. aktive edilmiştir. Daha sonra soğuk transfer buffera alınmıştır, orada en az 5 dk. bekletilmiştir. Membranın pürüzlü yüzeyi aktif yüzeyini ve transfer sırasında jele bakmalıdır. Jel için kap hazırlanmıştır, içine soğuk transfer buffer koyulmuştur. En az 5 dk. bekletilmiştir. Sandviç hazırlamaya başlanmıştır. Aparatın siyah kısmı, transfer tankının siyah kısmına gelecek şekilde oturtulmuştur. Siyah aparat üstüne sünger, 3 tane kağıt, jel, membran (pürüzlü yüzey jele bakmalı), üstüne 3 tane kağıt ve üstüne sünger koyup aparat kapatılmıştır. Aparat tanka yerleştirilmiştir. Koyduğumuz transfer sistemi sıvıya gömülmüştür. Siyah taraf siyah tarafa gelecek şekilde dikkatli olunmuştur. Tankın içini transfer buffer ile doldurulmuştur ve buz kalıbı koyarak ortamın soğuk kalması sağlanmıştır. +4 °C’de 15 V akımda bir gece transfer yapılmıştır.

3.3.2.5 Proteinlerin Membrana Sabitleme ve İşaretlenmesi İşlemi

Transferden sonra 1X TBS-tween-20 ile 5 dk. yıkanmıştır. Poncaue içerisinde 1 saat kadar bekletilmiştir. Bu aşamada hızlı bir şekilde bantlar belirmiştir. Membranı bloklama tamponu içine koyulmuştur. Bloklama tamponu içinde 90 dk. çalkalanmıştır. Ardından 3 kez 1X TBS-Tween-20 ile 5’er dk. aralıklarla yıkanmıştır. Primer antibody ile overnight soğuk odada çalkalamaya bırakılmıştır. Beta aktin primer antikor ile 90 dk. muamele edilmiştir ve 3 kez 5 er dk. 1X TBS-Tween20 ile yıkama yapılmıştır. Beta aktin sekonder antikor ile 90 dk. muamele edilmiştir ve 3 kez 5’er dk. yıkama yapılmıştır ve görüntüleme alınmıştır. ADAMTS-8 primer antikor ile 1 gece +4°C cihazda bırakılmıştır. Ertesi sabah gelip 1X TBS-Tween20 ile 3 kez 5’er dk. aralıklarla yıkanmıştır. Sekonder antikora ADAMTS-8 konulup 90 dk. sonra 1X TBS-Tween20 ile 3 kez 5’er dk. aralıklarla yıkanmıştır ve görüntüleme alınmıştır.

3.3.2.6 Western Blot Görüntüleme Sistemi

PVDF membranlara transfer edilen proteinler, ECL solüsyonu ile membran iyice ıslatılıp 1 dk. ışısız ortamda bekletilmiştir. Proteinleri görüntülemeye UVP görüntüleme sistemi kullanılmıştır.

3.3.2.7 Western Blot Analizi

Dansitometrik olarak protein bantları ImageJ programı ile göreceli değerlendirilmiştir. Sayısal analiz deney verilerinin beta aktine oranı hesaplanmıştır.

3.3.2.8 Proliferasyon analizi için ((3-(4,5-dimethylthiozoly-2)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) testi

Bu metoda göre istenilen inkübasyon periyodundan sonra (24, 48 ve 72 sa) hücrelerin bulunduğu ortama, optimizasyon sonucu belirlenen son konsantrasyon 0.5 mg/mL olacak şekilde stok MTT solüsyonu eklenmiştir ve 4 saat inkübatörde inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda medyum uzaklaştırılmıştır. 0.004 M HCl içeren izopropanol ile kristaller çözülmüştür ve UV spektro okuyucu ile 550 nm dalga boyunda absorbans alınmıştır.

3.3.2.9 Proliferasyon analizi için ((3-(4,5-dimethylthiozoly-2)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) kimyasalının stoktan hazırlanması

Steril PBS içinde protokole göre hesaplanıp bir gece boyunca magnetik karıştırıcıda hazırlanmıştır. 0.22 µm steril filtreden geçirilerek kullanılmıştır. +4 °C'de saklanmıştır.

3.3.2.10 İzopropanol çözücü solüsyonunun hazırlanması

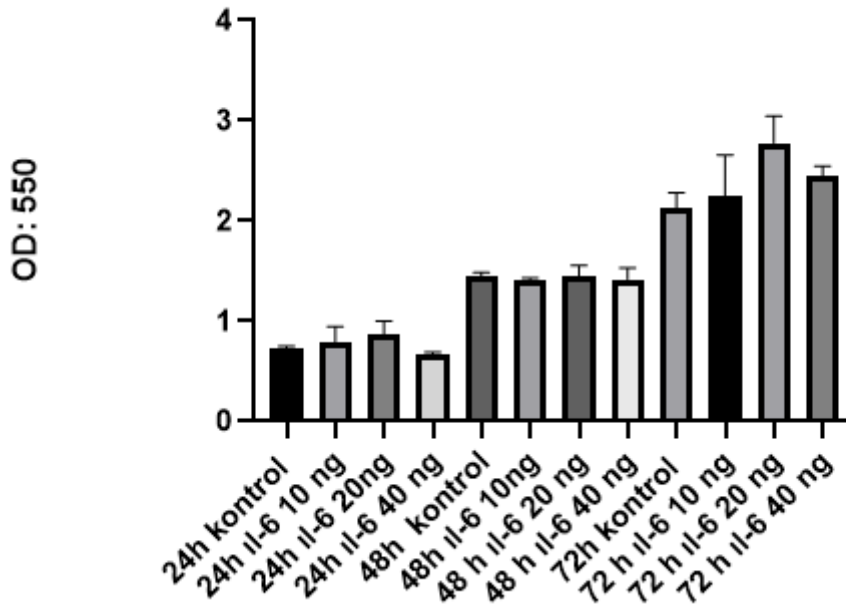
İzopropanol son konsantrasyon 0.004 M HCl içerecek şekilde hazırlanmış olup formazan kristalleri çözdürülmüştür.

4.BULGULAR

4.1. IL-6 farklı konsantrasyonlarda HCT-116 kolon kanseri hücrelerinde proliferasyonu üzerine etkisinin belirlenmesi

MTT deneyi için 96 kuyulu plakada her bir kuyucuk 10.000 hücre olacak şekilde 3 ayrı plakaya 24 sa, 48 sa ve 72 sa olacak şekilde bölüştürülmüştür. Ertesi gün hücrelerin kontamine olup olmadığı kontrol edilmiştir. Hücreler % 0.01 BSA'lı DMEM'e alınmıştır ve 1 saat inkübatörde beklenmiştir. 1 saat sonra tüm plakalara kontroller 12 tekrarlı, IL-6 sitokini 10 ng/mL, 20 ng/mL ve 40 ng/mL, 6 şar kuyu olacak şekilde kontroller hariç tutularak uygulanmıştır ve inkübatöre kaldırılmıştır. Ertesi gün belli saatte hücreler kontrol edilmiştir 24 sa için herbir kuyudan 100 µL çekilip 10 µL MTT uygulanmıştır. 4 saat inkübatörde bırakılmıştır. 4 saat sonra bütün medyum atılmıştır ve izopropanol içeren çözücü ile iyice formazan kristalleri çözünmesi için shaker cihazına konulup 30 dk. beklenmiştir ve iyice pipetaj yapılarak kristallerin çözünmesi sağlanmıştır. 550 nm de absorbans alınmıştır. Sonuçlar grafiğe döküldüğünde Şekil 1.9'de IL-6 10 ng/mL, 20 ng/mL ve 40 ng/mL üç farklı konsantrasyonlarda 24 sa, 48 sa ve 72 sa kontroller kendi içlerinde kıyaslandığında GraphPad programında anlamlı istatistiksel fark saptanmamıştır.

IL-6'NİN HCT-116 HÜCRE HATTINA PROLİFERASYON ANALİZİ



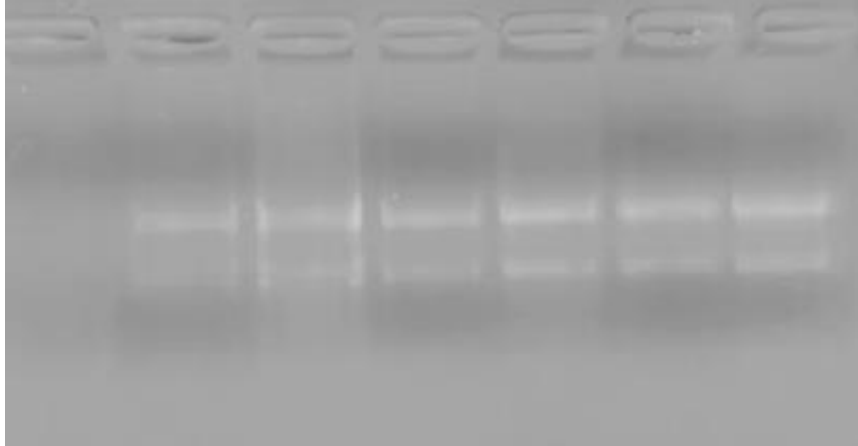
Şekil 1.9: Farklı IL-6 konsantrasyonların (10 ng/mL, 20 ng/mL ve 40ng/mL) HCT-116 hücre hattı proliferasyonu üzerine etkisi

4.2. IL-6 Sitokininin ADAMTS-8 Geni Üzerindeki Etkisi

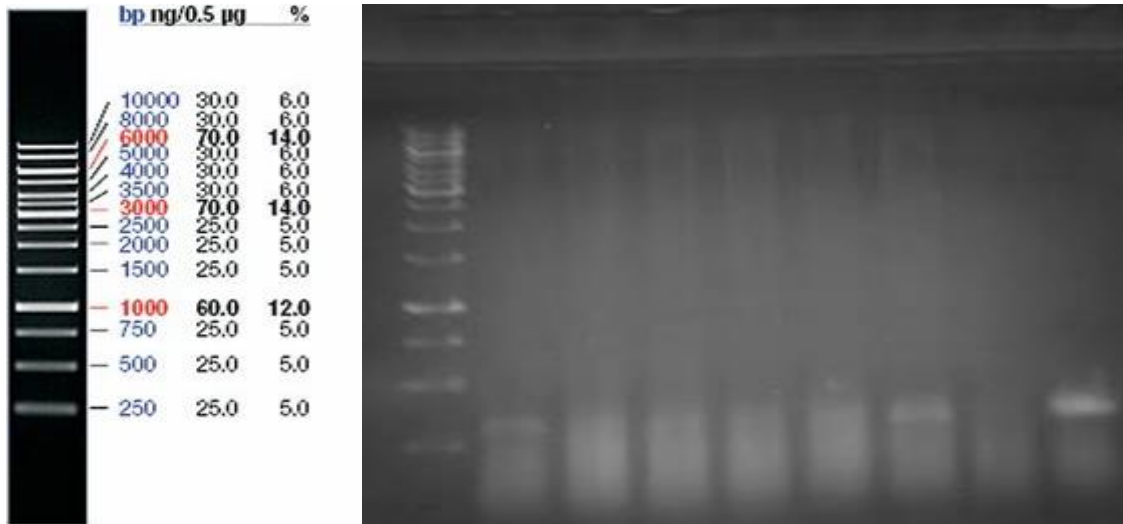
4.2.1. IL-6 sitokininin ADAMTS-8 gen ekspresyonuna etkisinin mRNA düzeyinde belirlenmesi

Bu basamakta önce Bölüm 3.2.2.8'de HCT-116 insan kolon kanseri hücre hattı büyütülmüştür. Bölüm 3.2.2.12 belirtildiği şekilde pellet alma işlemi yapılmıştır. Bölüm 3.2.2.14 belirtildiği şekilde RNA izolasyonu yapılmıştır ve RNA'ların kalitesinin kontrolü Bölüm 3.2.2.16 anlatıldığı gibi yapılmıştır (Şekil 2.1). Buna göre elde edilen RNA'daki ribozomal 28S ve 18S RNA büyüklüklerinin görülebilmıştır. RNA kalitesinin de daha sonraki çalışmalar için kullanılabilir olduğu doğrulanmıştır. Bölüm 3.2.2.15 anlatıldığı şekilde miktar tayini yapılmıştır. Bölüm 3.2.2.17 belirtildiği şekilde cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. Bölüm 3.2.2.18 belirtildiği şekilde kontrol PZR'ı kurulmuştur ve örnekler DNA jel elektroforezinde yürütülmüştür. UV jel görüntüleme sisteminde görüntülenmiştir (Şekil 2.2). Genel olarak kontrolle kıyaslandığında IL-6 (20 ng/mL) ADAMTS-8 genine mRNA seviyesinde arttırıcı bir etkisi olduğunu söyleyebiliriz.

M(SM1831) kontrol 1.saat 3.saat 6.saat 24.saat 48.saat



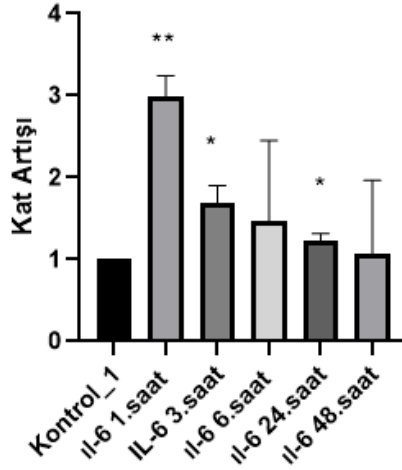
Şekil 2.1: RNA jel elektroforez sonucu



Şekil 2.2: Hβ-2 Polimeraz Zincir Reaksiyonu.

M: 1 kb marker. 1: Kontrol 2: 1. saat 3: 3. saat 4: 6. saat 5: 24. saat 6: 48. saat 7: Negatif
8:Pozitif

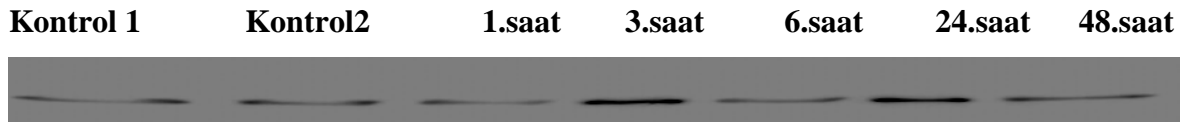
IL-6(20 ng) HCT-116 hücre hattında ADAMTS-8 geni üzerine etkisinin mRNA düzeyinde ifadesi



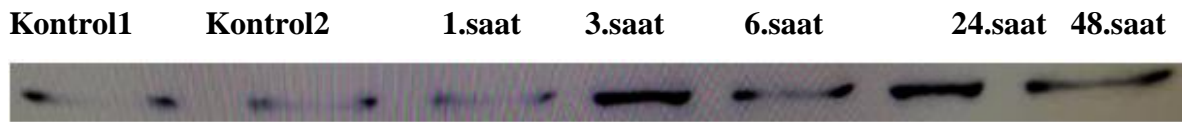
Şekil 2.3: IL-6(20 ng) HCT-116 hücre hattında ADAMTS-8 geni üzerine etkisinin mRNA düzeyinde kat artış ifadesi. İstatistiki olarak anlamlı bulunan $p \leq 0.05$ olanlar * işareti ile belirtilmiştir.

4.2.1.1 IL-6 sitokininin ADAMTS-8 gen ekspresyonuna etkisinin protein düzeyinde belirlenmesi

Bölüm 3.2.2.8 'de anlatıldığı şekilde HCT-116 hücre hattı büyütülmüştür. Bölüm 3.2.2.12 anlatıldığı şekilde hücre pelletleri alınmıştır. Bölüm 3.3.2.3'de anlatıldığı şekilde Western Blot yapılmıştır. Bölüm 3.3.2.6 anlatıldığı şekilde proteinler görüntülenmiştir (Şekil 2.4(a) Şekil 2.4(b)). Daha sonra Bölüm 3.3.2.7 belirtildiği haliyle ImageJ programı ile Western Blot analizi yapılmıştır. Dansitometrik analiz sonucu HCT-116 hücre hattında ADAMTS-8 genine IL-6 (20 ng) etkisi protein düzeyinde kontrole göre belirgin ifade artışı 6.sa ve 48.sa saptanmıştır.



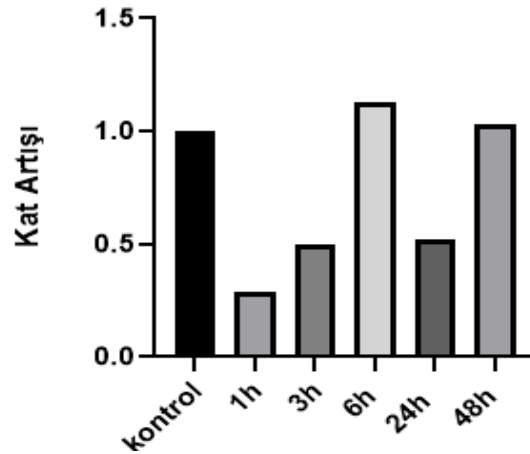
(a)Beta Aktin bandı



(b)ADAMTS-8 bandı

Şekil 2.4: (a)Beta aktin western sonucu. (b)ADAMTS-8 bandı

IL-6(20 ng/mL)'nin ADAMTS-8 genine protein seviyesinde etkisi



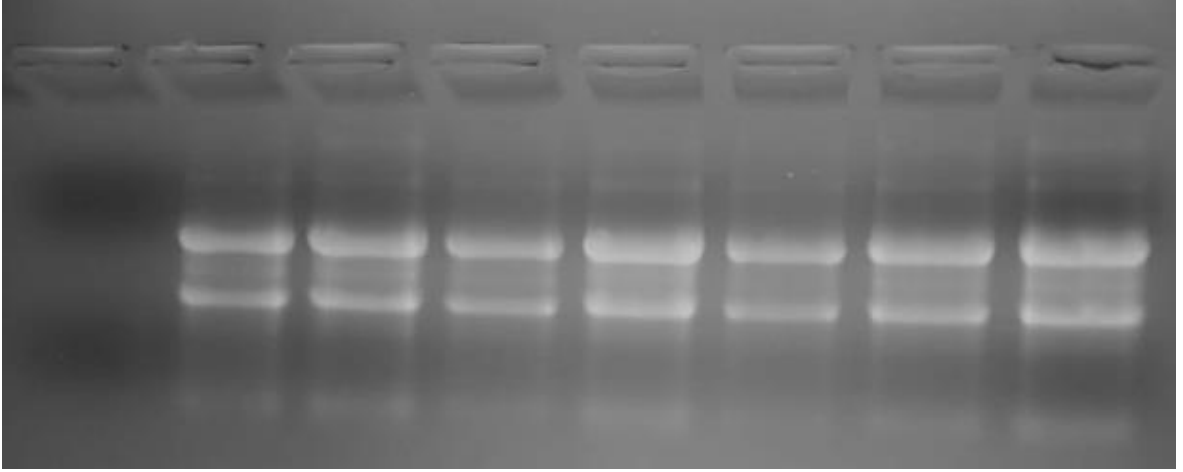
Şekil 2.5: IL-6(20ng) HCT-116 hücre hattında ADAMTS-8 genine protein seviyesinde kat artış ifadesi

4.2.1.2 IL-6 Sitokininin İnhibitörlerinin ADAMTS-8 Geni Üzerindeki Etkisinin mRNA Seviyesinde Belirlenmesi

Bölüm 3.2.2.8 'de HCT-116 kolon kanseri hücre hattı büyütülmüştür. Tez kapsamındaki gibi deney kurulmuştur. Bölüm 3.2.2.12'de belirtildiği şekilde pellet alma işlemi yapılmıştır. Bölüm 3.2.2.14 belirtildiği gibi RNA eldesi sağlanmıştır ve elde edilen RNA'ların kalitesinin kontrolü Bölüm 3.2.2.16'de belirtildiği gibi RNA jel elektroforezi yapılmıştır (Şekil 2.6). Bölüm 3.2.2.15 'de belirtildiği şekilde RNA miktar tayini yapılmıştır. Daha sonra Bölüm 3.2.2.17'de belirtildiği şekilde cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. Bölüm 3.2.2.18 'de belirtildiği şekilde kontrol PZR'ı kurulmuştur ve DNA jel elektroforezi yapılmıştır. UV jel görüntüleme sisteminde görüntülenmiştir (Şekil 2.7).

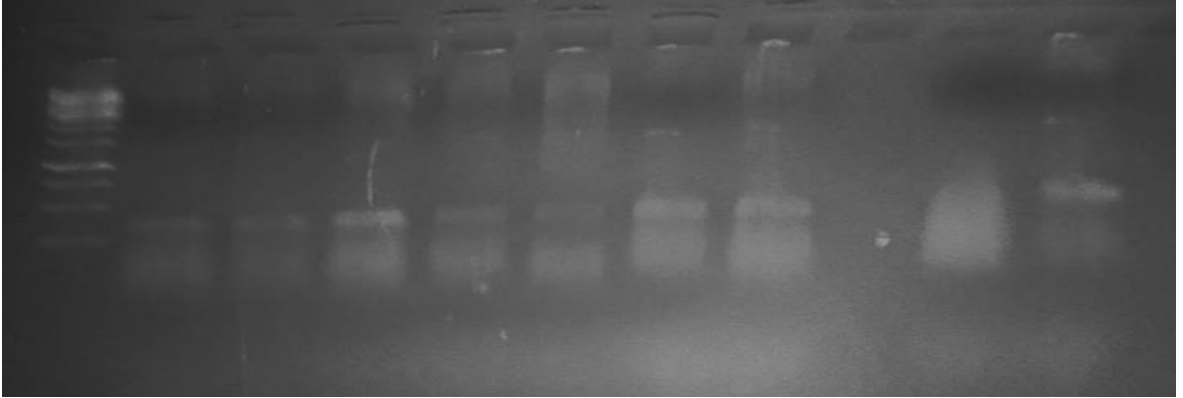
IL-6 inhibitörlerinden en fazla MEK inhibitörü etkili olmuş olup ADAMTS-8 mRNA ifadesini istatistiksel olarak GraphPad programında analiz edilip oldukça azalttığı sonucuna varılmıştır. Bu sonuç doğrultusunda IL-6(20 ng) ADAMTS-8 mRNA seviyesinde etkisini MEK yolağı üzerinden göstermektedir (Şekil 2.8). İnhibisyon grafiğine göre kontrol ile IL-6 (20 ng/mL) kıyaslandığında 1.5 katın üstünde istatistiksel olarak anlamlı ADAMTS-8 geninde mRNA artışı gözlenmiştir. IL-6 (20 ng/mL) ile inhibitörler kıyaslandığında MEK inhibitörü uygulandığında ADAMTS-8 mRNA seviyesinde 0.5 kat oranında istatistiksel olarak anlamlı azalma saptanmıştır. Worthmannin(PI3K inhibitör) inhibitörü uygulandığında 2-7 kat arasında artış, PD169(p38 MAP kinase inhibitörü) inhibitörü uygulandığında 10 katın üstünde artış, SP600125(JNK inhibitör) inhibitörü uygulandığında 2-10 kat artış, NFKB inhibitörü uygulandığında 20 katın üstünde ADAMTS-8 geninin mRNA düzeyindeki artış istatistiki olarak saptanmıştır (Şekil 2.8).

M(SM1831) K IL-6 MEK WORTHMANNIN SP600125 PD169 NFkB

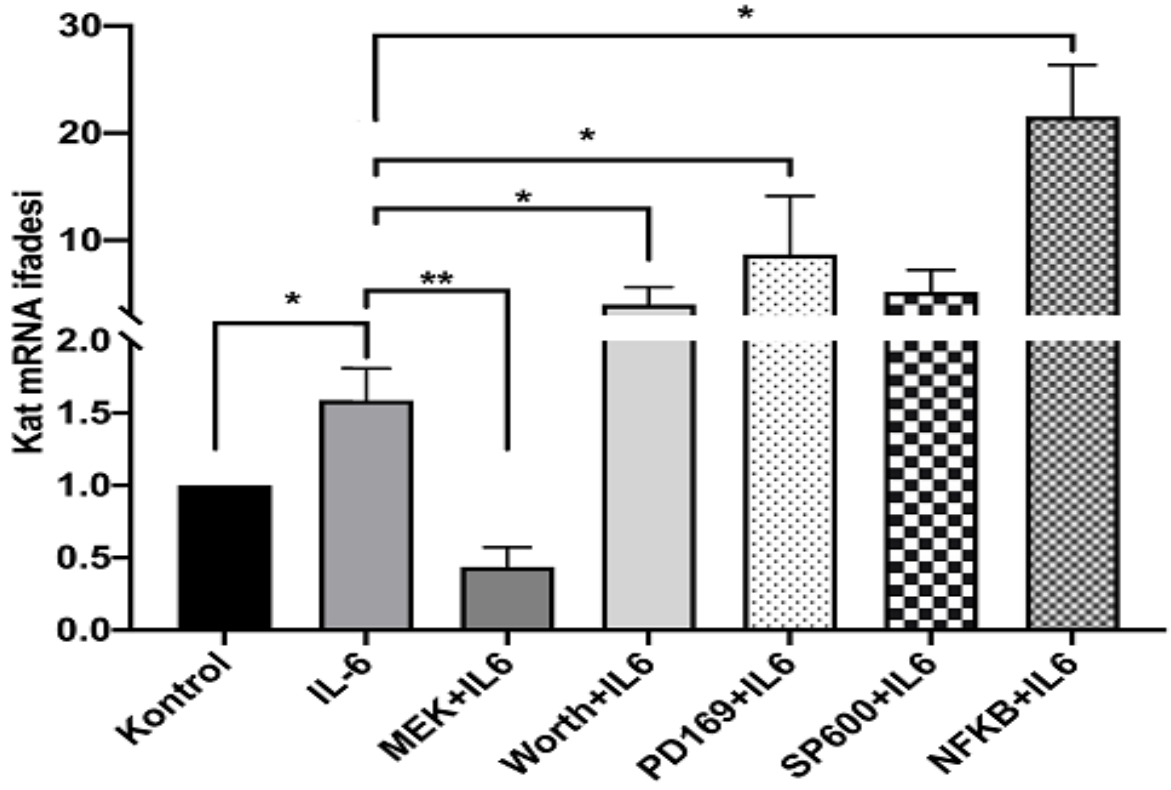


Şekil 2.6: IL-6 inhibitör RNA jel elektroforezi

M (1 kb) Kontrol IL-6 MEK WORTHMANNİN SP600125 PD169 NFkB NK PK



Şekil 2.7: IL-6 inhibitörlerinin Hβ-2 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) sonucu



Şekil 2.8: IL-6 inhibitörlerinin ADAMTS-8 genine mRNA düzeyinde etkisi İstatistiki olarak anlamlı bulunan $p \leq 0.05$ olanlar * işareti ile belirtilmiştir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

ADAMTS-8 geni önemli bir anjiyoinhibitör geni olmakla beraber literatürde bu genle alakalı az çalışma bulunmaktadır ve bu genin transkripsiyonel ve translasyonel olarak regülasyonu hakkında yeterince veri yoktur. ADAMTS-8 geninin kolorektal kanserdeki işlevi ve ifadesi az çalışıldığı için daha çok moleküler bazda çalışma yapılmasına ihtiyaç vardır. Bu tez çalışması literatüre kolorektal kanserde tedavi açısından moleküler tedavide yol gösterici olmaktadır.

Tezde yapılan çalışmada IL-6 (20 ng/mL) sitokininin ADAMTS-8 genine etkisi HCT-116 kolon kanseri hücre hattında mRNA ve protein düzeyinde bakılmıştır. IL-6 ailesi, enfeksiyon, kronik enflamasyon, otoimmünite ve kanser gibi çeşitli hastalıklarda önemli rolü bulunmaktadır ve günümüzde kolorektal kanserle alakalı tedavide IL-6 sitokininin aktivelediği yolaklar odak noktası olmaktadır. Kansereleşmede anjiyogenez, metastaz, ilaç dirençliliği gibi sorunlar ciddi sıkıntılara yol açmakla beraber bu yolda kritik iki faktörün kolorektal kanserle ilişkili bağlantısını aydınlatmaktadır.

Yapılan tez çalışmasında IL-6 (20 ng/mL) ADAMTS-8 genine mRNA düzeyinde etkisi genel olarak artış yönünde olup kontrole kıyasla 1.saat, 3.saat ve 24.saatte istatistiksel olarak anlamlı ADAMTS-8 gen mRNA düzeyinde artışa yol açmıştır. IL-6 (20 ng/mL) ADAMTS-8 genine protein düzeyindeki etkisi artış yönünde göstermiştir (Şekil 2.5).

IL-6 inhibitörleriyle kurulan real time deneyinde MEK inhibitörü ADAMTS-8 mRNA düzeyinde istatistiki olarak anlamlı azalışa yol açtığı sonucuna varılmıştır. IL-6 (20 ng/mL) ile inhibitörler kıyaslandığında MEK inhibitörü uygulandığında ADAMTS-8 mRNA seviyesinde 0.5 kat istatistiksel olarak anlamlı azalma saptanmıştır. Worthmannin (PI3K inhibitör) inhibitörü uygulandığında 2-7 kat arasında artış, PD169 (p38 MAP kinase inhibitörü) inhibitörü uygulandığında 10 katın üstünde artış, SP600125 (JNK inhibitör) inhibitörü uygulandığında 2-10 kat artış, NFkB inhibitörü uygulandığında 20 katın üstünde ADAMTS-8 geninin mRNA düzeyinde anlamlı artış istatistiki olarak saptanmıştır (Şekil 2.8).

MTT analizinde IL-6 sitokini üç farklı konsantrasyon (10 ng/mL, 20 ng/mL, 40 ng/mL) 24 sa, 48 sa ve 72 sa kendi içlerindeki kontrolle Graphpad programında kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır (Şekil 1.9).

Kolorektal kanserde ADAMTS-8 geni ve IL-6 inflamasyon sitokini kritik rol oynayan iki önemli faktör olmaktadır. Kolorektal kanser tedavisinde moleküler bazlı çalışmalarda IL-6'nın etki ettiği yolakların önemli tedavisel süreçte etkili olduğuna dair çalışmalar mevcuttur. Özellikle STAT3 önemli kritik bir faktör olup bu transkripsiyon faktörüne

yönelik moleküler bazlı çalışmalar hedeflenmelidir. Aynı zamanda IL-6'nın kolorektal kanserin ilerlemesinde aktifleştirdiği yollardaki molekülleri ve IL-6 reseptörlerini hedefleyen tedavisel stratejiler geliştirilebilir.

Bu tez çalışmasında IL-6'nın kolorektal kanserde önemli bir biyobelirteç adayı olabilecek ADAMTS-8 genine etkisine moleküler düzeyde mRNA ve protein olarak HCT-116 kolon kanseri hücre hattında bakılmıştır ve bu çalışma literatürde mevcut olmayıp önemli genel bir bakış açısı sağlamakla beraber kolorektal kansere yönelik tedavisel süreçte moleküler bazda önemli bir basamak oluşturmak yönünden ileriki çalışmalar için öncü olacaktır. Ve ayrıca IL-6'nın 3 farklı konsantrasyonu (10 ng/mL, 20 ng/mL ve 40 ng/mL) HCT-116 hücre hattında proliferasyonu üzerine istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmediği bu tezde ilk kez saptanmıştır. IL-6'nın ADAMTS-8 genine etkisi kolon kanseri hücre hattı olan HCT-116'da pozitif yönde MEK yolu üzerinden transkripsiyonel regüle ettiğine dair sonuca ilk kez bu tez çalışmasında varılmıştır.

6.KAYNAKLAR (IEEE)

- [1] I. Mármol, C. Sánchez-de-Diego, A. Pradilla Dieste, E. Cerrada,& M. Rodriguez Yoldi, "Colorectal Carcinoma: A General Overview and Future Perspectives in Colorectal Cancer." *International Journal of Molecular Sciences*, 18(1), 197, (2017) doi:10.3390/ijms18010197
- [2] J. Li, L. Huang, H. Zhao, Y. Yan & J. Lu "The Role of Interleukins in Colorectal Cancer. *International Journal of Biological Sciences*", 16(13), 2323–2339,(2020),doi:10.7150/ijbs.46651
- [3] R. Kelwick, I. Desanlis, G.N. Wheeler, et al. "The ADAMTS (A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs) family *Genome Biol.*", 16, p. 113, (2015) 10.1186/s13059-015-0676-3
- [4] J. Dubail, F. Kesteloot, C. Deroanne, et al. "ADAMTS-2 functions as anti-angiogenic and anti-tumoral molecule independently of its catalytic activity" *Cell. Mol. Life Sci.*, 67, p. 4213, (2010), 10.1007/s00018-010-0431-6
- [5] Y.P. Hsu, C.A. Staton, N. Cross, D.J." Buttle Anti-angiogenic properties of ADAMTS-4 in vitro *Int. J. Exp. Pathol.*", 93 (1), pp. 70-77, (2012), 10.1111/j.1365-2613.2011.00802.x
- [6] S. Kumar, S. Sharghi-Namini, N. Rao, et al. "ADAMTS5 functions as an anti-angiogenic and anti-tumorigenic protein independent of its proteoglycanase activity" *Am. J. Pathol.* (181), pp. 1056-1068, (2012) 10.1016/j.ajpath.2012.05.022
- [7] R. Kelwick, L. Wagstaff, J. Decock, et al. "Metalloproteinase-dependent and – independent processes contribute to inhibition of breast cancer cell migration, angiogenesis and liver metastasis by a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs-15" *Int. J. Cancer*, 136 pp. E14-E26, (2015), 10.1002/ijc.29129
- [8] Ide A. Tan, C. Ricciardelli, D.L. Russell "The metalloproteinase ADAMTS1: a comprehensive review of its role in tumorigenic and metastatic pathways" *Int. J. Cancer*, 133, pp. 2263-2276, (2013), 10.1002/ijc.28127 Google Scholar
- [9] Y. H. Kim, H.C. Lee, S.Y. Kim, et al. "Epigenetic analysis of aberrantly methylated genes in colorectal cancer identifies genes commonly affected by epigenetic alterations" *Ann. Surg. Oncol.*, 18, pp. 2338-2347, (2011), 10.1245/s10434-011-1573-y

- [10] C. Zhang, Y. Shao, W. Zhang, et al. "High-resolution melting analysis of ADAMTS9 methylation levels in gastric, colorectal, and pancreatic cancers *Cancer Genet. Cytogenet.* 196 , pp. 38-44, (2010) 10.1016/j.cancergencyto.2009.08.016
- [11] Z. Li, W. Zhang, Y. Shao, et al. "High-resolution melting analysis of ADAMTS18 methylation levels in gastric, colorectal and pancreatic cancers" *Med. Oncol.*, 27 , pp. 998-1004, (2010) 10.1007/s12032-009-9323-8
- [12] W. Du, S. Wang, Q. Zhou, et al. "ADAMTS9 is a functional tumor suppressor through inhibiting AKT/m TOR pathway and associated with poor survival in gastric cancer" *Oncogene*, 32 , pp. 3319-3328, (2013), 10.1038/onc.2012.359
- [13] A. Moncada-Pazos, A.J. Obaya, M.F. Fraga, et al. "The ADAMTS12 metalloprotease gene is epigenetically silenced in tumor cells and transcriptionally activated in the stroma during progression of colon cancer" *J. Cell Sci.*, 122 , pp. 2906-2913, (2009), 10.1242/jcs.050468
- [14] C.G. Choi Gigi, Jisheng Li, Yajun Wang "The metalloprotease ADAMTS8 displays antitumor properties through antagonizing EGFR-MEK-ERK signaling and is silenced in carcinomas by CpG methylation" *Mol. Cancer Res.*, 12 , pp. 228-238, 10.1158/1541-7786, (2014), MCR-13-0195 Google Scholar
- [15] J. R. Dunn, J.E. Reed, D.G. du Plessis, et al. Expression of ADAMTS-8, a secreted protease with antiangiogenic properties, is down regulated in brain tumors *Br. J. Canc.*, 94 (2006), pp. 1186-1193, 10.1038/sj.bjc.6603006
- [16] Sarah Porter, D. Stuart, Scott, M. Elaine, et al. "Dysregulated expression of adamalysin-thrombospondin genes in human breast carcinoma *Clin. Cancer Res.*, 10 , pp. 2429-2440, (2004), 10.1158/1078-0432.CCR-0398-3 View PDF View Record in Scopus Google Scholar
- [17] Close J. Dunn, D. Panutsopoulos, M. Shaw, et al. "METH-2 silencing and promoter hypermethylation in NSCLC" *Br. J. Canc.*, 91 , pp. 1149-1154, (2004), 10.1038/sj.bjc.6602107 View Record in Scopus Google Scholar
- [18] Close K. emircan, E. Gunduz, M. Gunduz, et al. "Increased mRNA expression of ADAMTS metalloproteinases in metastatic foci of head and neck cancer *Head Neck*", 31 , pp. 793-801, (2009), 10.1002/hed.21045 Google Scholar
- [19] J. Chen, J. Zhang, X. Li, et al. "Downregulation of ADAMTS8 by DNA hypermethylation in gastric cancer and its clinical significance" *BioMed Res. Int.*, 2016 , p. 5083841, 10.1155/2016/5083841 ,(2016), View PDF View Record in Scopus Google Scholar

- [20] X. Zhao, C. Yang, J. Wu, et al. "ADAMTS8 targets ERK to suppress cell proliferation, invasion, and metastasis of hepatocellular carcinoma" *OncoTargets Ther.*, 11 ,pp. 7569-7578, (2018), 10.2147/OTT.S173360 View PDF CrossRef View Record in Scopus Google Scholar
- [21] <https://www.everydayhealth.com/colon-cancer/stages-what-they-mean-survival/>
- [22] <https://www.wjgnet.com/1007-9327/figures/v25/i23/2863.htm>
- [23] *Genome Biol.* 2015 May 30;16(1):113.doi:10.1186/s13059-15-0676-3.
- [24] Sun Y 2015 <https://docplayer.biz.tr/61774234-Adamts-agrekazlarin-kondrositlerdeki-biyolojik-rolleri-ve-klinik-uygulama-potansiyelleri.html>
- [25] Apte 2009 <https://docplayer.biz.tr/61774234-Adamts-agrekazlarin-kondrositlerdeki-biyolojik-rolleri-ve-klinik-uygulama-potansiyelleri.html>
- [26] Santiago Cal, Carlos López-Otín. "ADAMTS proteases and cancer". *Matrix Biology*, 44-46(), 77–85, (2015), doi:10.1016/j.matbio.2015.01.013
- [27] JE. Choi, DS. Kim, EJ. Kim, MH. Chae, SI. Cha, CH. Kim, et al. "Aberrant methylation of ADAMTS1 in non-small cell lung cancer". *Cancer Genet Cytogenet* 2008;187:80–4.
- [28] YH. Kim, HC. Lee, SY. Kim, YI. Yeom, KJ. Ryu, BH. Min, et al. "Epigenomic analysis of aberrantly methylated genes in colorectal cancer identifies genes commonly affected by epigenetic alterations". *Ann Surg Oncol* 2011;18:2338–47.
- [29] JR. Dunn, JE. Reed, DG. du Plessis, EJ. Shaw, P. Reeves, AL. Gee, et al. "Expression of ADAMTS-8, a secreted protease with antiangiogenic properties, is downregulated in brain tumours". *Br J Cancer* 2006;94:1186–93.
- [30] GC. Choi, J. Li, Y. Wang, L. Li, L. Zhong, B. Ma, et al. "The metalloprotease ADAMTS8 displays antitumor properties through antagonizing EGFR–MEK–ERK signaling and is silenced in carcinomas by CpG methylation". *Mol Cancer Res* 2014;12:228–38.
- [31] S. Rodriguez- S. Rodero , AF. Fernandez, JL. Fernandez-Morera, P. Castro-Santos, GF. Bayon, C. Ferrero, et al. "DNA methylation signatures identify biologically distinct thyroid cancer subtypes". *J Clin Endocrinol Metab* 2013;98:2811–21.
- [32] JR. Dunn, D. Panutsopoulos , MW. Shaw, J. Heighway , R. Dormer , EN. Salmo, et al. "METH-2 silencing and promoter hypermethylation in NSCLC". *Br J Cancer* 2004;91:1149–54.

- [33] PH. Lo, HL. Lung , AK. Cheung , SS. Apte, KW. Chan, FM. Kwong, et al. "Extracellular protease ADAMTS9 suppresses esophageal and nasopharyngeal carcinoma tumor formation by inhibiting angiogenesis". *Cancer Res* 2010;70:5567–76.
- [34] W. Du, S. Wang, Q. Zhou, X. Li, J. Chu, Z. Chang, et al. "ADAMTS9 is a functional tumor suppressor through inhibiting AKT/mTOR pathway and associated with poor survival in gastric cancer". *Oncogene* 2013;32:3319–28.
- [35] C.Zhang ,Y. Shao , W. Zhang, Q.Wu , H .Yang, Q.Zhong, et al. "High-resolution melting analysis of ADAMTS9 methylation levels in gastric, colorectal, and pancreatic cancers". *Cancer Genet Cytogenet* 2010;196:38–44.
- [36] HL. Lung , PH. Lo, D. Xie, SS. Apte, AK. Cheung, Y Cheng , et al. "Characterization of a novel epigenetically-silenced, growthsuppressive gene, ADAMTS9, and its association with lymph node metastases in nasopharyngeal carcinoma". *Int J Cancer* 2008;123:401–8.
- [37] L. Peng, Z. Yang, C. Tan, G. Ren, J. Chen "Epigenetic inactivation of ADAMTS9 via promoter methylation in multiple myeloma". *Mol Med Rep* 2013;7:1055–61.
- [38] A. Moncada-Pazos, AJ. Obaya, MF. Fraga, CG. Vilorio, G. Capella, M Gausachs, et al. "The ADAMTS12 metalloprotease gene is epigenetically silenced in tumor cells and transcriptionally activated in the stroma during progression of colon cancer". *J Cell Sci* 2009;122:2906–13.
- [39] Z. Li, W. Zhang, Y. Shao, C. Zhang, Q. Wu, H. Yang, et al. "Highresolution melting analysis of ADAMTS18 methylation levels in gastric, colorectal and pancreatic cancers", *Med Oncol* 2010;27:998–1004.
- [40] H. Jin, X.Wang, J. Ying , AH. Wong, H. Li, KY., et al. "Epigenetic identification of ADAMTS18 as a novel 16q23.1 tumor suppressor frequently silenced in esophageal, nasopharyngeal and multiple other carcinomas", *Oncogene* 2007; 26:7490–8.
- [41] S. Porter, SD. Scott, EM. Sassoon, MR. Williams, JL. Jones, AC. Girling, et al. "Dysregulated expression of adamalysin– thrombospondin genes in human breast carcinoma", *Clin Cancer Res* 2004;10:2429–40.
- [42] https://en.wikipedia.org/wiki/ADAMTS8#Clinical_significance
- [43] S. Porter, IM. Clark, L. Kevorkian, DR. Edwards. "The ADAMTS metalloproteinases". *Biochem J.* 2005;386(Pt 1):15– e27.

- [44] L. Wagstaff, R. Kelwick, J. Decock, DR. Edwards. ‘‘The roles of ADAMTS metalloproteinases in tumorigenesis and metastasis’’. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2011;16:p. 1861–72.
- [45] S.Porter, PN.Span, FC. Sweep, VC. Tjan-Heijnen, CJ.Pennington, TX. Pedersen, et al. ‘‘ADAMTS8 and ADAMTS15 expression predicts survival in human breast carcinoma’’. *Int J Cancer*. 2006;118(5):1241–7.Return to ref 83 in article
- [46] <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=ADAMTS8#products>
- [47] SA. Jones, BJ. Jenkins ‘‘Recent insights into targeting the IL-6 cytokine family in inflammatory diseases and cancer’’. *Nature reviews Immunology*. 2018;18:773-89
- [48] JF. Bazan ‘‘A novel family of growth factor receptors: a common binding domain in the growth hormone, prolactin, erythropoietin and IL-6 receptors, and the p75 IL-2 receptor beta-chain’’. *Biochemical and biophysical research communications*. 1989;164:788-95
- [49] S. Rose-John ‘‘Interleukin-6 Family Cytokines. Cold Spring Harbor perspectives in biology’’. 2018 10
- [50] Y. Luo , X. Wu , Z. Ma , W. Tan , L. Wang D. et al. Na ‘‘Expression of the novel adipokine C1qTNF-related protein 4 (CTRP4) suppresses colitis and colitis-associated colorectal cancer in mice. Cellular & molecular immunology’’. 2016;13:688-99
- [51] N. Yokoigawa , N. Takeuchi, M. Toda, M. Inoue , H. M. Kaibori, et al. ‘ Yanagida ‘‘Enhanced production of interleukin 6 in peripheral blood monocytes stimulated with mucins secreted into the bloodstream’’. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2005;11:6127-32
- [52] T. Kishimoto ‘‘IL-6: from its discovery to clinical applications’’. *Int Immunol*. 2010;22(5):347–352. doi:10.1093/intimm/dxq030 [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
- [53] S. Rose-John ‘‘ Interleukin-6 Family Cytokines. Cold Spring Harbor perspectives in biology’’. 2018 10
- [54] N. Prenissl, J. Lokau , S. Rose-John , J. Haybaeck , C. Garbers ‘‘ Therapeutic blockade of the interleukin-6 receptor (IL-6R) allows sIL-6R generation by proteolytic cleavage’’. *Cytokine*. 2019;114:1–5. doi:10.1016/j.cyto.2018.11.023 [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
- [55] P. Baran , S. Hansen, GH. Waetzig et al .’’The balance of interleukin (IL)-6, IL-6·soluble IL-6 receptor (sIL-6R), and IL-6·sIL-6R·sgp130 complexes allows simultaneous

classic and trans-signaling''. *J Biol Chem.*;293(18):6762–6775, 2018. doi:10.1074/jbc.RA117.001163

[56] MY. Taher , DM. Davies, J. Maher . ‘‘The role of the interleukin (IL)-6/IL-6 receptor axis in cancer. *Biochem Soc Trans*’’. 2018;46(6):1449–1462, 2018. doi:10.1042/BST20180136 [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]

[57] C. Becker, MC. Fantini, S Wirtz, et al. IL-6 signaling promotes tumor growth in colorectal cancer. *Cell Cycle*. 4(2):217–220, 2005. doi:10.4161/cc.4.2.1413 [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]

[58] M.Turano, F. Cammarota, F. Duraturo, F. Izzo, P. & M. De Rosa, ‘‘A Potential Role of IL-6/IL-6R in the Development and Management of Colon Cancer’’. *Membranes*, 11(5), 312 (2021) doi:10.3390/membranes11050312.

[59] Y. Luo , X. Wu , Z. Ma, W. Tan, L. Wang, Na. D, et al. ‘‘Expression of the novel adipokine C1qTNF-related protein 4 (CTRP4) suppresses colitis and colitis-associated colorectal cancer in mice’’. *Cellular & molecular immunology*. 2016; 13: 688-99.

[60] C. Heichler, K. Scheibe , A. Schmied , CI. Geppert , B. Schmid , S. Wirtz , et al. ‘‘STAT3 activation through IL-6/IL-11 in cancer-associated fibroblasts promotes colorectal tumour development and correlates with poor prognosis’’. *Gut*. 2019.

[61] F. Jiang , M. Liu , H. Wang, G. Shi, B. Chen, T. Chen, et al.’’ Wu Mei Wan attenuates CAC by regulating gut microbiota and the NF-kB/IL6-STAT3 signaling pathway. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*’’. 2020; 125: 109982.

[62] S. Gao, J. Hu, X. Wu, Z. Liang. ‘‘PMA treated THP-1-derived-IL-6 promotes EMT of SW48 through STAT3/ERK-dependent activation of Wnt/beta-catenin signaling pathway’’. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*. 2018; 108: 618-24.

[63] M. Rokavec, MG. Oner, H. Li, R. Jackstadt, L. Jiang, D. Lodygin, et al. ‘‘IL-6R/STAT3/miR-34a feedback loop promotes EMT-mediated colorectal cancer invasion and metastasis’’. *The Journal of clinical investigation*. 2014; 124: 1853-67.

[64] YY. Li, LL. Hsieh, RP. Tang, SK. Liao, KY. Yeh. ‘‘Interleukin-6 (IL-6) released by macrophages induces IL-6 secretion in the human colon cancer HT-29 cell line’’. *Human immunology*. 2009; 70: 151-8.

[65] K. Xu, Y. Zhan , Z. Yuan, Y. Qiu, H. Wang, G. Fan, et al. ‘‘Hypoxia Induces Drug Resistance in Colorectal Cancer through the HIF-1alpha/miR-338-5p/IL-6 Feedback

Loop''. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*. 2019; 27: 1810-24.

[66] T. Nagasaki , M. Hara , H. Nakanishi, H. Takahashi, M. Sato , H. Takeyama. "Interleukin-6 released by colon cancer-associated fibroblasts is critical for tumour angiogenesis: anti-interleukin-6 receptor antibody suppressed angiogenesis and inhibited tumour-stroma interaction''. *British journal of cancer*. 2014; 110: 469-78.

[67] https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/CCL247.aspx?geo_country=tr#history

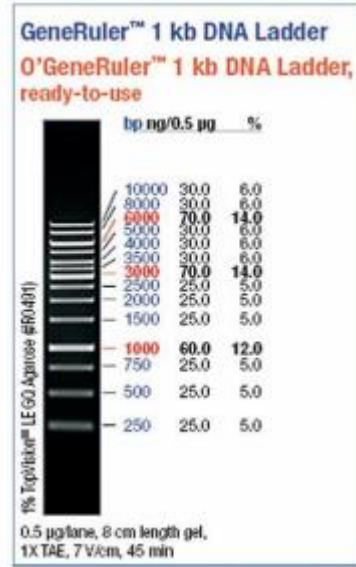
[68] Ashwani Rajput, et al."Characterization of HCT116 Human Colon Cancer Cells in an Orthotopic Model". *Journal of Surgical Research*. (15 June 2008). 147 (2): 276–281. doi:10.1016/j.jss.2007.04.021. PMID 17961596

[69] <https://www.atcc.org/products/ccl-247>

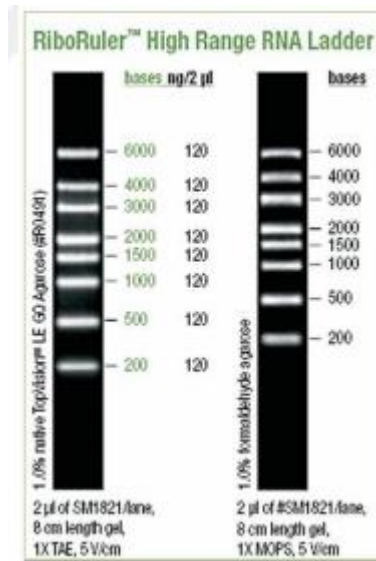
EKLER

EKLER

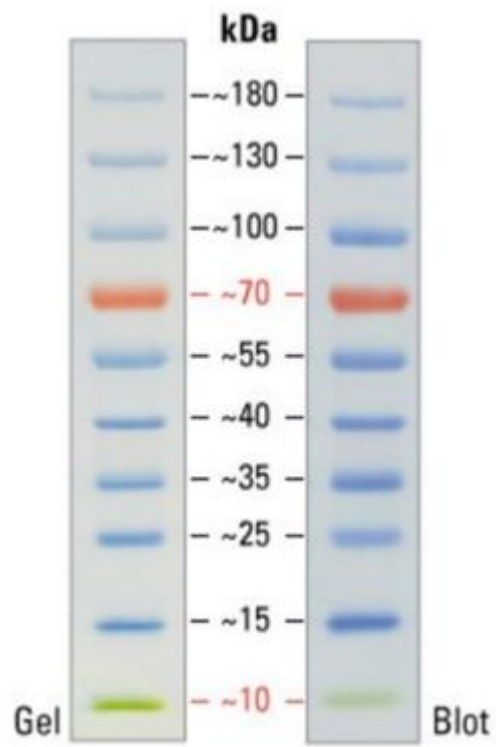
EK A: DNA marker



Şekil A.1: 1 kb DNA markeri



Şekil A.2: RNA markeri



EK B: Protein markerı

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı: NURİYE KÖTÜZ

Doğum tarihi ve yeri: 24.9.1996/AFYONKARAHİSAR

e-posta:nuriye956.01@gmail.com

Öğrenim Bilgileri

Derece	Okul/Program	Yıl
Y. Lisans	Balıkesir Üniversitesi/Moleküler Biyoloji ve Genetik	2022
Lisans	Uludağ Üniversitesi/Moleküler Biyoloji ve Genetik	2018
Lise	Balıkesir Cumhuriyet Anadolu Lisesi	2014

Yayın Listesi

Eğer tezden türetilen yayın var ise IEEE ve APA formatındaki ilgili yayının sonuna [Tezden türetilmiştir] ifadesi yazılmalıdır.