

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



HEPATOSELLÜLER KARSİNOMADA
TGF- β ' NİN PSMD4 GENİ ÜZERİNDE ETKİSİNİN BELİRLENMESİ

BURCU DONÇ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Jüri Üyeleri : Prof. Dr. FERAY KÖÇKAR (Tez Danışmanı)
Dr. Öğr. Üyesi NELİN HACIOĞLU
Dr. Öğr. Üyesi MELTEM ALPER

BALIKESİR, TEMMUZ - 2023

ETİK BEYAN

Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak tarafımda hazırlanan “**HEPATOSELLÜLER KARSİNOMDA TGF- β ’ NİN PSMD4 GENİ ÜZERİNDE 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.

Burcu DONÇ

ÖZET

**HEPATOSELLÜLER KARSİNOMADA
TGF- β ' NİN PSMD4 GENİ ÜZERİNDE ETKİSİNİN BELİRLENMESİ
YÜKSEK LİSANS TEZİ
BURCU DONÇ
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI
(TEZ DANIŞMANI: PROF. DR. FERAY KÖÇKAR)**

BALIKESİR, TEMMUZ - 2023

Hücrede yıkımı gerçekleştirilemeyen proteinler proteolitik yollar ile gerçekleştirilirler. Proteolitik yıkım yollarından biri olan proteozomlar ile yıkım ökaryot ve prokaryot hücreler için önemli bir görevi üstlenmektedir. 26S proteazomu ATPaz olmayan alt birim 4 olarak isimlendirilen PSMD4 geni 26S proteazomunun bir bileşenidir. PSMD4 geni pek çok farklı dokuda ifade edilmiştir. PSMD4 geninin hepatosellüler karsinomada yukarı regüle edildiği kanıtlanmıştır. Aynı zamanda kolon kanserinde yapılan çalışmalar ise sınırlı sayıdadır. Literatürde sınırlı olan bilgiler dahilinde Transforme Edici Büyüme Faktörü olarak bilinen TGF- β sitokininin Kolon Kanseri hücre hattı olan SW480 ve Hepatosellüler Karsinoma hücre hattı olan Hep3B hücrelerinde PSMD4 gen ifadesine olan etkileri incelenmiştir. TGF- β sitokini hem SW480 ve hemde hücre hattı olan Hep3B hücrelerinde PSMD4 gen ifadesini mRNA ve protein düzeyinde arttırmıştır. Sinyal yollarının belirlenmesi için MEK1 (MAP2K1), PD169316 (p38 MAPK İnhibitör), Wortmannin (PI3K İnhibitör), NF κ B İnhibitör, SP600125 (JNK İn.), SIS3 (SMAD3) inhibitörleri TGF- β ile uygulanmıştır. Buna göre TGF- β uygulaması Hep3B hücrelerinde PSMD4 gen ifadesini arttırmaktadır. Ancak incelenen MAPK, PI3K NF κ B ve smad yollarını hiç birisinin bu artıştan sorumlu olmadığı anlaşılmaktadır. Çünkü TGF- β sitokinin oluşturduğu aktivasyon sadece MEK1 inhibitörü ile geri dönmüştür. Bu durumda TGF- β 'nin PSMD4 gen ekspresyonu üzerine oluşturduğu cevap MAP kinaz yolu üzerinden ilerlediği anlaşılmaktadır.

ANAHTAR KELİMELER: Kolon Kanseri, PSMD4, 26S Proteazom, HCC, TGF- β

Bilim Kod / Kodları : 20326, 20610

Sayfa Sayısı : 49

ABSTRACT

DETERMINATION OF THE EFFECT OF TGF- B ON PSMD4 GENE IN HEPATOCELLULAR CARCINOMA

MSC THESIS

BURCU DONÇ

BALIKESİR UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE

MOLECULAR BIOLOGY AND GENETIC

(SUPERVISOR: PROF. DR. FERAY KÖÇKAR)

BALIKESİR, JULY - 2023

Proteins that cannot be degraded in the cell are realized by proteolytic pathways. Prosthetic destruction, one of the proteolytic destruction pathways, plays an important role in eukaryotic and prokaryotic cells. The PSMD4 gene, called 26S proteasome non-ATPase subunit 4, is a component of the 26S proteasome. The PSMD4 gene has been expressed in many different tissues. The PSMD4 gene has been proven to be upregulated in hepatocellular carcinoma. At the same time, studies on colon cancer are limited. Within the limited information in the literature, the effects of TGF- β cytokine, known as Transforming Growth Factor, on PSMD4 gene expression in Colon Cancer cell line SW480 and Hepatocellular Carcinoma cell line Hep3B cells were investigated. TGF- β cytokine increased PSMD4 gene expression at mRNA and protein levels in both SW480 and cell line Hep3B cells.

In order to determine the signaling pathways, MEKI (MAP2K1), PD169316 (p38b MAPK Inhibitor), Wortmannin (PI3K Inhibitor), NF κ B Inhibitor, SP600125 (JNK Inh.), SIS3 (SMAD3) inhibitors were administered with TGF- β . Accordingly, TGF- β administration increases PSMD4 gene expression in Hep3B cells. However, it is understood that none of the examined MAPK, PI3K NF κ B and smad pathways are responsible for this increase. Because the activation induced by TGF- β cytokine was reversed only with MEK1 inhibitor. In this case, it is understood that the response of TGF-B on PSMD4 gene expression proceeds through the MAP kinase pathway.

KEYWORDS: Colon Cancer, PSMD4, 26S Proteasome, HCC, TGF- β

Science Code / Codes : 20326, 20610

Page Number : 49

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
ŞEKİL LİSTESİ	v
SEMBOL LİSTESİ	vii
ÖNSÖZ	viii
1. GİRİŞ	1
1.1 Proteazom	1
1.1.1 20S ve 26S Proteazomlar	2
1.2 Ubikitinasyon ve Protein Yıkımı	3
1.3 PSMD4 (26S proteazomu ATPaz olmayan alt birim 4)	4
1.4 Hepatosellüler Karsinoma	8
1.5 Kolon Kanseri	9
1.6 TGF- β Sitokini	10
2. ÇALIŞMANIN AMACI	13
3. MATERYAL METOD	14
3.1 Materyal	14
3.1.1 Tez Çalışmasında Kullanılan Kimyasal Malzemeler Listesi	14
3.1.1.1 Hücre Kültürü İçin Kullanılan Sarf Malzemeler	14
3.1.1.2 RNA Eldesi ve Kontrolü İçin Kullanılan Sarf Malzemeler	15
3.1.1.3 Protein Çalışmaları için Kullanılan Malzemeler	15
3.1.2 Tez Çalışmasında Kullanılan Cihazların Listesi	16
3.2 METOD	17
3.2.1 Laboratuvar Ortamının ve Malzemelerinin Sterilizasyonu	17
3.2.2 Hücre Kültürü Çalışmaları	17
3.2.2.1 Hücre Kültüründe Kullanılan Malzemelerin Sterilizasyonu ve Hazırlanması	17
3.2.2.2 Hücrelerin Besiyerinin Hazırlanması, Hücre Açılması-Dondurulması	18
3.2.2.3 Hücreler ile Planlanan Deneylerin Tasarlanması	19
3.2.3 RNA Tabanlı Tekniklerin Uygulanması	20
3.2.3.1 RNA İzolasyonu ve RNA Kantitatif Analizi	20
3.2.3.3 cDNA Elde Edilmesi ve cDNA Kontrolü için PCR	21
3.2.3.4 Agaroz Jel Elektroforezi	23
3.2.3.5 Kantitatif Real-Time PCR (qRT-PCR)	24
3.2.4 Protein Tabanlı Teknikler	24
3.2.4.1 Western Blot Analizi	24
3.2.4.1.1 Western Blot Deneyinde Kullanılan Solüsyonlar	25
3.2.4.2 Western Blot - PVDF Membrana Protein Transferi	26
3.2.4.3 Membrana Aktarılan Proteinlerin Antikorlanması	27
3.2.4.4 İstatistiksel Analiz Programları ile Western Blot Analizi	27
4. BULGULAR	28
4.1 Hep3B Hücre Hattında TGF- β Sitokinin PSMD4 Genine Etkisi	28
4.1.1 TGF- β Sitokinin PSMD4 Geni Üzerindeki Etkisinin mRNA Düzeyinde Belirlenmesi	28

4.1.2 TGF- β Sitokinin PSMD4 Geni Üzerindeki Etkisinin Protein Düzeyinde Belirlenmesi.....	30
4.1.3 Hep3B Hücre Hattında PSMD4 Genindeki TGF- β Sitokin Cevabında Hücre İçi Sinyal Yolaklarının Belirlenmesi.....	31
4.2 SW480 Hücre Hattında TGF- β Sitokinin PSMD4 Genine Etkisi.....	34
4.2.1 TGF- β Sitokinin PSMD4 Geni Üzerindeki Etkisinin mRNA Düzeyinde Belirlenmesi.....	34
4.2.2 TGF- β Sitokinin PSMD4 Geni Üzerindeki Etkisinin Protein Düzeyinde Belirlenmesi.....	36
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	40
6. KAYNAKLAR (APA)	42
EK B: Açıklama	48
ÖZGEÇMİŞ	49

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1.1: Proteazomun yapısı.....	2
Şekil 1.2: 26S Proteazomunun yapısı.....	3
Şekil 1.3: Proteazomu hedefleyen proteinlerin ubikitinasyonu.....	3
Şekil 1.4: RPN10 (PSMD4) Proteazom Görüntüsü.....	5
Şekil 1.5: TGF-β'nın Pleiotropik Etkileri.....	10
Şekil 1.6: TGF- β Sitokinin Mekanizması.....	11
Şekil 2.1: Tez Çalışma Planı.....	12
Şekil 4.1: TGF-β uygulanmış Hep3B hücrelerinden izole edilen RNA örneklerinin RNA jel elektroforezi görüntüsü.....	27
Şekil 4.2: İzole edilen RNA'lardan elde edilen komplementer DNA'nın kontrolü için Hβ-2 primerleri ile gerçekleştirilen RT-PCR sonrası agaroz jel elektroforezinde yürütme sonra UV görüntüntüsü.....	28
Şekil 4.3: PSMD4 geninin TGF-β uygulanmış Hep3B hücrelerinde ekspresyon seviyeleri.....	28
Şekil 4.4: TGF-β uygulan Hep3B hücrelerinde western analizi sonucu oluşan membran görüntüsü.....	29
Şekil 4.5: TGF-β uygulan Hep3B hücrelerinde PSMD4 geninin protein ekspresyonu.....	30
Şekil 4.6: İnhibitör uygulanmış Hep3B hücrelerinden izole edilen RNA'ların jel görüntüsü.....	31
Şekil 4.7: İnhibitör uygulanan Hep3B hücrelerinin RNA'larından elde edilen komplementer DNA'nın kontrolü için Hβ-2 primerleri ile gerçekleştirilen sgRT-PCR sonrası agaroz jel elektroforezinde yürütme sonra UV görüntüntüsü.....	31
Şekil 4.8: Sinyal yollarının tespiti için uygulanan inhibitörlerin Hep3B hücrelerindeki PSMD4 geninin mRNA seviyesinde ekspresyon seviyeleri.....	32
Şekil 4.9: İzole edilen RNA'lardan elde edilen komplementer DNA'nın kontrolü için Hβ-2 primerleri ile gerçekleştirilen RT-PCR sonrası agaroz jel elektroforezinde yürütme sonra UV görüntüntüsü.....	33
Şekil 4.10: PSMD4 geninin TGF-β uygulanmış SW480 hücrelerinde ekspresyon seviyeleri.....	35
Şekil 4.11: TGF-β uygulan SW480 hücrelerinde western analizi sonucu oluşan membran görüntüsü.....	34
Şekil 4.12: TGF-β uygulan SW480 hücrelerinde PSMD4 geninin protein ekspresyonu .	35
Şekil 4.13: Sinyal yollarının tespiti için uygulanan inhibitörlerin SW480 hücrelerindeki PSMD4 geninin western sonucu membran görüntüsü.....	36
Şekil 4.14: Sinyal yollarının tespiti için uygulanan inhibitörlerin SW480 hücrelerindeki PSMD4 geninin protein seviyesinde ekspresyon seviyeleri.....	37
Şekil 4.15: Sinyal yollarının tespiti için uygulanan inhibitörlerin SW480 hücrelerindeki PSMD4 geninin mRNA seviyesinde ekspresyon seviyeleri.....	37
Şekil A.1: Protein Deneylerinde Kullanılan Büyüklük Belirteci.....	47
Şekil A.2: DNA Deneylerinde Kullanılan Büyüklük Belirteci.....	47

TABLO LİSTESİ

	<u>Sayfa</u>
Tablo 3.1.1.1: Hücre Deneplerinde Kullanılan Sarf Malzemeler	1
Tablo 3.1.1.2: DNA Çalışmalarında Kullanılan Sarf Malzemeler.....	15
Tablo 3.2.3.3.1: Komplementer DNA PCR'ı İçin Kullanılan Malzemeler.....	22
Tablo 3.2.3.3.2: H β -2 PCR'ı İçin Kullanılan Malzemeler.....	24
Tablo 3.2.4.1.1: Western Blot Deneyi İçin Kullanılan Solüsyonlar ve Miktarları.....	25

SEMBOL LİSTESİ

ATP	: Adenozin Trifosfat
BSA	: Bovine Serum Albumine
DEPC	: Dietilpirokarbonat
DMEM	: Dulbecco Modified Eagle's Medium
dNTP	: Deoskiribonükleotidtrifosfat
Et-Br	: Etidyum Bromür
FBS	: Fetal Bovine Serum
HCC	: Hepatosellüler Karsinoma
kDA	: Kilodalton
mL	: Mililitre
PBS	: Phosphate Buffered Salin
PSMD4	: 26S Proteazomu ATPaz Olmayan Alt Birimi
RNA	: Ribonükleik Asit
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat
TGF	: Transforme Edici Büyüme Faktörü
UPS	: Ubikitin Proteazom Sistemi
µl	: Mikrolitre

ÖNSÖZ

Lisans ve yüksek lisans eğitimlerim boyunca çıkmaza girdiğimi düşündüğüm her an bir yol daha olduğunu gösteren, her anlamda yanımda olan, tecrübeleri ile cesaret veren, hep sevgi ile yaklaşan, pes etmemeyi öğreten, bu yolda bana ışık olan sayın hocam ve danışmanım Prof. Dr. Feray KÖÇKAR'a,

Bilgileri ve tecrübeleri ile desteklerini her zaman hissettiğim hocalarım Doç. Dr. Sümeyye AYDOĞAN TÜRKÖĞLU ve Doç. Dr. Hatice YILDIRIM'a,

Bütün lisans ve yüksek lisans hayatım boyunca sadece bilim yolunda değil manevi anlamda da desteğini esirgemeyen, her zaman yanımda hissettiğim, zaman zaman birlikte üzülp birlikte güldüğümüz, yeri geldiğinde problemleri birlikte çözmeye çalıştığımız, bu süreçte ilerlememe destek olan canım hocalarım Dr. Öğr. Üy. Nelin HACIOĞLU ve Doç. Dr. Esra TOKAY'a,

Her zaman yanyana olduğum, her kararında arkamda durduğunu bildiğim, birlikte çalışmaktan çok keyif aldığım, üzüntümüzü sevincimizi birlikte yaşadığımız, kardeş gibi hissettiren Burcu EFE DAŞKAN'a ve Berivan TÜKEN'e,

Laboratuvarda sırt sırta çalıştığım bütün ekip arkadaşlarıma teşekkür ederim.

En büyük teşekkürüm bana olan inancını hiçbir zaman kaybetmeyen canım aileme.. Bu süreçte her şeyiyle destek olan, kendimi hep güvende ve sevgi dolu hissettiren, pes etmemem için elinde gelen bütün çabayı ve desteği sağlayan canım annem Belgin DONÇ'a, canım babam Cahit DONÇ'a, kardeşim Berkan DONÇ'a, abim Ali Burhan DONÇ ve ablam Kamile DONÇ'a sonsuz teşekkür ederim.

1. GİRİŞ

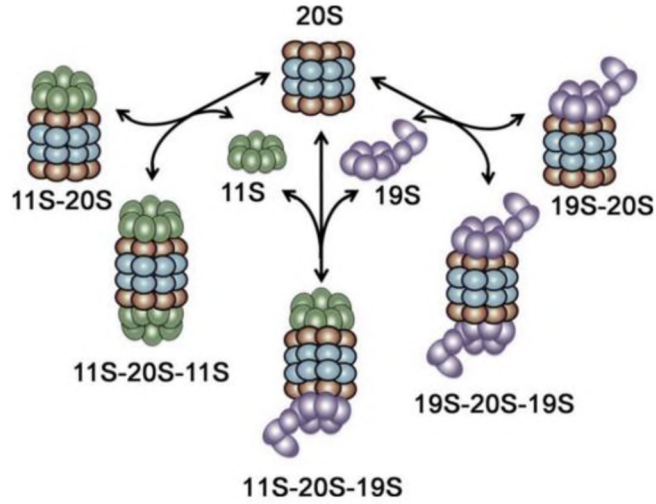
1.1 Proteazom

Hücrede bulunan çoğu protein görevini bitirdikten sonra yıkılması aşamasına geçer. Yaşamını tamamlayan ama yıkılamayan proteinler, hücrelerde hasara neden olmaktadır (Lodish, vd., 2004). Ökaryotik hücreler, denatüre proteinleri veya yanlış katlanmış, konsantrasyonunun azaltılması gereken hücre tarafından alınan hücre dışı proteinleri ve normal proteinleri parçalamak için birden fazla proteolitik yola sahiptir. Protein yıkım yollarından olan enzimlerle bozunma, asidik iç kısmı hidrolitik enzimlerle dolu olan zarla çevrili organellerin lizozomlardaki enzimler ile yıkılmasıdır (Adams, vd., 2003).

Bir diğer hücre içi protein yıkım yolu proteazom aracılığı ile gerçekleşmektedir. Proteazomların Ökaryot ve Prokaryot hücrelerde bulunan protein yıkımında önemli bir göreve sahip bilinmektedir (Lodish, vd., 2004). Proteazom birden çok alt üniteye sahip enzim kompleksidir. Proteazomlar apoptosis proteinlerinin düzenlenmesinde ve hücre döngüsünün ilerlemesinde önemli bir rol oynadığından dolayı kanser tedavisinde odak noktası olmuştur (Adams, vd., 2003). Proteazomlar, ökaryotik hücrelerde fazla miktarda bulunmaktadır ve lizozomal olmayan bir yolda ATP/ubikitin bağımlı bir süreçte peptitleri parçalar.

Proteazomlar çoğu bakteri türünde, ökaryot canlılarda ve arkealarda bulunmaktadır ve ökaryot yapılı canlılarda sitoplazma ve çekirdekte bulunur (Peters, vd., 1994). Ökaryotik proteazomlar, karakteristik alt birim kümelerine sahip alışılmadık derecede büyük protein kompleksleridir ve sedimantasyon katsayılarına göre, 20S ve 26S'lik iki izoform halinde sınıflandırılmaktadır.

Memelilerde, yaklaşık 2000 kDa molekül ağırlığına sahip olan sitozolik 26S proteazom bulunmaktadır. 26S proteazom merkezini iki adet 19S düzenleyici alt ünite ve 20S kor partikülü oluşturmaktadır. Proteinler yıkılmak için iki ucu açık olan 20S kor partikül bölgelerinden girmektedir. 20S proteazomun iki uç tearaflarına bağlı olarak bulunan 19S düzenleyici alt ünite, ubikitin bağlanan kısım ve ATPase aktif bölgeler içermektedir (Şekil 1.1) (Wang ve Maldonado, 2006).

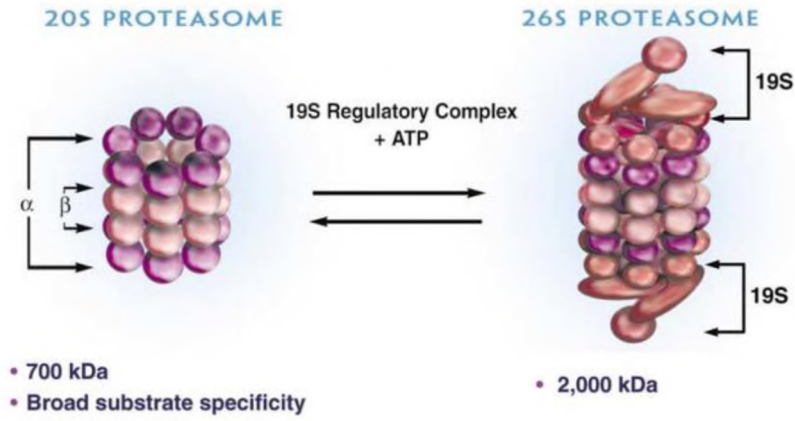


Şekil 1.1: Proteazomun yapısı (Smith, vd., 2007)

20S proteazoma 11S kapaklar bağlı olan immün proteazomun ana görevinin hidrofobik C-ucu ile oligo peptid ürettiği bilinmektedir. CD8+ T hücreleri bilinmeyen antijenleri tanır ve hücreler yıkılır. İmmün proteazom yapısal proteazom olarak da görev yapmaktadır. Ayrıca sadece ATP bağımsız yol ile substrat yıkımı gerçekleştirilir. Proteazomal yıkım sırasında; 20S kor partikülünün proteolitik üniteleri olan $\beta 5$, $\beta 2$, $\beta 1$ gibi indüklenebilir form $i\beta 5$, $i\beta 2$, $i\beta 1$ kullanılmaktadır (Ustrell, vd., 2002). Hibrit proteazom da, 11S ve 19S regülator kompleks 20S kor partiküle bağlıdır. ATP bağımsız ve ATP bağımlı yol ile gerçekleşen protein yıkımının çalışma prensibi tam olarak bilinmemektedir (Ustrell, vd., 2002).

1.1.1 20S ve 26S Proteazomlar

Proteazomlar hücrelerde 26S ve 20S formunda bulunmaktadır. 20S formu multikatalitik proteinazdır. 20S formunun yaklaşık olarak 750 kDa ağırlığında ve 26S formunun ise 2000 kDa ağırlığında olduğu bilinmektedir (Şekil 1.2) (Tanaka vd.,1986, Yoshiruma, vd., 1993). 20S proteazomu olduğu bilinen dört protein katmanı ile daha ince bir merkezi yapıya bağlı iki dikdörtgen yapıdan oluşan 26S proteazomunun şekil bakımından dambılla benzemektedir (Peters, 1994, Lupas, vd., 1993). 20S proteazomu şekil bakımından incelendiğinde, 21-32 kDa ağırlığında bir dizi küçük alt birimden, merkeze zıt yönlerde bağlı 25-110 kDa ağırlığında çoklu alt birimden oluşan ve ek olarak düzenleyici iki büyük V şekline benzeyen terminal bölgelerden oluşmaktadır (Tanaka ve Tsurumi, 1997).

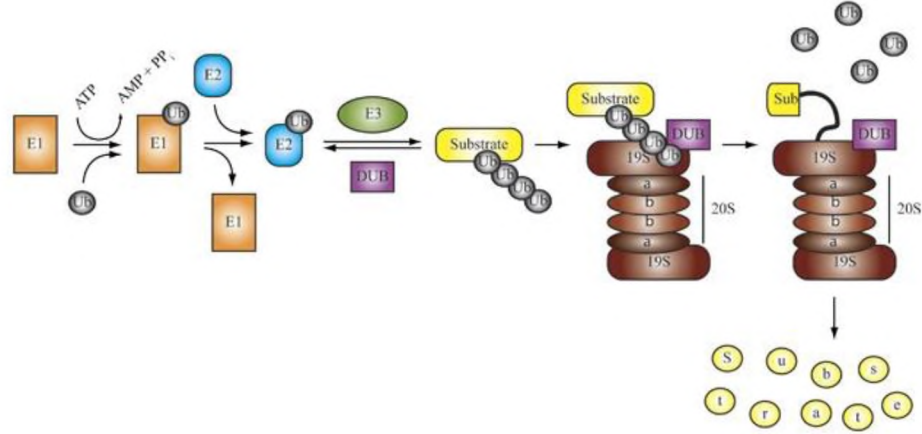


Şekil 1.2: 26S Proteazomunun Yapısı (Zwickl vd., 1999)

ATPaz olmayan alt birimlerden birisi olan S5a, ubiquitin-protein konjugatlarına spesifik olarak bağlanmaktadır. S5a 26S proteazomu tarafından seçici yıkım için ubiquitin bağlı proteinlerin tanınmasına yardımcı olan çoklu ubiquitin reseptörüdür (Ferrell, vd., 1996). Hedef proteinler için tanıma modülleri içeren, düzenleyici işlevlere sahip, molekül ağırlığı 30-110 kDa ağırlığında olan Terminal 22S alt bölgesi birden fazla bileşenden oluşmaktadır. 20S proteazomu ve 22S düzenleyici alt birim kompleksinden oluşan 26S proteazomu çok moleküllü yapıdan oluşmaktadır (Tanahashi, vd., 1993).

1.2 Ubikitinasyon ve Protein Yıkımı

Proteinin proteazom tarafından tanınmasını hedef proteine bağlanan ubiquitin sağlamaktadır. Daha sonra hedef substratlara ubiquitin-aktive edici enzim (E1) ATP içeren reaksiyon ile yıkılması hedeflenen proteine ubiquitin eklenerek ile gerçekleşmektedir. Ardından ubiquitin-konjuge edici enzime (E2) transfer edilen ubiquitini bağlaması ile ubiquitin-protein ligazı (E3), ubiquitinini hedef substrata aktarılmasına yardım etmektedir (Şekil 1.3) (Pickart, 2001).



Şekil 1.3: Proteazomu hedefleyen proteinlerin ubikitasyonu (Eldridge ve Brien 2010)

26S proteazomu tarafından tanınmadan ve parçalanmadan önce proteinlere çoklu ubikuitin molekülleri bağlanır; bozunmadan önce, ubikuitin zinciri çıkarılır ve serbest ubikuitin moleküllerinin geri dönüştürülmesine izin verilir (Pickart, 2001).

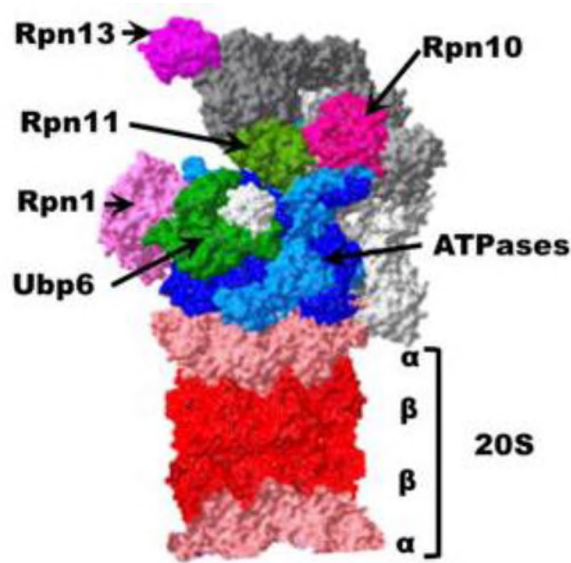
Hücre apoptoz ve proliferasyonunda rol oynayan anahtar moleküller dahil olmak üzere hücre içi proteinin bozulmasından sorumlu birincil sinyal olan Ubiquitin-proteasome sistemi (UPS), kanser tedavisi için hedef olmaktadır ve aynı zamanda tümör ilerlemesinde protein homeostazının düzenlenmesinde merkezi rol oynamaktadır. (Cheng, vd., 2018, Yeh, vd., 2018). 26S proteazomunun UPS’de görevi ise proteinlerin tanınması ve parçalanmasından sorumludur. PSMD4 geni ise poliübikitinlenmiş substratların proteasomal bozunmasına ve proteazoma substrat dağıtımını sağlamaktadır (Husnjak, vd., 2008).

1.3 PSMD4 (26S proteazomu ATPaz olmayan alt birim 4)

Literatürde 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit4 (PSMD4); 26s proteasome regulatory subunit 5, RPN10 homolog, S5a/antisekretory faktör 1, Angiocidin (Angiosidin), Antisekretory factor 1, Multubikitin chain binding protein olarak da birçok isim ile bulunabilmektedir. İnsan genomunda 41 kDa molekül ağırlığında protein kodlayan PSMD4 geni 1. kromozom uzun (q) kolunun 21.3 bölgesinde bulunmaktadır. PSMD4 ubikuitin ile etkileşime giren motifler aracılığıyla bir ubikuitin reseptör alt birimi olarak hareket eder ve

yıkım için ubikuitin-konjugatlarını seçer. Daha uzun poliubikuitin zincirleri için tercih edilen bir seçicilik göstermektedir (Fejzo, vd., 2017).

Ayrıca PSMD4, her yerde bulunan proteinlerin ATP'ye bağlı bozunmasında yer alan multiprotein kompleksi olan 26S proteazomunun bir bileşenidir. Proteazom, hücre döngüsü ilerlemesi, DNA hasar onarımı ve apoptoz dahil olmak üzere çok sayıda hücresel döngüye katılmaktadır.



Şekil 1.4: RPN10 (PSMD4) Proteazom Görüntüsü (Collins ve Goldberg, 2017)

PSMD4 geninin mRNA ekspresyonu

- THP-1, akut monositik lösemi hücre hattında gösterildi;
- MCF-7, meme kanseri hücre dizisi;
- H1299, insan küçük hücreli olmayan akciğer karsinomu hücre dizisi;
- HeLa, rahim ağzı kanseri hücreleri;
- Colo320, Dukes tip C, kolorektal adenokarsinom hücre dizisi;
- LoVo, Kolorektal Adenokarsinom hücrelerinde tanımlanmıştır (Türkoğlu, vd., 2020).

PSMD4'ün aşırı ekspresyonu insan kolon kanseri hücrelerinde bulunmuştur (Lin, vd., 2016, Cheng, vd., 2018). PSMD4'ün meme kanserinde yükselmesi, zayıf hayatta kalma ile ilişkilidir (Fejzo, vd., 2017). Hepatoselüler karsinom (HCC) hücrelerinde PTEN/Akt yollarının düzenlenmesi yoluyla hücre proliferasyonunu arttırır (Jiang, vd., 1995). HCC hastalarında PSMD4 ekspresyonu ile HIF1 α ekspresyonu arasında önemli bir korelasyon bulunmuştur. Bu iki parametre, HCC'de güçlü bir prognoz göstergesidir (Jiang, vd., 1995). PSMD4'ün inhibe edilmesi, hepatoselüler karsinomun tümör oluşumunu bloke eder. HCC'de hücre proliferasyonunun azaltılması, PSMD4'ün susturulması ile gerçekleşmektedir (Türkoğlu, vd., 2020). PSMD4 geni anjiyosidin ve ASF (antisekretuar faktör) kodlamaktadır.

SiRNA kullanılarak, endojen olarak eksprese edilen anjiyosidin, HepG2 hücrelerinde inhibisyonda başarısızdır (Guan, vd., 2013). Lösemide, PSMD4, IL-6 ile bağlanma yoluyla akut monositik lösemi farklılaşmasını indükler (Wang, 2014). Göğüs kanserinde, PSMD4'ün yükselmesi, zayıf sağkalım ile ilişkilidir (Fejzo, vd., 2017). PSMD4'ün ilk olarak 2002'de orta derecede farklılaşmış HCC'de yukarı regüle edildiği belirtilmiş olmasına rağmen (Midorikawa, vd., 2002), PSMD4'ün HCC'deki gerçek işlevi belirsizliğini koruyor (Türkoğlu, vd., 2020).

Lewitzki ve arkadaşlarının 2006 yılında yaptığı bir çalışmada PSMD4'ün (-1200/+348) promotor parçasını klonlamışlardır ve bu promotor bölgesine bağlanan transkripsiyon faktörlerini incelemiştir. Bu çalışmalar sonucunda WNT sinyal yolağında görev yapan Tcf/Lef1 faktörünün bağlanması dikkat çekici olmuştur. p53 ve Hif1 α (-71/-51) transkripsiyon faktörlerinin promotere bağlandığını protein deneyleri ile göstermişlerdi. Bu çalışma sonucunda; β -catenin/Lef1 sinyal yolağında 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit4'ün yeni gen sayılabileceği sonucuna varılmıştır (Lewitzki, vd., 2006).

Guan ve arkadaşları yaptıkları çalışmalar sonucunda, düşük anjiosidin proteinin karaciğer kanseri hücre büyümesinde anahtar bir rol oynadığını ve HepG2 hücrelerinde düşük hücre proliferasyonuna neden olduğunu göstermiştir (Guan, vd., 2013).

Chai ve arkadaşları 2019 yılında PSMD4'ün HCC doku ve hücrelerinde aşırı eksprese edildiğini bulmuştur. PSMD4'ün çıkarılması, *in vitro* hücre proliferasyonunu ve *in vivo* tümör büyümesini önemli ölçüde bastırırken hücre apoptozunu teşvik etmektedir (Chai, vd., 2019).

Cheng ve arkadaşları yaptığı çalışmalar sonucunda Nrf2'ye bağımlı PSMD4 ekspresyonunun, tümör nekroz faktörü ile ilişkili apoptozu indükleyen ligandlar tarafından tetiklenen apoptozdan koruma sağladığını kanıtlamıştır. Nrf2 aracılı PSMD4 ekspresyonu, ağırlıklı olarak, p53'ün PSMD4 aracılı bozunması nedeniyle CRM1 yükselmesi ile Nrf2'nin artan sitoplazmik lokalizasyonu yoluyla gerçekleşir (Cheng, vd., 2018).

Michal ve arkadaşlarının 2018 yılında yaptığı çalışmada ilk önce PSMD4'ün EC dokularındaki ifadesini araştırılmıştır. Veriler, PSMD4'ün EC dokularında kontrol dokularına kıyasla belirgin şekilde arttığını göstermiştir. Devam eden çalışmada ise PSMD4'ün ER stres kaynaklı hücre apoptozunu baskıladığını göstermiştir ve bu, PSMD4'ün EC'de onkojenik bir rolü olduğunu düşündürmüştür (Michal, vd., 2018).

Türkoğlu ve arkadaşları PSMD4 ekspresyonu, osteoblastik kanser hücrelerinde, pankreas karsinoma hücrelerinde, serviks kanser hücrelerinde, meme kanseri hücrelerinde, kolon kanseri hücrelerinde, hepatoselüler kanser hücrelerinde, prostat kanseri hücrelerinde ve sağlıklı hücrelerde belirlemişlerdir. Araştırılan hücre dizileri arasında, PSMD4 mRNA'sı en çok PC-3 ve HUVEC hücre dizisinde bulunmuştur. Benzer bir prostat modeli olarak DU-145, PC-3'ten daha düşük ekspresyon seviyesine sahip olduğu görülmüştür. PC-3 hücreleri yüksek metastatik potansiyele sahipken DU-145 hücrelerinin orta düzeyde metastatik potansiyele sahip olduğu bulunmuştur (Türkoğlu, vd., 2020).

Huang ve arkadaşlarının 2021 yılında yaptığı çalışmalar sonucunda Rpn10'un aşırı ekspresyonunun berrak hücreli renal hücreli karsinomda (ccRCC) hücre çoğalmasını ve migrasyonu arttırırken, Rpn10 ifadesinin susturulması, ccRCC hücrelerinde hücre proliferasyonunun azalmasına neden olmuştur. Rpn10'un yıkılması, *in vivo* olarak tümör büyümesini ve hücre çoğalmasını inhibe ettiğini bulmuşlardır (Huang, vd., 2021).

Du ve arkadaşlarının proteazom inhibisyonu ile ilgili yaptığı çalışmada, multipl miyelomda (MM) yaygın bir terapötik strateji olduğundan, Rpn10'u araştırmışlar ve normal plazma hücrelerine kıyasla MM hücrelerinde yüksek oranda eksprese edildiği bulunmuştur. Rpn10 seviyelerinin, MM'li hastalarda genel sağkalım ile ters orantılı kanıtlanmıştır (Du, vd., 2023).

1.4 Hepatosellüler Karsinoma

Kanser bütün dünyada görülen, vücudun rastgele bölgesinde ortaya çıkabilen, önemi sürekli artan sağlık ve yaşam sorunudur (Özensoy, 2006). Kanser olarak adlandırılan karsinom, bir organın veya dokunun kontrolsüz çoğalmaya başlamasıyla meydana gelen hastalıkların tamamı için kullanılan kavramdır.

Primer karaciğer kanseri genel olarak altıncı en sık görülen altıncı kanserdir ve dünya çapında en sık görülen ikinci kanser mortalitesi sebebidir (Ferlay, vd., 2012, Jemal, vd., 2011). HCC, karaciğer parankimi içeren hepatositlerden kaynaklanır. Hepatosellüler karsinom da görülen en büyük risk sirozdur. Ülkemizde insanların siroz olmasının en sık ve en önemli iki nedeni alkol ve viral hepatitler (HBV, HCV) dir (Fattovich, vd., 2004).

Hepatoma riskini arttıran diğer faktörler şu şekildedir; cinsiyetin erkek olması, alkolden bağımsız karaciğer yağlanması, diyabetes mellitus, hemokromatozis, sigara kullanımı ve alfa-1-antitripsin eksikliğidir. Karaciğerdeki rejenerasyon hepatosellüler karsinom gelişimindeki en önemli olay olarak kabul edilmektedir ve etken ne olursa olsun karaciğerde ilk olarak inflamasyon görülür. İnflamasyondan sonra ilk sırada nekrozis ikinci sırada fibrozis ve son olarak rejenerasyon gelişir. Sirozun en önemli patofizyolojik göstergesi fibrozis ve rejenerasyondur (Bosch, vd., 2004).

Hepatosellüler karsinoma gelişimi, farklılaşma, apoptoz, hücre proliferasyonu, motilite, ve normal kök hücre homeostazında önemli rol oynayan TGF- β sinyal yolundaki değişikliklerle ilişkilidir (Zheng, vd., 2008).

1.5 Kolon Kanseri

Dünya çağında en yaygın üçüncü tip olarak görülen kolon ve rektum kanseri ekonomik olarak gelişmiş popülasyonların hastalığıdır (Parkin, 2002, Ferlay, vd., 2002). Avrupa'da Kolon ve Rektum kanseri cinsiyet farketmeksizin en sık görülen ikinci kanser türüdür (Ferlay, vd., 1999). Kolon kanserli hastaların yaklaşık %70'i 65 yaşın üzerindedir. Kolon kanseri 45 yaşın altında yılda 100.000'de 2 ihtimalle görülmektedir. Kolorektal kanserde vakaların sadece %5'i kalıtsaldır ve en sık olarak sporadik olarak ortaya çıkar (Kwak ve Chung, 2007). Kolon kanseri, sindirim sisteminin son bölgesi olan kalın bağırsakta gözlenirken rektal kanser ise kolonun son bölgesinde gözlenmektedir. İkisi birlikte kolorektal kanser olarak adlandırılmaktadır (Ricchi, vd., 2003).

Kolorektal karsinom gelişiminde sadece genetik faktörler rol almamaktadır. Çevresel faktörlerde kolorektal kanser gelişiminde rol oynamaktadır (Kumar, vd., 2008). Adenomlar, destekleyici stroma içeren ve aynı zamanda displastik kalın bağırsak epiteli içeren yi huylu tümörlerdir ve kolon kanserinin oluşumu için en büyük rolü üstlenmektedirler (Rosai ve Ackermans, 2004).

Kolon kanseri kalıtsal sendromlar ve sporadik sendromlar olarak sınıflandırılmaktadır. Kalıtsal sendromlarda ise "Ailesel Polipozis Sendromları (FAP)" ve "Kalıtsal Polipsiz Kolorektal Kanseri (HNPCC)" şeklinde ayrılmaktadır (Kumar, vd., 2008). FAP, otozomal dominant geçişli nadir görülen hastalıktır. Malign transformasyon potansiyelleri nedeniyle kolorektal kanserlerin moleküler temellerini ortaya koymada anahtar rol oynamaktadır. Görülen tüm kolon kanserlerinin yaklaşık %5'i FAP kaynaklıdır. FAP, Adenomatöz polipozis koli (APC) geni mutasyonundan kaynaklanmaktadır (Spirio, vd., 1993, Meyskens, vd., 2008).

Kalıtısal Polipsiz Kolorektal Kanser (HNPCC) Lynch sendromu olarak bilinmektedir. Proksimal kolonda gelişen Lynch sendromu otozomal dominant olarak kalıtılmaktadır (Hardy, vd., 2004). Hastalığın erken yaşta ortaya çıkması ve başta kolonun sağ tarafına yerleşmesi HNPCC’i sporadik kanserlerden ayıran özellik olarak gösterilmektedir (Christine, vd., 2005).

Sporadik sendromlarda ise kolon kanserlerinin %70’den fazlası adenoma poliplerden, %90’dan fazlası ise adenokarsinomlardan meydana gelmektedir (Hardy, vd., 2004). %80 oranda APC gen mutasyonu içeren Adenomatöz polipler sitoplazmadaki β -katenini transfosforile etmektedir. SiklinD1 ve c-myc aktive hale gelmesinin sebebi APC geninde meydana gelen mutasyon β -kateninin çekirdek içine transforme olması olduğu bilinmektedir (Houlston, 2001).

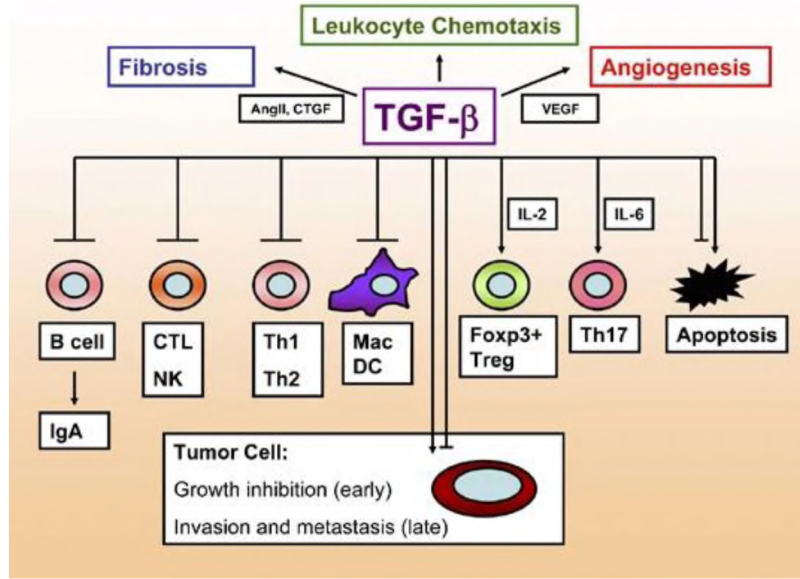
1.6 TGF- β Sitokini

Sitokinler hücrel düzenleyici proteinlerdir. Aynı zamanda özel hücreler tarafından salgılanırlar ve çeşitli uyarılara karşı cevap verirler. Hedeflenen hücrelerin davranışlarını etkilerler. Sitokin hücre yüzey reseptörüne bağlanır ve hücre içi sinyal yolağının fonksiyonunun değişmesine sebep olur. Bu değişimler hücrenin kendi etkilerinin değişmesi veya diğer moleküllerde hücre yüzey reseptör sayısının artması şeklinde gerçekleşebilir (Koleske, ve Young, 1994).

İnsanlarda tümör oluşumu çoklu faktörleri içeren ve genellikle uzun bir süre boyunca meydana gelen karmaşık bir süreçtir. İnsan kanser hücreleri, çoğu normal hücrenin sahip olmadığı, büyüme inhibisyonuna dirençli hale gelme, büyüme faktörlerine bağımlı olmadan çoğalma yeteneği dahil olmak üzere çeşitli yetenekler kazanmaktadır.

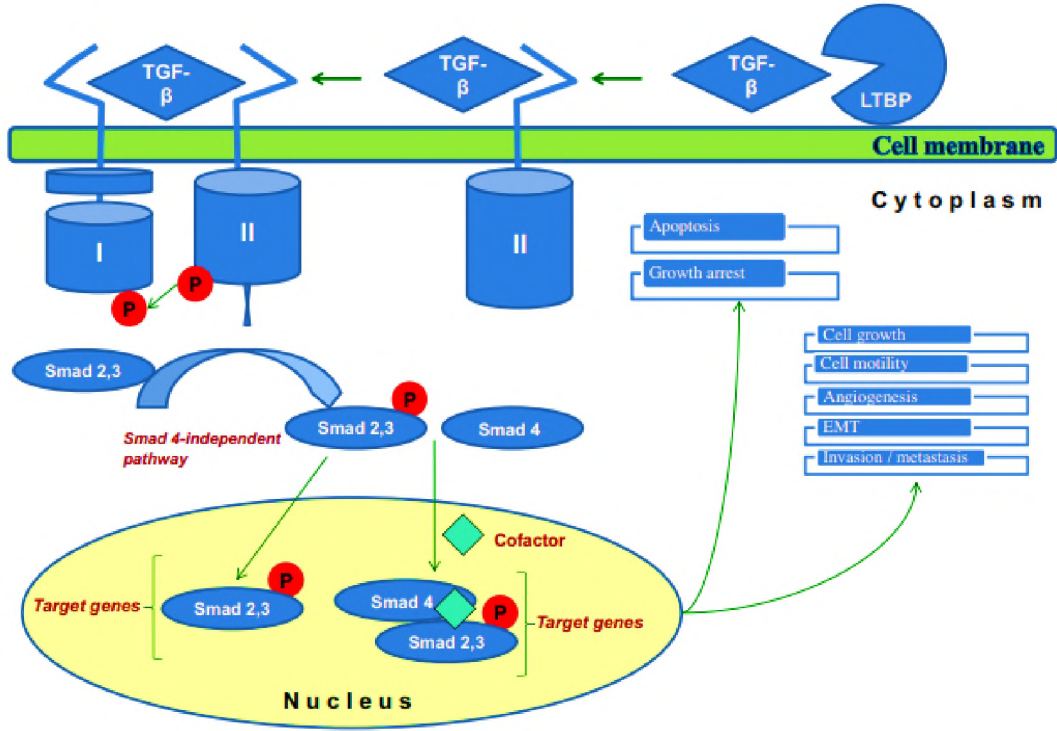
Sınırsız çoğalma, metastaz yapma, apoptozdan kaçınma, anjiyogenezi destekleme gibi birden fazla olaya sahiptirler. Normal hücrel homeostazi kontrol eden karmaşık sinyal iletim yolları bu süreçleri düzenler (Şekil 1.5). Bu sinyal yolları TGF- β yolu bulunur. TGF- β yolu, hücrelerin büyüme inhibisyonu, proliferasyon, replikasyon, apoptoz, istila, metastaz,

immün sürveyans ve anjiyogenezde negatif veya pozitif olarak katılma yeteneğine aracılık etmede karmaşık bir role sahiptir (Sonia, vd., 2006).



Şekil 1.5: TGF-β'nin Pleiotropik Etkileri (Gérald, vd., 2007)

TGF-β başlangıçta doğal kaynaklardan izole edilen en güçlü polipeptit büyüme faktörlerinden biri olarak tanımlanmıştır (Moses, vd., 1985). Yapısal olarak homolog dimerik protein ailesi olan TGF-β üç memeli izorformu halinde bulunmaktadır; TGF-β1, TGF-β2, TGF-β3 (Şekil 1.6). ECM sentezi, apoptozis, immün cevap, hücre proliferasyonu ve anjiyogenez gibi birçok biyolojik olayların regülasyonunda görev almaktadır (Roberts, 1999). Kanser patogenezi, doku fibrozisi, diyabet, otoimmün hastalık ve diğer hastalıklarda etkileri vardır. TβR-II Ser/Thr-spesifik protein kinazlar ve TβR-I, TGF-β sitokini ile indüklenmiş hücresel yanıtta sorumlu olduğu bilinmektedir (Huang ve Huang, 2005). TGF-β, tümör oluşumu aşamasında çift taraflı rol oynamaktadır. Tümörjenezin ilk aşamalarında bir tümör baskılayıcı görev gerçekleştirirken; ileri aşamalarında tümör aktivatörü olarak davranmaktadır (Akhurst, vd., 2001).



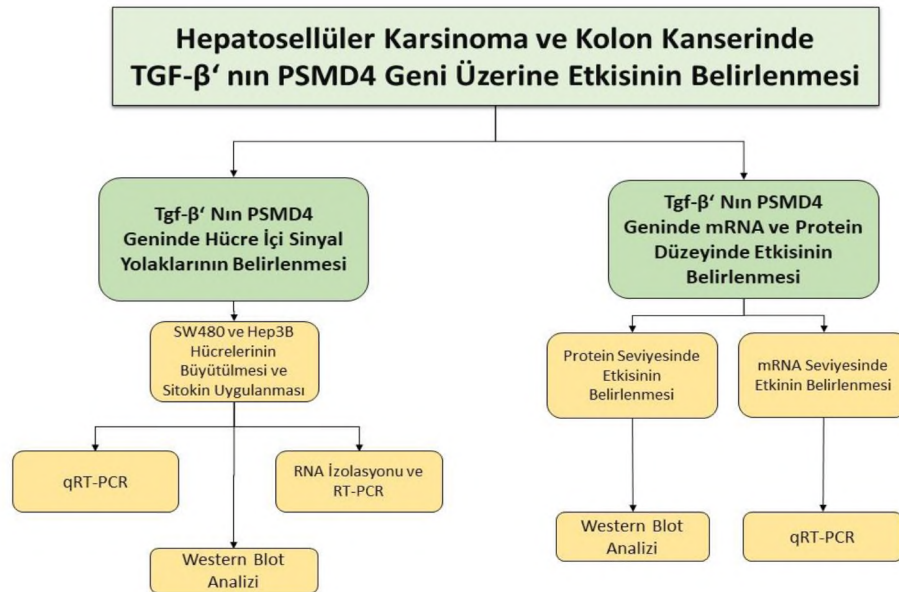
Şekil 1.6: TGF- β Sitokinin Mekanizması (Huang ve Huang, 2005).

TGF- β sitokini epitel hücreler için büyüme inhibitörüdür. Karsinoma hücrelerinin çoğunluğunda, meydana gelen transkripsiyonel aktivasyonun sağlanması T β R-I /T β R-II sinyal yolağını TGF- β sitokinin indüklemesi ile gerçekleştirmektedir. Bu durumda TGF- β sitokinin salgılanmasının artması, karsinoma hücrelerinin metastatik ve aynı zamanda invazif hale gelmesine sebep olmaktadır. Endotel ve epitel hücreleri TGF- β ile muamele edildiğinde; TGF- β 'nın hücre yüzey reseptörlerine bağlanarak büyümeyi inhibe etmesine neden olmaktadır (Huang ve Huang, 2005, Jakowle, 2006).

2. ÇALIŞMANIN AMACI

Erken safhalarında önlenemeyen ve yüksek metastastik özellikleri ile karakterize olan Karaciğer kanseri (HCC)'nde PSMD4'ün yukarı regüle edildiği belirtilmiştir (Midorikawa, vd., 2002). Bu araştırmalardan yola çıkarak tasarlanan tez çalışmasında ilk olarak PSMD4 geninde TGF- β sitokinin hepatoselüler karsinoma (Hep3B) hücre hattında protein ve mRNA seviyesinde ekspresyonu incelenmiştir. Daha sonra aynı şekilde kolon kanseri hücre hatlarından olan SW480 hücre hattında da PSMD4 geninde TGF- β sitokinin mRNA ve protein düzeyinde ekspresyonları incelenecektir. Yapılması planlanan tez için iş planı şekilde de gösterilmiş olup;

1. **TGF- β sitokinin, PSMD4 geninin ve Hep3B ve SW480 hücre hatlarında mRNA ve Protein Düzeyinde Etkisinin Belirlenmesi** Hep3B ve SW480 hücrelerine TGF- β sitokini 1sa, 3sa, 6sa, 24sa ve 48sa olmak üzere uygulanmıştır. PSMD4 geninin ifadesi mRNA ve protein seviyeleri incelenmiştir.
2. **TGF- β 'nın PSMD4 Geninde Hücre İçi Sinyal Yolaklarının Belirlenmesi** Hep3B hücre hattı için belirlenen inhibitörlerin (Wortmannin (PI3K İnhibitörü), Aktinomisin-D, MEKI (MAP2K1 İnhibitörü), SP600125 (JNK İnhibitörü), SIS3 (SMAD3 İnhibitörü), NFkB İnhibitörü ve PD169316 (p38 MAPK İnhibitörü)) PSMD4 geninde ekspresyonları incelenmiştir.



Şekil 2.1: Tez Çalışma Planı

3. MATERYAL METOD

3.1 Materyal

3.1.1 Tez Çalışmasında Kullanılan Kimyasal Malzemeler Listesi

3.1.1.1 Hücre Kültürü İçin Kullanılan Sarf Malzemeler

Tablo 3.1.1.1: Hücre Deneylerinde Kullanılan Sarf Malzemeler

Kullanılan Kimyasallar	Ticari Marka
Dulbecco's Modified Eagle's Medyum (DMEM)	Gibco
Etilendiaminetetraasetik asit (EDTA)	Sigma-Aldrich
Penisilin-Streptomisin Solüsyon	HyQ
Tris Base	Sigma
Fetal Sığır-Buzağı Serumu (FBS-FCS)	Gibco
Steril Filtre 0.20 µM	Sarstedt, Germany
Tripan Blue Solüsyonu	Sigma
Fosfat Tamponlu Tuz (PBS) Tableti	VWR Amresco
Steril 15-50 mL Falkon	İsoLab
Antibiyotik-Antimiyotik Solüsyon	Gibco
Dimetil sülfoksit (DMSO)	Merck (Sigma-Aldrich)
10 Tek Kullanımlık Cam Pipet	Sarstedt, Germany
25 mL Tek Kullanımlık Cam Pipet	Sarstedt, Germany
Sığır Serum Albümini (BSA)	Sigma
6 kuyulu hücre kültürü plakası	SPL Life Sciences
Ependorf	İsoLab
3 mL steril saydam pastör pipeti	İsoLab
25-75 cm² hücre kültürü şişesi	Sarstedt, Germany

3.1.1.2 RNA Eldesi ve Kontrolü İçin Kullanılan Sarf Malzemeler

Tablo 3.1.1.3: RNA Çalışmalarında Kullanılan Sarf Malzemeler

Kimyasal	Ticari Marka
Dietil pirokarbonat (DEPC)	Sigma
Etanol	Fisher BioReagent
Sodyum Dodesil Sülfat (SDS)	Sigma Aldrich
%99 Formaldehit	Sigma
%37'lik (12.3 M) Formaldehit	Fluka
GeneJET RNA Pürifikasyon Kit	Thermo scientific
Etidyum bromür (Et-Br)	Merck
2-Beta Merkaptotanol	Merck
Etilendiaminetetraasetik asit (EDTA)	Sigma, Prona
2 X RNA yükleme boyası	Thermo Scientific
Agaroz	Sigma, Prona

3.1.1.3 Protein Çalışmaları için Kullanılan Malzemeler

Tablo 3.1.1.4: Western Deneyinde Kullanılan Sarf Malzemeler

Kimyasal	Ticari Marka
Protein Belirteci (Rainbow Marker)	Thermo scientific
Akrilamid Bis-Akrilamid (37.5:1)	Sigma
Amonyum Persülfat (APS)	Fisher Scientific
4x Laemmli Örnek Tamponu (4XLSB)	Bio-Rad
%90'lık İzopropanol	Merck
2-Beta Merkaptotanol	Merck
PVDF Membran 0.45 µm	Millipore
TEMED (1,2-bis- (dimetilamino) etan)	Bio-Rad

Tablo 3.1.1.4 (Devam)

Akrilamid Bis-Akrilamid (19:1)	Sigma
Yağsız Süt Tozu (non-fat dry Milk)	Santa Cruz
Goat anti-rabbit IgG-HRP	Santa Cruz
SDS (Sodyum dodesil sülfat)	Sigma
TWEEN- 20	Sigma
PSMD4 antibody	Santa Cruz
2-Beta Merkaptöetanol	Sigma
β-Actin Mouse mAb	Cell Signaling

3.1.2 Tez Çalışmasında Kullanılan Cihazların Listesi**Tablo 3.1.2: Tez Kapsamında Yapılan Deneylerde Kullanılan Cihazlar**

Kullanılan Cihazlar	Ticari Marka
Buz Makinesi	Fiocchetti
-20°C ve +4C Buzdolabı	Arçelik
Mikrosantrifüj	Sigma
Su Banyosu	Elektromag
-80 °C ultralow freezer	Thermo
İnverted Mikroskop	Nikon, Japonya
Laminar Air Flow	TelstarBIOII
CO₂ 'li inkübatör	Nuaire
Otoklav	Hirayama
Çalkalamalı Etüv	GFL
Soğutmalı Santrifüj	Hanil Science
Elektroforez Güç Kaynağı (DNA-RNA)	Thermo Scientific
μDrop™ Plate	Thermo Scientific

Tablo 3.1.2 (Devam)

Tank Blot Sistemi	Bio-Rad
UV Görüntüleme sistemi	Vilber Lourmat
Masa Tipi pH metre	Hanna
Vorteks	Velp Scientfica
Light Cyclor 480 Real Time PCR	Roche
Mikrodalga fırın	Arçelik
Hassas terazi	Sartorius
PZR Thermocycler	Thermo
Isıtıcı Blok	Major Science

3.2 METOD

3.2.1 Laboratuvar Ortamının ve Malzemelerinin Sterilizasyonu

Çalışmada kullanılacak olan pipet uçlarının, uygun protokole göre hazırlanan solüsyonların, cam malzemelerin sterilizasyonu için otoklav cihazı 121°C’de 20 dk olarak ayarlandı ve malzemelerin sterilizasyonu sağlandı. Otoklavdan alınan malzemeler 80°C’lik etüvde bir gece bekletildi ve sterilizasyon aşamaları tamamlandı. Çalışma yapılacak alan her deneyden önce %70’lik Etil Alkol ile steril hale getirilmektedir. Laminar Flow cihazında bulunan HEPA filtre açıldı.

3.2.2 Hücre Kültürü Çalışmaları

3.2.2.1 Hücre Kültüründe Kullanılan Malzemelerin Sterilizasyonu ve Hazırlanması

Hücre kültürüne sterilizasyon ısıya dayanıklı malzemeler için otoklav ile, sıvı malzemeler için Laminar Flow içerisinde steril şırınga ile filtreleme ile sağlandı.

Hücreler için gerekli besiyerini sağlayan High-DMEM (Dulbecco’s Modified Eagle Medium- High Glukoz) ticari olarak temin edildi. Besiyerinin deney protokolüne uygun hale gelmesi için içerisinde %10 FCS eklendi.

FBS (Fetal Bovine Serum) ticari olarak temin edildikten sonra kullanıma hazır hale gelmesi için protokolüne uygun olarak 1 sa 56°C’de ısı ile inaktive edildi.

Sıvı formda olduğundan dolayı filtreden geçirildi ve sterilliği bozulmaması için 50 mL falkonlara bölünerek -20°C’de kullanıma hazır şekilde muhafaza edildi. High-DMEM içerisine belirlenen oranda eklendi.

PBS (Phosphate Buffered Salin) tablet formunda ticari olarak satın alındı. Protokolüne uygun şekilde (1 tablet için 100 mL su) hazırlandı ve filtre ile steril hale getirildi.

TE (Trypsin-EDTA) hazırlanmasında 0,5 mM EDTA ve %0.05 Trypsin PBS çözeltisinin içerisine ilave edildi. Otoklavlanarak steril hale getirildi ve -20°C’de saklandı.

3.2.2.2 Hücrelerin Besiyerinin Hazırlanması, Hücre Açılması-Dondurulması

Hücre kültürü deneyinde kullanılacak olan hücre hattı olan Hep3B ve SW480 hücre hatlarının açılması için öncelikle -80°C’de bulunan hücre stokları kontrol edildi. Hücreler için gerekli besiyeri 50 mL olacak şekilde falkonda hazırlandı. 50 mL olan falkonda 45 mL High Glucose DMEM (Dulbecco’s Modified Eagle Medium) içerisine 5 mL FCS (Fetal Calf Serum) eklendi. Hücrelerin kontaminasyonunu engellemek amacı ile hazırlanan solüsyonun içerisinden 500 µL çekilip atıldı ve 500 µL %1 penisilin-streptomisin antibiyotiği eklendi.

-80°C dondurucudan alınan hücre stokları 37°C’de hazır olan su banyosunda hızlı olacak şekilde tamamen eriyene kadar bekletildi. Eritilen hücre tek kullanımlık steril pastör pipeti kullanılarak hazırlanan besiyeri ile karıştırıldı. 1000 rpm’de 5 dk süreyle santrifüj yapıldı. Santrifüjden alınan hücreler pellet şeklinde bulunmaktadır. Pelleti besiyeri ile çözdükten sonra daha önceden içerisine besiyeri eklenen flasklara belirlenen oranlarda paylaştırıldı.

-80°C’den alınarak açılan hücreler belirli aralıklarla kontrol edildi ve flasklarda doluluk gözlemlendiği zaman pasajlama işlemi gerçekleştirildi. Hücreleri pasajlamak için flasklarda bulunan besiyeri uzaklaştırıldı. Trypsin-EDTA aktivitesinin engellenmemesi için PBS ile besiyeri kalıntısı temizlendi. Yüze tutanan hücrelerin kalkması için flask içerisine belirlenen oranda Trypsin-EDTA eklendi.

Trypsin-EDTA eklenen flasklar iç sıcaklığı 37°C olan ve % 5 CO₂ bulunan ortama sahip olan inkübatörde hücelere bağlı olarak 3 dk veya 5 dk bekletildi. Inkübatörden alınan flaskların

içerisine besiyeri eklendi ve 1000 rpm'de 5 dk santrifüj yapıldı. Dondurulması planlanan pelletler %10 FCS ile çözüldü ve ependorfa alındı. Ependorfun içerisine 100ul DMSO eklenerek -80°C dondurucuya kaldırıldı. Diğer pelletler ise besiyeri ile çözüldükten sonra flaslara dağıtıldı ve flaslklar inkübatöre kaldırıldı.

3.2.2.3 Hücreler ile Planlanan Deneylerin Tasarlanması

Hücre kültüründe deney kurmaya hazır hale getirilen hücreler için öncelikle hücre sayımı gerçekleştirildi. Hücre sayımı gerçekleştirilirken Tripan Mavi ile hücreler boyandı ve Thoma Lamı ile hücre sayımı gerçekleştirildi. 6 kuyucuklu plakaların son hacmi 2 mL besiyeri, içerisinde 500.000 hücre içerecek şekilde plakalara dağıtıldı. İnkübatörde bir gece bekletildi.

İnkübatörden alınan plakalardan medyumlar atıldı ve üzerine % 0.1 BSA içeren DMEM eklendi. 1 saat inkübatörde bekletildi. Sitokin deneyi için plakalar K, 1sa, 3sa, 6sa, 24sa, ve 48sa yazılarak etiketlendi. Kontrol grubu hariç diğer kuyucuklara 20 ng/mL TGF- β sitokini uygulandı. 1 sa, 3sa, 6sa, 24sa ve 48sa sonunda kuyucuklarda bulunan medyumlar atıldı. RNA deneyleri için hücrelere Tripsin-EDTA eklendi ve pelletler elde edildi. Protein deneyleri için ise RIPA çözeltisi kuyucuklara eklendi ve pelletler elde edildi.

Sinyal yolağı deneyleri için 6 kuyucuklu plakalara her kuyucuğa 500.000 hücre eşit şekilde dağıtıldı. 1 gece inkübatörde kaldırıldı. Sonraki gün kuyucuklara % 0.1 BSA içeren DMEM eklendi ve plaka 1 saat inkübatörde bekletildi. TGF- β ve kontrol sitokini grubu dışında kalan kuyucuklara tez çalışması kapsamında belirlenen MEKI (MAP2K1), PD169316 (p38 MAPK İnhibitör), Wortmannin (PI3K İnhibitör), NFkB İnhibitör, SP600125 (JNK İn.), SIS3 (SMAD3) uygulandı, 45 dk inkübatöre kaldırıldı. 45 dk sonunda kontrol ve TGF- β olarak belirlenen kuyucuklar dahil bütün kuyucuklara TGF- β sitokini uygulandı, plakalar inkübatöre kaldırıldı. 6 saat sonunda protein ve RNA deneylerine uygun olacak şekilde pelletler elde edildi.

3.2.3 RNA Tabanlı Tekniklerin Uygulanması

RNA çalışmalarına başlanmadan önce çalışılacak alan ilk olarak DEPC'li su (Diethyl pirokarbonat) ile steril hale getirildi. DEPC hazırlanırken 1000 mL otoklavlanmış steril su içerisinde 1 mL atıldı ve 1 mL DEPC eklendi. İnkübatörde 12 saat boyunca bekletildikten sonra otoklav yapıldı.

3.2.3.1 RNA İzolasyonu ve RNA Kantitatif Analizi

İzolasyona başlamadan önce ortam %70 etil alkol içeren su ve DEPC'li su ile steril hale getirildi. Daha sonra otomatik pipetler ve pipet ucu olarak kullanılan kutular önce %70 etil alkollü su daha sonra DEPC ile steril edildi. İzolasyon için ticari olarak satın alınan QC Tested kiti kullanıldı. Hep3B ve SW480 hücre hatları için ayrı ayrı kit protokolüne uygun gerçekleştirilen izolasyon sonrası örnekler -80°C dondurucuya kaldırıldı.

İzole edilen RNA örnekleri için konsantrasyon ölçümü μ Drop™ Plate Cihazı ile gerçekleştirildi. 2 μ L kör (saf su ile kör alındı) ve 2 μ L RNA örneği olacak şekilde 280 ve 260 nanometre de ölçüm gerçekleştirildi.

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

3.2.3.2 RNA'nın Nitel Analizi İçin Jel Elektroforezi

RNA'nın nicel analizi absorban ölçümü ile gerçekleştirildi. Nitel analizi için formaldehit jeli ile görüntüleme sağlandı. RNA çalışmalarında kullanılması için daha önceden hazırlanan DEPC'li su ile ortam steril hale getirildi. Kullanılacak olan cam malzemeler 12 saat boyunca % 0.1 DEPC'li su ile muamele edildi. 12 saat sonunda cam malzemeler otoklav yapıldı. Jelin hazırlanacağı elektrophorez aparatları % 0.5 SDS (Sodyum Dodesil Sülfat) ile yıkandıktan sonra % 0.1 DEPC'li su ile steril hale getirildi. Son olarak elektrophorez tankı, kaset gibi aparatlar % 96'lık etanol ile muamele edildi ve kurumaya bırakıldı.

Elektroforezde kullanılacak olan 10 X FA jel tamponu için % 0.1 DEPC içeren su içerisine

- Son konsantrasyonu 0.05 M, EDTA (pH:8),
- Son konsantrasyonu 0.01 M, NaAc,
- Son konsantrasyonu 0.2 M , MOPS (pH:7) eklendi.

Tampon çözeltinin pH:7'ye ayarlandı. Hazırlanan tampon çözelti otoklav ile steril hale getirildi.

1X FA tamponu için son konsantrasyon 1X olacak şekilde daha önceden hazırlanan 10X FA tampon çözeltisinin içine %37 'lik (12.3 M) Formaldehit eklendi. % 0.1 DEPC ile 1000 mL'ye tamamlandıktan sonra otoklav ile steril edildi.

Formaldehit jel elektroforezi için 0.5 g agaroz hazırlanan 10 X FA tampon çözeltisi ile cam olan erlenlerde çözüldü. 45 mL % 0.1 DEPC'li su eklendi ve çözelti kaynatıldıktan sonra sıcaklık yaklaşık 50°C'ye kadar düştüğünde içerisine 900 µL 12.3M olan % 37'lik formaldehit eklendi. Ardından 1 µL Et-Br (Ethidium Bromide) eklendi. Kaset içerisine hazırlanan jel döküldü, tarak yerleştirildi ve jelin donması bekledi. Elektroforez için kullanılacak olan tankın içerisi 1X FA Tamponu ile dolduruldu. Jel donduktan sonra tarak çıkarıldı ve kaset tankın içerisine yerleştirildi.

3 µL, 2 X RNA yükleme boyası içerisine 3 µL RNA örneğinden eklendi ve 70 °C' ısı bloğunda 10 dk bekletildi. 10 dk buzda bekletilen örnekler degridede edildi. İlk sıra RNA marker olmak üzere 2X RNA yükleme boyası ile hazırlanmış olan örnekler sırasıyla kuyucuklara eklendi. Elektroforez cihazı 80 volta ayarlandı ve 30 dk boyunca örnekler yürütüldü. Süre sonunda UV cihazında jel görüntüledi.

3.2.3.3 cDNA Elde Edilmesi ve cDNA Kontrolü için PCR

RNA'lar izole edildikten sonra reverse transkriptaz enzimi ile cDNA sentezi yapıldı. İki basamakta gerçekleşen sentezin basamakları ve bileşenleri Tablo 3.2.3.3.1 'de belirtilmiştir.

Tablo 3.2.3.3.1: Komplementer DNA PCR'ı İçin Kullanılan Malzemeler

I. Basamak	
Oligo (dT)	1 µL
İzole edilen RNA (Kalıp RNA)	1000 ng RNA için hesaplanan µL
dH₂O	12,5 µL'ye tamamlanır
65 °C 5 dk	
II. Basamak	
5X Reaksiyon Tampon	4 µL
RNaz İnhibitörü (RiboLock)	0,5 µL
dNTP (Deoksinükleotid) Karışım	2 µL
RT Enzim (Reverse Transkriptaz Enzim)	1 µL
Toplam Hacim	20 µL
42°C 60 dk 70 °C 10 dk	

cDNA sentezi gerçekleştirildikten sonra H β -2 primerleri kullanılarak komplementer DNA'nın varlığı kontrol edildi. Tablo 3.2.3.3.2 'de PCR döngü protokolü gösterilmiştir. H β -2 PCR örnekleri ve cDNA'lar -20 °C'de saklanır.

Tablo 3.2.3.3.2: H β -2 PCR'ı İçin Kullanılan Malzemeler

Hβ-2 PCR Bileşenleri	Örnek	PCR Koşulu
cDNA	1 μ L	95 °C – 3 dk (1 Döngü)
MgCl₂	2 μ L	
dNTP	1 μ L	
Taq Tampon (10X)	5 μ L	95 °C - 45 s 56 °C - 60 s 72 °C - 30 s (35 döngü)
İleri Primer	1 μ L	
Geri Primer	1 μ L	
Taq DNA Polimeraz Enzim (5 U/μL)	0,5 μ L	72 °C - 10 dk (1 Döngü)
dH₂O	38,5 μ L	

3.2.3.4 Agaroz Jel Elektroforezi

cDNA elde edildikten sonra H β -2 kontrol PCR'ı kuruldu. Ardından DNA'yı jelde görüntülemek için %1'lik agaroz jel elektroforezi yapıldı. Çalışmaya başlarken 5X TBE solüsyonu hazırlandı. 5XTBE solüsyonunun hazırlanması için Tris Baz, Borik asit ve EDTA tartıldı. Otoklav ile tampon çözelti steril hale getirildi. %1'lik agaroz jel hazırlanırken 1 gr agaroz tartıldı ve erlen içerisinde 100 mL 0,5X TBE tamponu (5X TBE tamponu 10 kat sulandırılarak hazırlandı) ile çözüldü ve kaynatıldı. Erlenenden çıkan buharların sonlanması beklendi ve oda sıcaklığına geldiği anlaşıldığında içerisine ticari olarak satın alınan Et-Br kimyasalının protokolüne uygun olarak erlen içerisine belirtilen miktar kadar ekleme yapıldı ve kaset içerisine döküldü. İçine tarak koyuldu ve jelin polimerleşmesi beklendi. Jelin yürütüleceği tan 0,5X TBE tamponu ile dolduruldu ve polimerleşen jel yerleştirildi. Örnekler 6X yükleme boyası ile belirlenen oranlarda boyandı. Kuyucuklara ilk sırada DNA marker olacak şekilde örnekler yüklendi. 40 dk boyunca 90 V akımda jel yürütüldü ve UV cihazında görüntüleme sağlandı.

3.2.3.5 Kantitatif Real-Time PCR (qRT-PCR)

Gen ekspresyonu analizinin yapılması için LightCycler® 480 (Roche) sistemi kullanıldı. PSMD4 geni primerleri ve kontrol için H β -2 primerleri 3 tekrarlı olarak 96 kuyucuklu plakada çalışıldı. Her kuyucuğun son hacmi 12.5 μ L olarak tasarlanan deney planında 6.25 μ L RealQ Plus 2X Master Karışım, 0.5 μ L 10 pmol PSMD4 ve H β -2 ileri ve geri primerleri, 4.25 μ L kullanıldı. 1 μ L cDNA kullanılarak Real-Time PCR kuruldu.

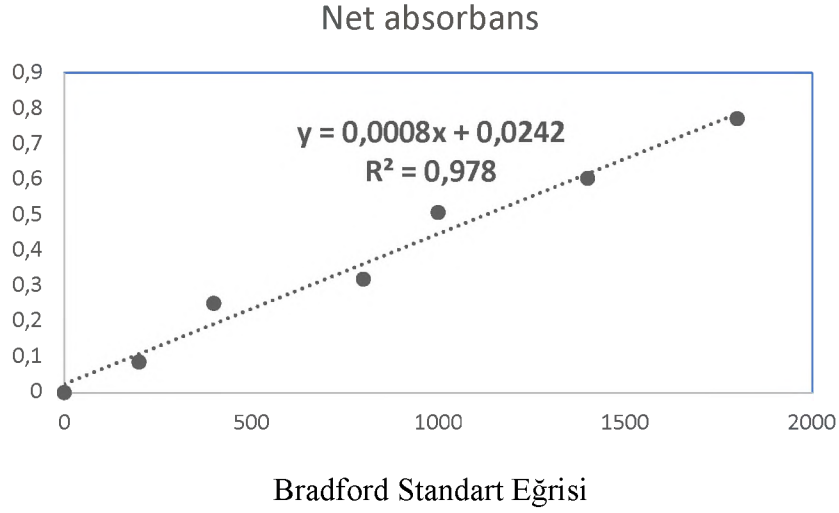
Real-Time PCR sonucunda elde ettiğimiz CT (Eşik Döngüsü) değerleri belirlenen hesaplama yöntemleri ile excel tablosunda analiz edildi. Daha sonra Graphpad analiz programı kullanılarak p değeri incelendi. Sonuçların anlamlı olarak kabul edilmesi için p değeri 0.05'den küçük ya da eşit olmalıdır ($p \leq 0.05$). $p \leq 0.05$ olan sonuçlar anlamlı olarak kabul edildi.

3.2.4 Protein Tabanlı Teknikler

3.2.4.1 Western Blot Analizi

Western blot deneyine başlamadan önce hücre kültüründe çalışılan hücrelerden pellet alma aşamasında RIPA ile hücre kazıma işlemi yapıldı. RIPA ile pellet alınan hücreler western blot deneyi için hazır hale getirilir. RIPA solüsyonu hazırlanırken 1 mM EGTa, 10 mM Tris Cl pH:8, % 1 Triton x100, % 0.1 Sodyum deoksikolat, %0.1 SDS (Sodyum dodesil sülfat), 1mM EDTA (Etilendiamintetraasetik asit), Proteaz inhibitörü istenilen hacme göre hesaplanarak hazırlandı. -20°C dolapta saklandı.

RIPA ile hazırlanan örneklerde miktar tayini için Bradford yöntemi kullanıldı. Bradford yönteminde 96 kuyucuklu plakanın örnek miktarı kadar kuyucuğuna 250 μ L Bradford reaktifi eklendi. 3 μ L örnek ve 2 μ L dH₂O eklendi. Plaka 10 dk karanlık ortamda bekletildi. Qubit® 2.0 Florometre cihazı kullanılarak 595 nm'de ölçüm alındı. Ölçüm sonuçlarının hesaplanması için Bradford Standart Eğrisi çizildi ve denklem hazırlandı. Ortaya çıkan denklem ile western blot için kullanılacak örneklerin miktar hesaplanması yapıldı.



3.2.4.1.1 Western Blot Deneyinde Kullanılan Solüsyonlar

Tablo 3.2.4.1.1: Western Blot Deneyi İçin Kullanılan Solüsyonlar ve Miktarları

Kullanılan Kimyasallar	Kimyasalların İçeriği	Saklama Koşulları
SDS Page Ayırma Jeli	19.8 g Tris, 0.4 g pH:8.8 dH ₂ O ile 1000 mL'ye tamamlandı.	+4 °C
10X TBS (10X Tris Buffered Saline)	24.22 g Tris 87.6 g NaCl pH:7.5 dH ₂ O ile 0,1 L'ye tamamlandı.	+4 °C
SDS Page Yığma Jeli	6.6 g Tris 0.4 g SDS pH:6.8 dH ₂ O ile 1000 mL'ye tamamlandı.	+4 °C
Ponceau Boyası	600 µL glasiyel asetik asit 0,066 g Ponceau boyası 20 mL dH ₂ O içerisine eklendi. Son hacim 60 mL'ye su le tamamlandı.	Oda sıcaklığı

Tablo 3.2.4.1.1 (devam)

Transfer Tamponu	100 mL 10X yürütme tamponu 200 mL methanol dH ₂ O ile 1000 mL'ye tamamlandı. + 500 µL %10 SDS solüsyonu eklendi.	-20 °C (Kullanılacağı zaman hazırlanır)
SDS Page Yürütme Tamponu	30.3 g Tris 144.4 g Glisin pH:8.3 dH ₂ O ile 1 L'ye tamamlandı.	+4 °C
Bloklama Solüsyonu	20 mL 1XTBS-tween20 1 g yağsız süt tozu	+4 °C

3.2.4.2 Western Blot - PVDF Membrana Protein Transferi

Hazırlanan ayırma ve yığılma jeli cam plakalar arasına döküldü ve kuyucuk oluşması için tarak koyuldu. Jellerin polimerleşmesi beklendi. Daha sonrasında örnekler boyandı ve 95 °C'de 5 dk denatüre edildi. Yükleme için hazır olan protein örnekleri (25-30 µL), ilk kuyucuk protein marker (7 µL) olmak üzere jele yükleme işlemi yapıldı. Jel 1X yürütme tamponunda 90V akımda protein marker tamamen açılana kadar yürütüldü. Bu süreçte örneklerin jelde kaybedilmemesine dikkat edildi.

Yürüme işlemi tamamlandığında protein örnekleri poliviniliden diflorür (PVDF) membrana transfer edildi. Transfer işleminde membran 5.2 cm x 8.5 cm olarak kesildi. Kesilen membran 1 dk metanolde bekletildi. Bu süreçte transfer süngerleri ve kurutma kapıtları taze olarak hazırlanan soğuk transfer tamponunun içerisinde bekletildi. Metanolden alınan membran 5 dk soğuk transfer tamponunda bekletildi. Sünger, kurutma kâğıdı, aktif yüzey üste bakacak şekilde PVDF membran, poliakrilamid jel, kurutma kâğıdı sandviç şeklinde üst

üste hazırlandı ve sünger transfer kasetine yerleştirildi. Taze transfer tamponu tank içerisine eklendi ve 15V akımda +4 °C olan buzdolabında 1 gece boyunca transfer sağlandı.

3.2.4.3 Membrana Aktarılan Proteinlerin Antikorlanması

Transfer sandviçinden dikkatlice ayrılan membran bloklanması için öncelikle 5mL 1XTBS-Tween20 solüsyonuna eklenir. 5 dk masaüstü döner çalkalayıcıda yıkamaya bırakılır. Bu süreçte SDS-Poliakrilamid jel Coomassie Brilliant Blue boyasında bekletilir. Daha sonra boya tamamen arındırılana kadar jel su ile yıkanır. Yıkamadan alınan membran hazırlanmış olan bloklama solüsyonuna yerleştirilir ve 2 saat boyunca çalkalayıcıda bloklama işlemi gerçekleştirilir. Boyadan arındırılan jelde protein varlığı kontrol edilir. Bloklama işlemi tamamlandıca membran 1XTBS-Tween20 tamponu ile 5'er dk süreyle 3 kez yıkama gerçekleştirilir.

Yıkama sonunda membran tez kapsamında belirlenen normalizatör olarak adlandırılan Beta-aktin primer antikoruna ile 1 gece boyunca +4 °C'de döner çalkalayıcıya konuldu. Sonraki gün 1XTBS-Tween20 tamponu ile 3 kez yıkama gerçekleştirildi ve sekonder antikor ile 1 saat muamele edildi. İşlem sonunda ticari olarak satın alınan ECL (Kemilüminesans) solüsyonu eklendi ve 1 dk boyunca karanlık ortamda muamele edildi ve UVP görüntüleme sistemi ile görüntülendi. Aynı işlemler çalışılacak olan PSMD4 geni primer ve sekonder antikorları için gerçekleştirildi. Görüntüleme sağlandı.

3.2.4.4 İstatistiksel Analiz Programları ile Western Blot Analizi

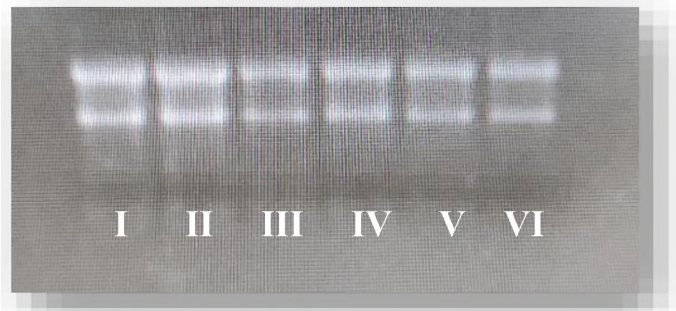
Antikorlama işlemi tamamlanan proteinlerin görüntüleri alındıktan sonra kantitatif analiz için ImageJ programı kullanıldı. ImageJ programından alınan sayısal veriler GraphPad programında analiz edildi. Protein bantlarının görünürlüğüne göre yapılan analizin sayısal verilerinde $p \leq 0.05$ çıkan sonuçlar anlamlı olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1 Hep3B Hücre Hattında TGF- β Sitokinin PSMD4 Genine Etkisi

4.1.1 TGF- β Sitokinin PSMD4 Geni Üzerindeki Etkisinin mRNA Düzeyinde Belirlenmesi

TGF- β sitokinin PSMD4 geninin ekspresyonuna katkısını incelemek için, ilk olarak Real Time PCR analizi gerçekleştirildi. Hepatosellüler kanser modeli olarak insan Hep3B hücreleri kullanıldı. Hep3B hücreleri Bölüm 3.2.2.2' de belirtildiği üzere açılarak devam ettirilip, pasajlanmıştır. Sitokin deneyi kurmak için 6 kuyucuklu plakaların her kuyucuğuna 500.000 hücre olacak şekilde büyütülen hücreler paylaştırıldı. Bölüm 3.2.2.3' de açıklandığı üzere K, 1. sa., 3. sa., 6. sa., 24. sa. ve 48. sa. olmak üzere hücrelere 20 ng/mL TGF- β uygulandı. Süre dolduğunda toplanan hücre pelletleri Bölüm 3.2.3.1'de belirtildiği üzere RNA izolasyonu gerçekleştirildi. RNA'ların kalitesini ve katmanlarını gözlemek için Bölüm 3.2.3.2'de açıklandığı üzere RNA elektroforezi gerçekleştirildi ve RNA'lar formaldehit jelde görüntüledi (Şekil 4.1). RNA'lar görüntüledikten sonra komplementer DNA eldesi için Bölüm 3.2.3.3'de belirtilen deney prosedürleri ile Reverse Transkriptaz enzimi kullanılarak cDNA sentezi gerçekleştirildi. Komplementer DNA kontrolünün sağlanması için normalizatör olarak adlandırılan H β -2 primerleri kullanılarak RT-PCR Bölüm 3.2.3.5'de açıklandığı şekilde gerçekleştirildi. RT PCR sonrası görüntüleme için Bölüm 3.2.3.4'de anlatılan agaroz jel hazırlandı ve örnekler jele yüklendi. Jelde yürütme sonrası UV cihazı ile görüntü sağlandı (Şekil 4.2). cDNA lardan insan beta mikroglobulin bandı elde edilmesi cDNA'ların kalitesinin uygun olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.1: TGF- β uygulanmış Hep3B hücrelerinden izole edilen RNA örneklerinin RNA jel elektroforezi görüntüsü.

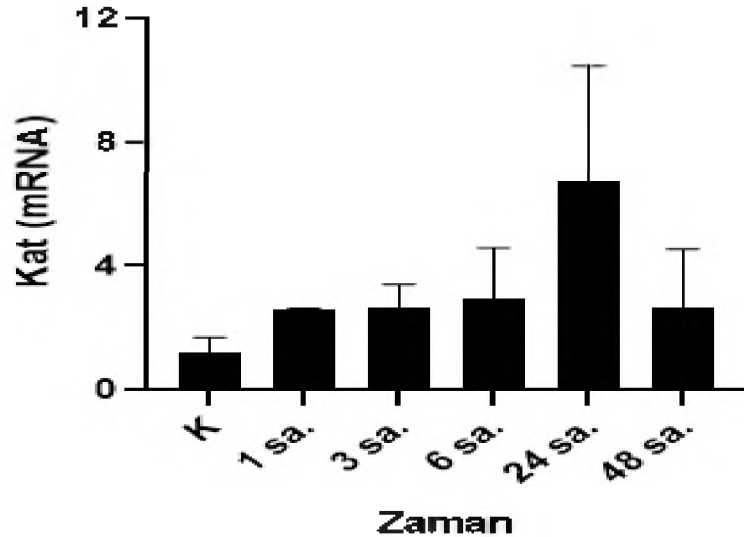
I.Kontrol **II.** 1. Sa **III.** 3. Sa **IV.** 6. Sa **V.** 24. Sa **VI.** 48. Saat



Şekil 4.2: İzole edilen RNA'lardan elde edilen komplementer DNA'nın kontrolü için H β -2 primerleri ile gerçekleştirilen RT-PCR sonrası agaroz jel elektroforezinde yürütme sonra UV görüntüsü

I . Kontrol II. 1. Sa III. 3. Sa IV. 6. Sa V. 24. Sa VI. 48. Sa VII. Pozitif Kontrol

Komplementer DNA elde edildikten sonra gerçek zamanlı PCR işlemi gerçekleştirildi. Bölüm 3.2.3.5'de açıklandığı üzere ileri ve geri PSMD4 primerleri, SYBRGreen kullanılarak qRT-PCR gerçekleştirildi. qRT-PCR sonucunda elde edilen sayısal veriler Graphpad programında analiz edildi. (Şekil 4.3). Buna göre tüm saatlerde PSMD4 geninin TGF- β ile mRNA düzeyinde yukarı doğru regüle edildiği anlaşılmaktadır. Ancak istatistiki olarak anlamlı bir sonuç elde edilmemiştir.

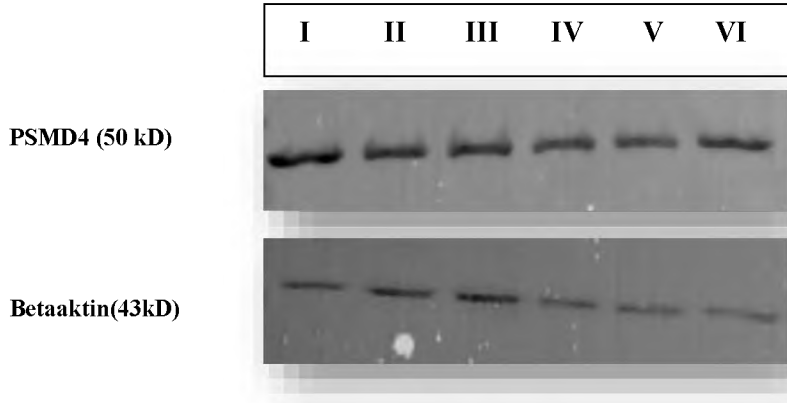


Şekil 4.3: PSMD4 geninin TGF- β uygulanmış Hep3B hücrelerinde ekspresyon seviyeleri.

I . Kontrol II. 1. Sa III. 3. Sa IV. 6. Sa V. 24. Sa VI. 48. Sa VII. Pozitif Kontrol

4.1.2 TGF- β Sitokinin PSMD4 Geni Üzerindeki Etkisinin Protein Düzeyinde Belirlenmesi

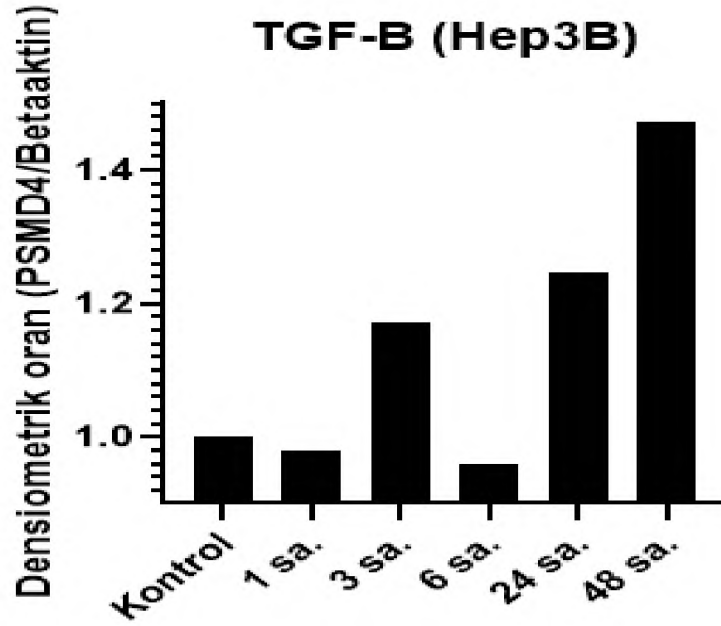
TGF- β sitokinin PSMD4 geninin Hep3B hücrelerinde protein düzeyinde seviyesini incelemek için, Bölüm 3.2.2.2’ de belirtildiği üzere Hep3B hücresi açıldı ve devam ettirmek için pasajlama işlemi yapıldı. Sitokin deneyi kurmak için 6 kuyucuklu plakaların her kuyucuğuna 2 mL içerisinde 500.000 hücre olacak şekilde büyütülen hücreler paylaştırıldı. Daha sonra Bölüm 3.2.4.1’de anlatıldığı üzere protein pelleti elde edildi. Bölüm 3.2.4.1.1’de bulunan Tablo: 3.2.4.1.1’de gösterildiği miktarlar ile hazırlanan western jellerine proteinler 95 °C’ de 5 dk denatüre edildikten sonra yüklendi. Yürüme işlemi sonlandığında Bölüm 3.2.4.2’de açıklandığı gibi jel üzerinde bulunan proteinler PVDF membran üzerine transfer edildi. Transferde 1 gece bekledikten sonra Bölüm 3.2.4.3’de belirtildiği gibi PSMD4 antikorları ve β -aktin primer-sekonder antikorları kullanılarak antikorlama işlemi gerçekleştirildi. Antikorlama süreci bittikten sonra Bölüm 3.2.4.3’ün son paragrafında anlatılan ECL (Kemilüminesans) solüsyonu eklendi ve UVP görüntüleme sistemi görüntüleme sağlandı (Şekil 4.4).



Şekil 4.4: TGF- β uygulanan Hep3B hücrelerinde western analizi sonucu oluşan membran görüntüsü

I.Kontrol II. 1. Sa III. 3. Sa IV. 6. Sa V. 24. Sa VI. 48. Sa

Proteinler western analizi sonucunda membranda görüntülendikten sonra Bölüm 3.2.4.4’de bahsedilen analiz programlarından ImageJ ile bant boyutları sayısal verilere aktarıldı. Elde edilen sayısal veriler ile Graphpad programı ile analiz gerçekleştirildi ve grafik oluşturuldu (Şekil 4.5). Buna göre protein düzeyinde de TGF- β PSMD4 protein seviyesini arttırmaktadır.



Şekil 4.5: TGF- β uygulan Hep3B hücrelerinde PSMD4 geninin protein ekspresyonu
I . Kontrol II. 1. Sa III. 3. Sa IV. 6. Sa V. 24. Sa VI. 48. Sa VII. Pozitif Kontrol

4.1.3 Hep3B Hücre Hattında PSMD4 Genindeki TGF- β Sitokin Cevabında Hücre İçi Sinyal Yolaklarının Belirlenmesi

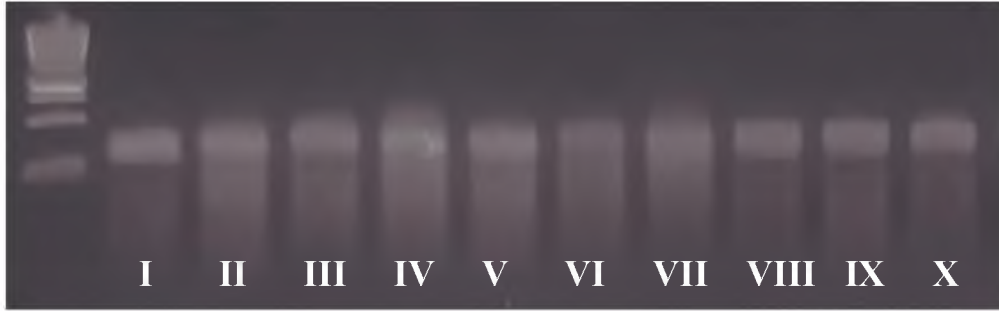
PSMD4 geninin Hep3B hücrelerinde sinyal yolaklarının mRNA düzeyinde belirlenmesi için ilk olarak Hep3B hücreleri Bölüm 3.2.2.2' de belirtildiği üzere açılarak devam ettirilip, pasajlanmıştır. Sitokin deneyi kurmak için 6 kuyucuklu plakaların her kuyucuğuna 500.000 hücre olacak şekilde büyütülen hücreler paylaştırıldı. Bölüm 3.2.3.3' de anlatıldığı üzere tez kapsamında belirlenen MEKI (MAP2K1), PD169316 (p38 MAPK İnhibitör), Wortmannin (PI3K İnhibitör), NFkB İnhibitör, SP600125 (JNK İn.), SIS3 (SMAD3) inhibitörleri Hep3B hücrelerine uygulandı. Hücre pelletleri alındıktan sonra Bölüm 3.2.3.1' de belirtildiği üzere RNA izolasyonu gerçekleştirildi. RNA'ların kalitesini gözlemek için Bölüm 3.2.3.2' de açıklandığı üzere RNA elektroforezi gerçekleştirildi ve RNA'lar formaldehit jelde görüntülendi (Şekil 4.6).



Şekil 4.6: İnhibitör uygulanmış Hep3B hücrelerinden izole edilen RNA'ların jel görüntüsü.

I. Kontrol **II.** TGF- β **III.** TGF- β + Actinomisin **IV.** TGF- β + Cycloheximide **V.** TGF- β + MEKI **VI.** TGF- β + Wortmannin **VII.** TGF- β + SP600125 **VIII.** TGF- β + PD169316 **IX.** TGF- β + NFkB **X.** TGF- β + SIS3

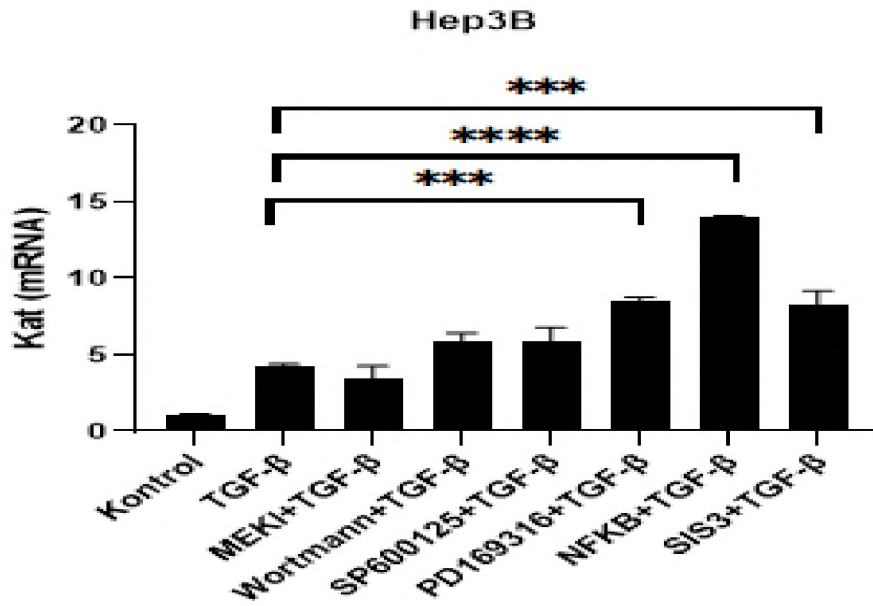
RNA'lar görüntüledikten sonra komplementer DNA eldesi için Bölüm 3.2.3.3'de belirtilen deney prosedürleri ile Reverse Transkriptaz enzimi kullanılarak cDNA sentezi gerçekleştirildi. Komplementer DNA kontrolünün sağlanması için yükleme kontrolü olarak adlandırılan H β -2 primerleri kullanılarak qRT-PCR Bölüm 3.2.3.5'de açıklandığı şekilde gerçekleştirildi. qRT-PCR sonrası görüntüleme için Bölüm 3.2.3.4'de anlatılan agaroz jel hazırlandı ve örnekler jele yüklendi. Jelde yürütme sonrası UV cihazı ile görüntü sağlandı (Şekil 4.7).



Şekil 4.7: İnhibitör uygulanan Hep3B hücrelerinin RNA'larından elde edilen komplementer DNA'nın kontrolü için H β -2 primerleri ile gerçekleştirilen RT-PCR sonrası agaroz jel elektroforezinde yürütme sonra UV görüntüsü.

I. Kontrol **II.** TGF- β **III.** TGF- β + Actinomisin **IV.** TGF- β + Cycloheximide **V.** TGF- β + MEKI **VI.** TGF- β + Wortmannin **VII.** TGF- β + SP600125 **VIII.** TGF- β + PD169316 **IX.** TGF- β + NFkB **X.** TGF- β + SIS3

Bölüm 3.2.3.5’de açıklandığı üzere ileri ve geri PSMD4 primerleri, SYBRGreen kullanılarak qRT-PCR gerçekleştirildi. qRT-PCR sonucunda elde edilen sayısal veriler Graphpad programında analiz edildi. Analiz sonucunda $p < 0.05$ olan değerler anlamlı olarak ifade edildi (Şekil 4.8). Buna göre TGF- β uygulaması Hep3B hücrelerinde PSMD4 gen ifadesini arttırmaktadır. Ancak incelenen MAPK, PI3K NFKappaB ve smad yollarını hiç birisinin bu artıştan sorumlu olmadığı anlaşılmaktadır. Çünkü TGF- β sitokininin oluşturduğu aktivasyon sadece MEK1 inhibitörü ile geri dönmüştür. Bu durumda TGF- β cevabı MAP kinaz yolu üzerinden ilerlediği anlaşılmaktadır.

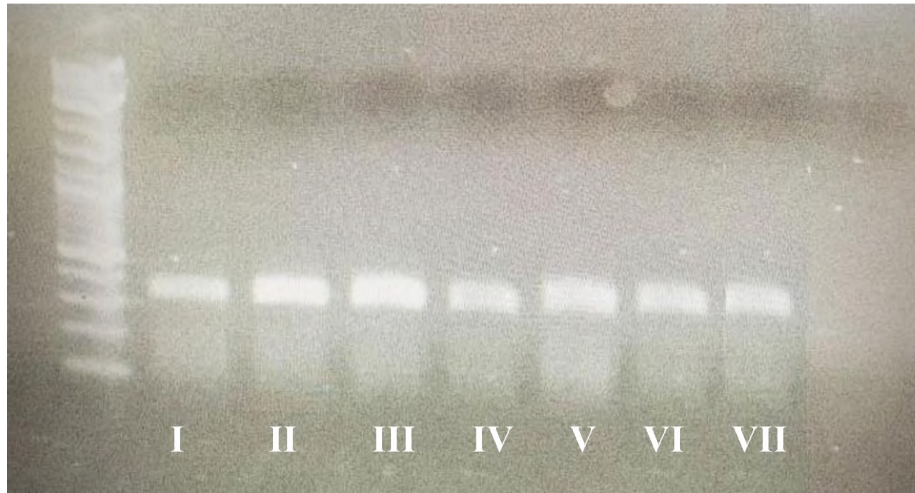


Şekil 4.8: Sinyal yollarının tespiti için uygulanan inhibitörlerin Hep3B hücrelerindeki PSMD4 geninin mRNA seviyesinde ekspresyon seviyeleri. ($p < 0.05$)
I. Kontrol **II.** TGF- β **III.** TGF- β + MEK1 **IV.** TGF- β + Wortmannin **V.** TGF- β + SP600125 **VI.** TGF- β + PD169316 **VII.** TGF- β + Nf κ B **VIII.** TGF- β + SIS3

4.2 SW480 Hücre Hattında TGF- β Sitokininin PSMD4 Genine Etkisi

4.2.1 TGF- β Sitokininin PSMD4 Geni Üzerindeki Etkisinin mRNA Düzeyinde Belirlenmesi

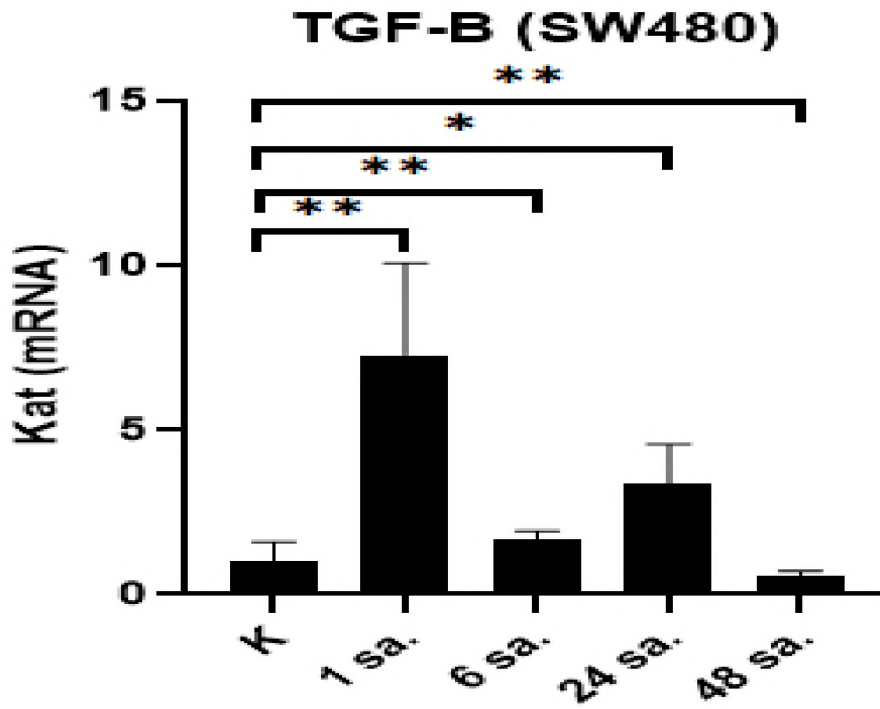
TGF- β sitokininin PSMD4 geninin ekspresyonuna katkısını incelemek için, ilk olarak Real Time PCR analizi gerçekleştirildi. Kolon kanser modeli olarak SW480 hücreleri kullanıldı. SW480 hücreleri Bölüm 3.2.2.2' de belirtildiği üzere açılarak devam ettirilip, pasajlanmıştır. Sitokin deneyi kurmak için 6 kuyucuklu plakaların her kuyucuğuna 500.000 hücre olacak şekilde büyütülen hücreler paylaştırıldı. Bölüm 3.2.2.3' de açıklandığı üzere Kontrol, 1 sa, 3 sa, 6 sa, 24 sa ve 48 sa saat olmak üzere hücrelere TGF- β sitokini uygulandı. Süre sonunda toplanan hücre pelletleri Bölüm 3.2.3.1'de belirtildiği üzere RNA izolasyonu gerçekleştirildi. RNA'ların kalitesini ve katmanlarını gözlemek için Bölüm 3.2.3.2'de açıklandığı üzere RNA elektroforezi gerçekleştirildi ve RNA'lar formaldehit jelde görüntülendi. RNA'lar görüntüledikten sonra komplementer DNA eldesi için Bölüm 3.2.3.3'de belirtilen deney prosedürleri ile Reverse Transkriptaz enzimi kullanılarak cDNA sentezi gerçekleştirildi. Komplementer DNA kontrolünün sağlanması için normalizatör olarak adlandırılan H β -2 primerleri kullanılarak qRT-PCR Bölüm 3.2.3.5'de açıklandığı şekilde gerçekleştirildi. qRT-PCR sonrası görüntüleme için Bölüm 3.2.3.4'de anlatılan agaroz jel hazırlandı ve örnekler jele yüklendi. Jelde yürütme sonrası UV cihazı ile görüntü sağlandı (Şekil 4.9). Buna göre elde edilen cDNAların kalitesinin uygun olduğu anlaşılmaktadır.



Şekil 4.9: İzole edilen RNA'lardan elde edilen komplementer DNA'nın kontrolü için H β -2 primerleri ile gerçekleştirilen RT-PCR sonrası agaroz jel elektroforezinde yürütme sonra UV görüntüsü

I . Kontrol II. 1. Sa III. 3. Sa IV. 6. Sa V. 24. Sa VI. 48. Sa VII. Pozitif Kontrol

Komplementer DNA elde edildikten sonra gerçek zamanlı PCR işlemi gerçekleştirildi. Bölüm 3.2.3.5’de açıklandığı üzere SW480 hücrelerinden elde edilen komplementer DNA, ileri ve geri PSMD4 primerleri, SYBR Green kullanılarak qRT-PCR gerçekleştirildi. qRT-PCR sonucunda elde edilen sayısal veriler Graphpad programında analiz edildi. Analiz sonucunda $p < 0.05$ olan değerler anlamlı olarak ifade edildi (Şekil 4.10). Buna göre 1 saatte PSMD4 geninin TGF- β ile mRNA düzeyinde anlamlı olarak yukarı doğru regüle edildiği anlaşılmaktadır. Buna göre SW480 hücrelerinde TGF- β PSMD4 mRNA sını 48 saat haricindeki zaman dilimlerinde yukarı doğru ekspre etmektedir.

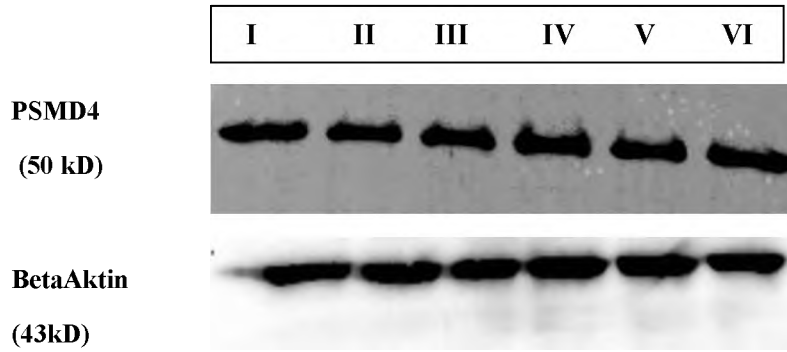


Şekil 4.10: PSMD4 geninin TGF- β uygulanmış SW480 hücrelerinde mRNA seviyesinde ekspresyon seviyeleri.

I . Kontrol II. 1. Sa III. 3. Sa IV. 6. Sa V. 24. Sa VI. 48. Sa VII. Pozitif Kontrol

4.2.2 TGF- β Sitokinin PSMD4 Geni Üzerindeki Etkisinin Protein Düzeyinde Belirlenmesi

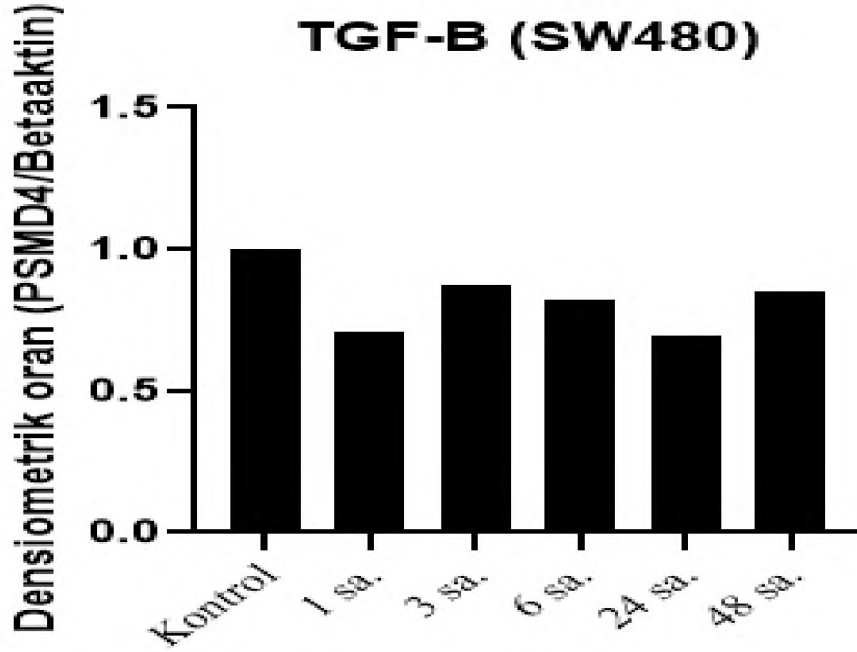
TGF- β sitokinin PSMD4 geninin SW480 hücrelerinde protein düzeyinde seviyesini incelemek için, Bölüm 3.2.2.2’ de belirtildiği üzere SW480 hücresi açıldı ve devam ettirmek için pasajlama işlemi yapıldı. Sitokin deneyi kurmak için 6 kuyucuklu plakaların her kuyucuğuna 2mL içerisinde 500.000 hücre olacak şekilde büyütülen hücreler paylaştırıldı. Daha sonra Bölüm 3.2.4.1’de anlatıldığı üzere protein pelleti elde edildi. Bölüm 3.2.4.1.1’de bulunan Tablo: 3.2.4.1.1’de gösterildiği miktarlar ile hazırlanan western jellerine proteinler 95 °C’ de 5 dk denatüre edildikten sonra yüklendi. Yürüme işlemi sonlandığında Bölüm 3.2.4.2’de açıklandığı gibi jel üzerinde bulunan proteinler PVDF membran üzerine transfer edildi. Transferde 1 gece bekledikten sonra Bölüm 3.2.4.3’de belirtildiği gibi PSMD4 antikoru ve β -aktin primer-sekonder antikoru kullanılarak antikorlama işlemi gerçekleştirildi. Antikorlama süreci bittikten sonra Bölüm 3.2.4.3’ün son paragrafında anlatılan ECL (Kemilüminesans) solüsyonu eklendi ve UVP görüntüleme sistemi görüntüleme sağlandı (Şekil 4.11).



Şekil 4.11: TGF- β uygulanan sw480 hücrelerinde western analizi sonucu oluşan membran görüntüsü

I. Kontrol II. 1. Sa III. 3. Sa IV. 6. Sa V. 24. Sa VI. 48. Sa

Proteinler western analizi sonucunda membranda görüntülendikten sonra Bölüm 3.2.4.4’de bahsedilen analiz programlarından ImageJ ile bant boyutları sayısal verilere aktarıldı. Elde edilen sayısal veriler ile Graphpad programı ile analiz gerçekleştirildi ve grafik oluşturuldu (Şekil 4.12). Buna göre protein ekspresyon çalışmalarında mRNA ‘da gözlenen TGF- β cevabındaki yukarı regülasyonun aynı şekilde korele gitmediği anlaşılmaktadır.

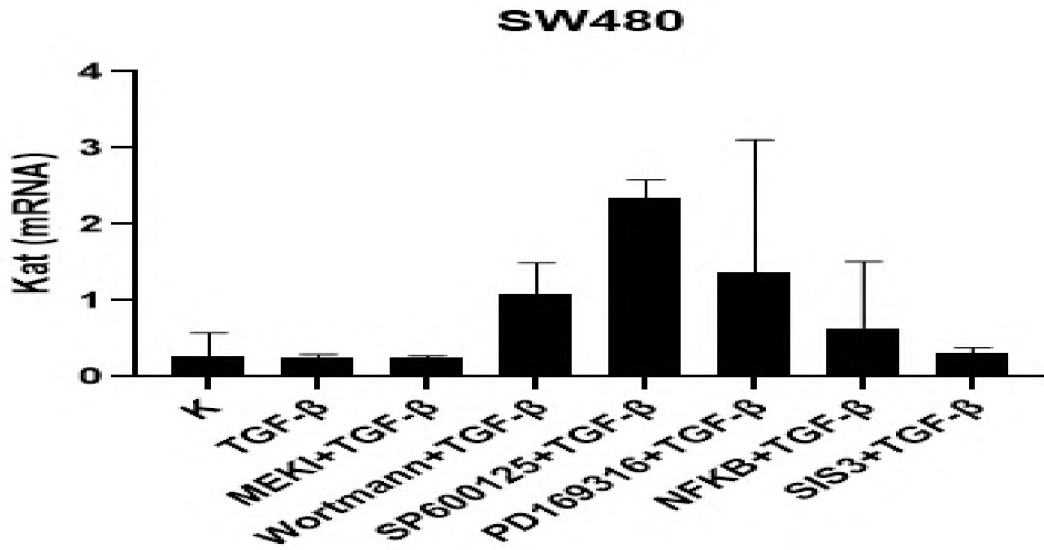


Şekil 4.12: TGF- β uygulan SW480 hücrelerinde PSMD4 geninin protein ekspresyonu
I . Kontrol II. 1. Sa III. 3. Sa IV. 6. Sa V. 24. Sa VI. 48. Sa VII. Pozitif Kontrol

4.2.3 TGF- β Sitokininin SW480 Hücre Hattında Hücre İçi Sinyal Yolaklarının PSMD4 Geninde Belirlenmesi

PSMD4 geninin SW480 hücrelerinde sinyal yolaklarının mRNA düzeyinde belirlenmesi için ilk olarak SW480 hücreleri Bölüm 3.2.2.2' de belirtildiği üzere açılarak devam ettirilip, pasajlanmıştır. Sitokin deneyi kurmak için 6 kuyucuklu plakaların her kuyucuğuna 500.000 hücre olacak şekilde büyütülen hücreler paylaştırıldı. Bölüm 3.2.3.3' de anlatıldığı üzere tez kapsamında belirlenen MEKI (MAP2K1), PD169316 (p38 MAPK İnhibitör), Wortmannin (PI3K İnhibitör), NFkB İnhibitör, SP600125 (JNK İn.), SIS3 (SMAD3) inhibitörleri SW480 hücrelerine uygulandı. Hücre pelletleri alındıktan sonra Bölüm 3.2.3.1' de belirtildiği üzere RNA izolasyonu gerçekleştirildi. RNA'ların kalitesini ve katmanlarını gözlemek için Bölüm 3.2.3.2' de açıklandığı üzere RNA elektroforezi gerçekleştirildi ve RNA'lar formaldehit jelde görüntülendi. RNA'lar görüntüledikten sonra komplementer DNA eldesi için Bölüm 3.2.3.3' de belirtilen deney prosedürleri ile Reverse Transkriptaz enzimi kullanılarak cDNA sentezi gerçekleştirildi. Komplementer DNA kontrolünün sağlanması için normalisatör olarak adlandırılan H β -2 primerleri kullanılarak qRT-PCR Bölüm 3.2.3.5' de açıklandığı şekilde gerçekleştirildi. qRT- PCR sonrası görüntüleme için Bölüm

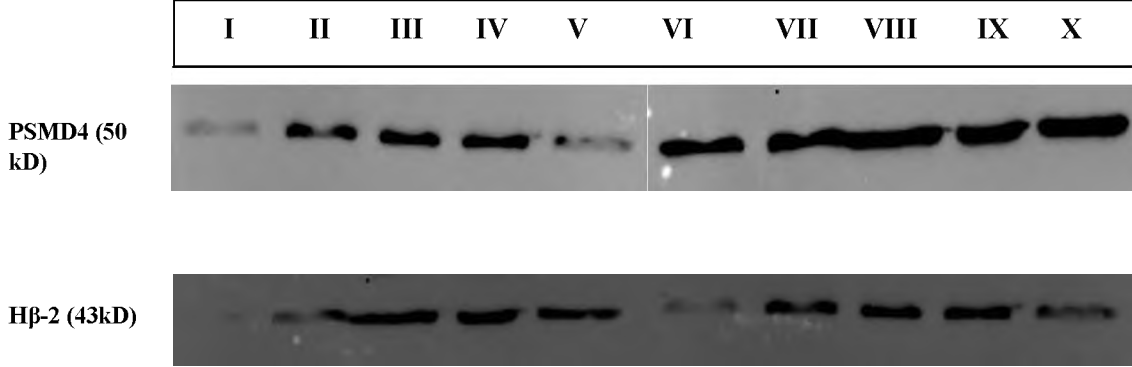
3.2.3.4’de anlatılan agaroz jel hazırlandı ve örnekler jele yüklendi. Jelde yürütme sonrası UV cihazı ile görüntü sağlandı. Buna göre elde edilen cDNAların kalitesinin uygun olduğu anlaşılmaktadır. Komplementer DNA elde edildikten sonra gerçek zamanlı PCR işlemi gerçekleştirildi. Bölüm 3.2.3.5’de açıklandığı üzere SW480 hücrelerinden elde edilen komplementer DNA, ileri ve geri PSMD4 primerleri, SYBR Green kullanılarak qRT-PCR gerçekleştirildi. qRT-PCR sonucunda elde edilen sayısal veriler Graphpad programında analiz edildi. Analiz sonucunda $p < 0.05$ olan değerler anlamlı olarak ifade edildi (Şekil 4.13).



Şekil 4.13: Sinyal yollarının tespiti için uygulanan inhibitörlerin SW480 hücrelerindeki PSMD4 geninin mRNA seviyesinde ekspresyon seviyeleri

TGF-β sitokinin PSMD4 geninin SW480 hücrelerinde protein düzeyinde seviyesini incelemek için, Bölüm 3.2.2.2’ de belirtildiği üzere SW480 hücresi açılan hücrelere MEKI (MAP2K1), PD169316 (p38 MAPK İnhibitör), Wortmannin (PI3K İnhibitör), NFKB İnhibitör, SP600125 (JNK İn.), SIS3 (SMAD3) inhibitörleri SW480 hücrelerine uygulandı. MEKI (MAP2K1), PD169316 (p38 MAPK İnhibitör), Wortmannin (PI3K İnhibitör), NFKB İnhibitör, SP600125 (JNK İn.), SIS3 (SMAD3) inhibitörleri SW480 hücrelerine uygulandı. Daha sonra Bölüm 3.2.4.1’de anlatıldığı üzere protein pelleti elde edildi. Bölüm 3.2.4.1.1’de bulunan Tablo 3.2.4.1.1’de gösterildiği miktarlar ile western jeli hazırlandı. Yürütme işlemi sonlandığında Bölüm 3.2.4.2’de açıklandığı gibi jel üzerinde bulunan proteinler PVDF membran üzerine transfer edildi. Bölüm 3.2.4.3’de belirtildiği gibi PSMD4 antikorları ve β

-aktin primer-sekonder antikorları kullanılarak antikorlama işlemi gerçekleştirildi. Antikorlama süreci bittikten sonra Bölüm 3.2.4.3’de anlatılan ECL (Kemilüminesans) solüsyonu eklendi ve UVP görüntüleme sistemi görüntüleme sağlandı (Şekil 4.14).

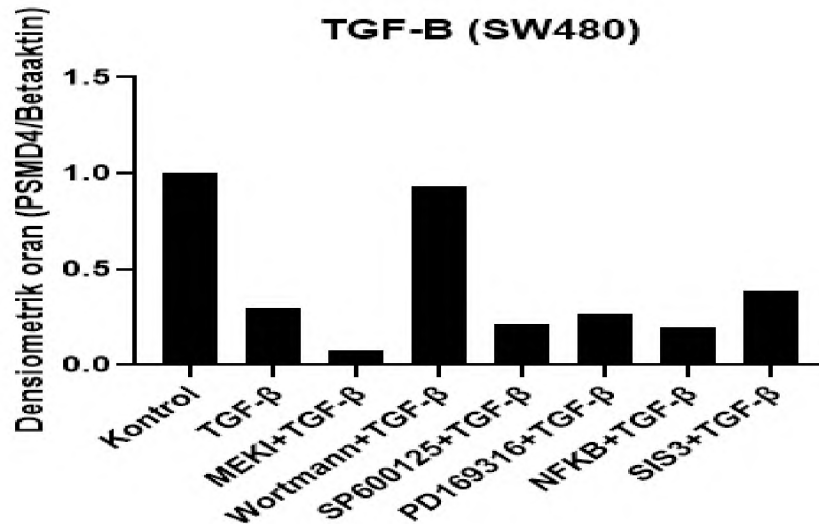


Şekil 4.14: Sinyal yollarının tespiti için uygulanan inhibitörlerin SW480

hücrelerindeki PSMD4 geninin western sonucu membran görüntüsü

I. Kontrol **II.** TGF-β **III.** TGF-β + Actinomisin **IV.** TGF-β + Cycloheximide **V.** TGF-β + MEKI **VI.** TGF-β + Wortmannin **VII.** TGF-β + SP600125 **VIII.** TGF-β + PD169316 **IX.** TGF-β + NFKB **X.** TGF-β + SIS3

Proteinler western analizi sonucunda membranda görüntüledikten sonra Bölüm 3.2.4.4’de bahsedilen analiz programlarından ImageJ ile bant boyutları sayısal verilere aktarıldı. Elde edilen sayısal veriler ile Graphpad programı ile analiz gerçekleştirildi ve grafik oluşturuldu (Şekil 4.15).



Şekil 4.15: Sinyal yollarının tespiti için uygulanan inhibitörlerin SW480

hücrelerindeki PSMD4 geninin protein seviyesinde ekspresyon seviyeleri. ($p < 0.05$)

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Proteazomlar hücrelerde 26S ve 20S formunda bulunmaktadır. 20S formu multikatalitik proteinazdır (Tanaka, vd., 1986, Yoshiruma, vd., 1993). Proteinin proteazom tarafından tanınmasını hedef proteine bağlanan ubikitin sağlamaktadır. Hücre apoptoz ve proliferasyonunda rol oynayan anahtar moleküller dahil olmak üzere hücre içi proteinin bozulmasından sorumlu birincil sinyal olan Ubiquitin-proteasome sistemi (UPS), tümör ilerlemesinde protein homeostazının düzenlenmesinde merkezi rol oynamaktadır. (Chen, vd., 2018, Yeh, vd 2018). 26S proteazomunun UPS'de görevi ise proteinlerin tanınması ve parçalanmasından sorumludur (Husnjak, 2008).

İnsan genomunda 41 kDa molekül ağırlığında protein kodlayan PSMD4 geni 1. kromozom uzun (q) kolunun 21.3 bölgesinde bulunmaktadır. PSMD4 Ubikuitin ile etkileşime giren motifler aracılığıyla bir ubikuitin reseptör alt birimi olarak hareket eder ve yıkım için ubikuitin-konjugatlarını seçer. Daha uzun poliubikuitin zincirleri için tercih edilen bir seçicilik göstermektedir (Fejzo, vd., 2017).

Yapılan çalışmalarda PSMD4 genin akut monositik lösemi hücre hattında, meme kanseri hücre dizisi; akciğer karsinomu hücre dizisi; rahim ağzı kanseri hücreleri; kolorektal adenokarsinom hücre dizisi; kolorektal adenokarsinom hücrelerinde mRNA ekspresyonu incelenmiştir.

Tez çalışmamızın konusu olan hepatosellüler karsinoma ve kolon kanseri çalışmaları ile ilgili ise PSMD4'ün aşırı ekspresyonu insan kolon kanseri hücrelerinde bulunmuştur (Lin, vd., 2016, Cheng, vd., 2018). Hepatosellüler karsinom (HCC) hücrelerinde PTEN/Akt yollarının düzenlenmesi yoluyla hücre proliferasyonunu artırır (Jiang, vd., 1995). HCC'de hücre proliferasyonunun azaltılması, PSMD4'ün susturulması ile gerçekleşmektedir (Türkoğlu, 2020).

Sitokinler sınırsız çoğalma, metastaz yapma, apoptozdan kaçınma, anjiyogenezi destekleme gibi birden fazla olaya sahiptirler. Normal hücresel homeostazı kontrol eden karmaşık sinyal

iletim yolları bu süreçleri düzenleyen sinyal yolları arasında dönüştürücü büyüme faktörü-beta (TGF- β) yolu bulunur. TGF- β yolu, hücrelerin büyüme inhibisyonu, proliferasyon, replikasyon, istila, metastaz, apoptoz, immün sürveyans ve anjiyogenezde negatif veya pozitif olarak katılma yeteneğine aracılık etmede karmaşık bir role sahiptir (Sonia, vd., 2006).

Literatürde bulunan çalışmalardan yola çıkılarak TGF- β sitokininin hepatosellüler karsinoma hücre hattı olan Hep3B hücrelerinde uygulayarak mRNA ve protein seviyesindeki etkileri belirlendi. mRNA düzeyinde ekspresyonun belirlenmesi için kontrol, 1 sa, 3 sa, 6 sa, 24 sa ve 48 sa olmak üzere deney grupları oluşturuldu. Rna elde edildikten sonra Real Time PCR ile sonuçlar analiz edildi. Bu sonuçlar doğrultusunda hepatosellüler karsinoma hücrelerinde uygulanan deneyde kontrol grubuna göre 1. Saatte anlamlı düzeyde mRNA seviyesinde yukarı regülasyon gözlemlendi.

TGF- β 'nın Hep3B hücrelerindeki sinyal yollarına cevabının incelenmesi için hücrelere inhibitörler uygulandı ve daha sonrasında Real Time PCR ile analiz gerçekleştirildi. Buna göre tüm saatlerde PSMD4 geninin TGF- β ile mRNA düzeyinde yukarı doğru regüle edildiği anlaşılmaktadır. Ancak istatistiki olarak anlamlı bir sonuç elde edilmemiştir.

Aynı şekilde SW480 kolon kanseri hücrelerinde TGF- β 'nın PSMD4 geninde ifadesinin incelenmesi için kontrol, 1 sa., 3 sa., 6 sa., 24 sa., 48 sa. deney grupları oluşturuldu ve TGF- β sitokininin cevabı incelendi. Buna deney sonucu verilerine göre 1 saatte PSMD4 geninin TGF- β ile mRNA düzeyinde anlamlı olarak yukarı doğru regüle edildiği anlaşılmaktadır. Buna göre SW480 hücrelerinde TGF- β PSMD4 mRNA sını 48 saat haricindeki zaman dilimlerinde yukarı doğru ekspre etmektedir. SW480 kolon hücrelerinde yapılan mRNA çalışmalarının sonucunda protein ekspresyon çalışmalarında mRNA 'da gözlenen TGF- β cevabındaki yukarı regülasyonun aynı şekilde korele gitmediği anlaşılmaktadır.

6. KAYNAKLAR (APA)

- Adams, J. (2003). The proteasome: structure, function and role in the cell. *Cancer Treat Rev.*, Suppl 1,3-9.
- Akhurst, R.J. And Derynck, R. (2001). TGF-13 Signaling in Cancera Double-Edged Sword. *Trends Cell Biol*, 11(11), 44-51.
- Barry, B. Lowitz And Dennis, A. (2002). *Casciato Medical Oncology & Principles Of Cancer Biology*.
- Bokoch, G.M. And Der, C.J. (1993). Emerging Concepts in The Ras Superfamily Of Gtpbinding Proteins. *FASEB J.* 7:750–59.
- Boring C. C, Squires T. S and Tong T. (1993). Cancer Statistics. *Cancer J. Clin*; (43): 7- 10
- Bosch, F.X., Ribes, J., Díaz, M. and Cléries, R. (2004). Primary liver cancer: worldwide incidence and trends. *Nov*;127(5 Suppl 1):S5-S16.
- Chai M. J., Cui Y., Fang M., Wang Q., Zhang A. J., Kuai J. H. Et al. (2019). Inhibition of PSMD4 blocks the tumorigenesis of hepatocellular carcinoma. Elsevier, Volume 702, Pages 66-74. *Cell.* 169(5): 792–806.
- Cheng Y. M., Lin P. L., Wu D. W., Wang L., Huang C. C., (2018). PSMD4 is a novel therapeutic target in chemoresistant colorectal cancer activated by cytoplasmic localization of Nrf2. *Oncotarget*;9:26342–26352.
- Cheng, Y., G. Zhang, and Li G. (2013). Targeting MAPK pathway in melanoma therapy. *Cancer and Metastasis Reviews* 32(3-4): p. 567-584.
- Christine, A., Lacubuzio, D. and Elizabeth, M. (2005). Epithelial neoplasms of the colorectum. In: *Gastrintestinal and Liver Pathology*. Churchill Livingstone Elsevier, 367-394.
- Collins, G. A. and Goldberg, A. L. (2017). The Logic of the 26S Proteasome. *169(5):792-806.* doi: 10.1016/j.cell.2017.04.023.
- Du. T., Song, Y., Ray, A., Wan, X., Yao, Y., Samur, M.K. et al. (2023). Ubiquitin receptor PSMD4/Rpn10 is a novel therapeutic target in multiple myeloma. *Blood.* 141(21):2599-2614.
- Eldridge, A. G. and Brien, T. O. (2010). Therapeutic strategies within the ubiquitin proteasome system. *Cell Death & Differentiation* volume 17, pages4–13.
- Espada, J., Moises, B.C., Prado, S.D. and Medina, V. (2009). Wnt Signaling and Cancer Stem Cells. *Clin Transl Oncol.* 11;411-427.

- Fattovich, G. Stroffolini, T., Zagni, I. and Donato, F., (2004). Hepatocellular carcinoma in cirrhosis: incidence and risk factors. *Gastroenterology*, 127 pp. S35-S50.
- Fearon, E.R. (1995). Molecular abnormalities in colon and rectal cancer. In *The Molecular Basis of Cancer*, ed. J Mendelsohn, P Howley, M Israel, L Liotta, pp. 340–57. Philadelphia: WB Saunders Co.
- Fejzo, M. S., Anderson, L., Chen, H. W., Guandique, E., Kalous, O., Conklin, D. et al. (2017). Proteasome ubiquitin receptor PSMD4 is an amplification target in breast cancer and may predict sensitivity to PARPi. *Genes chromosomes cancer* 56, 589-597.
- Ferlay, J, Bray, F, Pisani P, Parkin Dm. *Globocan (2002). Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide*. IARC CancerBase No. 5, version 2.0.
- Ferlay, J, Bray, F, Sankila, R, et al. (1999). *Cancer incidence, mortality and prevalence in the European Union*. Lyon: IARC Press.
- Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., et al. (2012). Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN”, *Int. J. Cancer*, 136 (2015), pp. E359-E386.
- Ferrell, K., Deveraux, Q., van Nocker, S. and Rechsteiner, M. (1996). Molecular cloning and expression of a multiubiquitin chain binding subunit of the human 26S protease. *FEBS Lett.* 381: 143–148.
- Foulkes, W.D. (1995). A tale of four syndromes: familial adenomatous polyposis, Gardner syndrome, attenuated APC and Turcot syndrome. *Q. J. Med.* 88:853–63.
- Gérald, J. P. (2007). Pathobiology of transforming growth factor β in cancer, fibrosis and immunologic disease, and therapeutic considerations volume 87, pages1077–1091.
- Guan, X.G., Guan, X.Q., Feng, K., Jian, R., Tian, D., Tong H.B. and Sun X., (2013). Reduction of angiocidin contributes to decreased HepG2 cell proliferation. *Afr Health Sci.* 2013 Sep; 13(3): 560–564.
- Gus, Y., Karni, R. And Levitzki, A., (2006). Subunit S5a of the 26S proteasome is regulated by antiapoptotic signals. *The Febs Journals*, 1742-4658.
- Hanahan, D. and Weinberg, R.A. (2000). The Hallmarks of Cancer. *Cell.*, 100, 57.
- Hardy, R.G., Meltzer, S.J., and Jankowski, J.A., (2004). ABC of colorectal cancer: Molecular basis for risk factors. *BMJ*, December, Vol. 321, pp. 886-889.
- Houlston, R., S., (2001). What we could do now: molecular pathology of colorectal cancer”, *F Clin. Pathol.: Mol. Pathol.* March, Vol. 54, pp. 206-214.

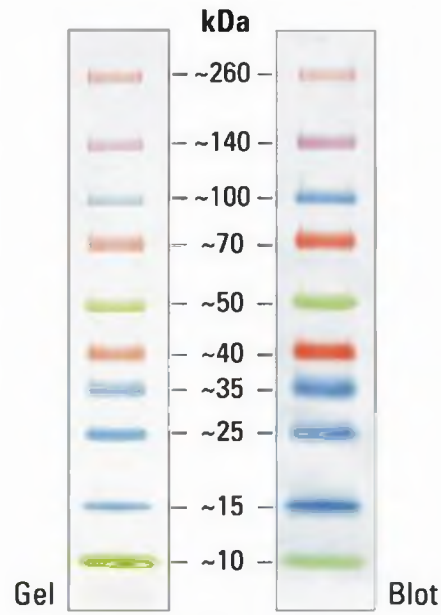
- Huang, S. and Huang, J. (2005). "TGF- β Control of Cell Proliferation", *J Cell Biochem*, 96, 447-462.
- Huang, T., Tian, W., Zhou, Q., Li, J., Jiang, Z., Chen, J. et al. (2021). Upregulation of Rpn10 promotes tumor progression via activation of the NF- κ B pathway in clear cell renal cell carcinoma. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. Jul 28;53(8):988-996. doi: 10.1093/abbs/gmab078.
- Husnjak, K., Elsasser, S., Zhang N., Chen, X., Randles, L., Shi, Y. Et al. (2008). Proteasome subunit Rpn13 is a novel ubiquitin receptor *Nature* volume 453, pages481–488
- Jakowlew, S., (2006). "Transforming growth factor- β in cancer and metastasis", *Cancer Met Rev.* 25, 435-457.
- Jemal, A., Bray, F., Center, M.M., Ferlay, J., Ward, E. and Forman, D. (2011). Global cancer statistics. *Mar-Apr;61(2):69-90.*
- Khor, B., Bredemeyer, A.L., Huang, C.Y., Turnbull, I.R., Evans, R., Maggi, L.B. Jr., et al., (2006). Proteasome activator PA200 is required for normal spermatogenesis. *Molecular and Cellular Biology*, 26, 2999–3007.
- Koleske, A. J. and Young, R. A. (1994). An RNA polymerase II holoenzyme responsive to activators. *Nature* 368, 466.
- Kumar, V., Abbas, A.K., Fausto, N. and Mitchell, R.N. (2007). *Robbins Basic Pathology*. 8th Edition, Saunders Elsevier, Philadelphia, 516-522.
- Kwak, E.L, Chung, D.C. (2007). Hereditary colorectal cancer syndromes: an overview. *Clin Colorectal Cancer; 6:340–4).*
- Lin, A.E. and Mak, T.W. (2007). The role of E3 ligases in autoimmunity and the regulation of autoreactive T cells. *Curr Opin Immunol; 19: 665–673.*
- Lin, P. L., Chang, J. T., Wu, D. W., Huang, C. C., Lee H., (2016). Cytoplasmic localization of Nrf2 promotes colorectal cancer with more aggressive tumors via upregulation of PSMD4. *Free Radical Biology and Medicine* Volume 95, Pages 121-132.
- Lodish, H., Berk, A., Matsudaira, P., Kaiser, CA., Krieger, M., Scott, MP. Et al. (2004). *Molecular cell biology*, 66–72.
- Lupas A, Koster A.J., Baumeister W (1993). *Enzyme Protein* 47: 252–273.
- Meyskens, F.L., McLaren, C.E., Pelot, D., (2008). Difluoromethylornithine plus sulindac for the prevention of sporadic colorectal adenomas: a randomized placebo-controlled, double-blind trial. *cancer prev res (phila)*, 1: 32.

- Midorikawa, Y., Tsutsumi, S., Taniguchi, H., Ishii, M., Kobune, Y., Kodama, T. Et al. (2002). Identification of Genes Associated with Dedifferentiation of Hepatocellular Carcinoma with Expression Profiling Analysis, *Jpn. J. Cancer Res.* 93, 636–643.
- Moses, H. L., Tucker, R. F., Leof, E. B., Coffey, R. J. Jr., Halper, J., & Shipley, G. D. (1985). Type β transforming growth factor is a growth stimulator and a growth inhibitor. In J. Feramisco, B. Ozanne & C. Stiles (Eds.), *Cancer Cells 3*. (pp. 67– 71). Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory.
- Özensoy, Ö., (2006). Kanser İlişkili Karbonik anhidraz IX ve XII İzoenzimlerinin (CAIX, CA-XII) Ekspresyonu, Saflastırılması ve Bazı Bilesiklere Karşı İnhibisyon Etkilerinin Araştırılması. Doktora Tezi, Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Balıkesir. Yükseköğretim Kurulu Ulusal Tez Merkezi veri tabanından erişildi (Tez No. 180163).
- Parkin, D.M, Whelan, S.L, Ferlay, J., Teppo, L., Thomas, D.B. (2002). Cancer incidence in five continents. Lyon: International Agency for Research on Cancer. Vol. VIII. IARC Scient. Publ. No. 155.
- Peters, J. M. (1994). Proteasomes: protein degradation machines of the cell. Volume 19, Issue 9, September 1994, Pages 377-382.
- Peters, J.M, Franke, W.W, Kleinschmidt, J.A. (1994). Distinct 19 S and 20 S subcomplexes of the 26 S proteasome and their distribution in the nucleus and the cytoplasm. *J Biol Chem.* 269.
- Pickart, C.M. (2001). Mechanisms underlying ubiquitination. *Annu Rev Biochem*; 70: 503–533.
- Ricchi, P., Zarrilli, R., Palma, A., Acquaviva, A.M. (2003). Nonsteroidal AntiInflammatory Drugs in Colorectal Cancer: From Prevention to Therapy. *British Journal of Cancer* 88: 803-807.
- Roberts, A., (1999). TGF- β signaling from receptors to the nucleus. *Microbes and Infection.* 1265-1273.
- Rosai, J. and Ackerman's (2004). Surgical Pathology. In: Rosai J. Gastrointestinal Tract, Large Bowel. Vol 1. 9 th ed: Mosby,:776-855.
- Smith, D.M., Chang, S.C., Park, S., Finley, D., Cheng, Y., Goldberg, A.L., (2007). Docking of the proteasomal ATPases carboxyl termini in the 20S proteasome's alpha ring opens the gate for substrate entry. *Molecular Cell*, 27, 731–744.
- Spirio, L., Olschwang, S., Groden, J., (1993). Alleles of the apc gene: an attenuated form of familial polyposis. Volume 75, Issue 5, cell, 75: 951.

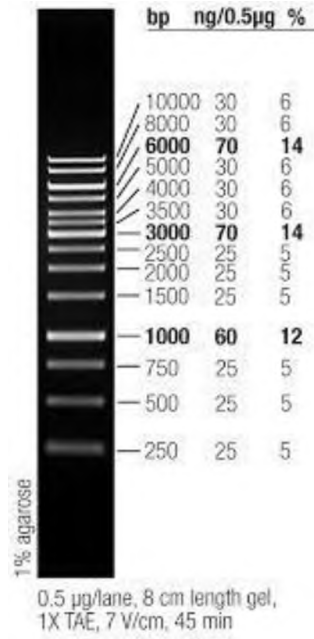
- Sonia, B. J. (2006). Transforming growth factor-beta cancer and metastasis. *Cancer Metastasis Rev. Sep*;25(3):435-57. doi: 10.1007/s10555-006-9006-2.
- Tanahashi, N., Tsurumi, C., Tamura, T., Tanaka K., (1993). Molecular Structures of 20S and 26S Proteasomes;47(4-6):241-51.
- Tanaka, K, Yoshimura, T., Ichihara, A., Kameyama, K. and Takagi, T. (1986). Developmental regulation of proteolytic activities and subunit pattern of 20 S proteasome in chick embryonic muscle *J. Biol. Chem.* 261: 15 204–15 207.
- Tanaka, K. and Tsurumi, C. (1997). The 26S proteasome: Subunits and functions. Page 3–11.
- Tsao, J, Shibata, D. (1994). Further evidence that one of the earliest alterations in colorectal carcinogenesis involves APC. *Am. J. Pathol.* 145:531–34.
- Türkoğlu, S., Dayı G., Köçkar F. (2020). Upregulation of PSMD4 gene by hypoxia in prostate cancer cells *Turk J Biol* . Oct 13;44(5):275-283.
- Ustrell, V., Hoffman, L., Pratt G., Rechsteiner, M., (2002). PA200 a nuclear proteasome activator involved in DNA repair”, *EMBO Journal*, 21, 3516– 3525.
- Wang, J., Maldonado, M.A. (2006). The Ubiquitin-Proteasome System and Its Role in Inflammatory and Autoimmune Diseases. *Cell Mol Immunol*, 3, (4),255– 61.
- WHO, (2018). Cancer, (online). 12 September 2018), <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>.
- Yeh, C., Bellon M., Nicot C. (2018). *Molecular Cancer* volume 17, Article number: 115 FBXW7: a critical tumor suppressor of human cancers.
- Yıldırım, H. (2009). Karbonik Anhidraz 9 Genin Transkripsiyonel Kontrolünün Moleküler Analizi. Doktora Tezi, Balıkesir Üniversitesi, Fen Bilimleri Üniversitesi, Biyoloji Anabilim Dalı, Balıkesir. (Tez no: 245497).
- Yoshimura, T., Kameyama, K., Takagi, T., Ikai, A., Tokunaga, F., Koide, T. Et al. (1993) ATP- and antizyme-dependent endoproteolysis of ornithine decarboxylase to oligopeptides by the 26 S proteasome. *J. Struct. Biol.* 111: 200–211.
- Zheng, S., Xu, X., Wu, J., Chen, J., Wang, W., Zhang, M. et al. (2008). Liver Transplantation for Hepatocellular Carcinoma: Hangzhou Experiences *Transplantation* 85(12):p 1726-1732, June 27.
- Zigo, M., Kerns, K., Sutovsky, M. and Sutovsky, P. (2018). Modifications of the 26S proteasome during boar sperm capacitation. *Cell Tissue Res.* Jun; 372(3): 591–601.
- Zwickl, P, Voges, D, Baumeister, W. (1999). The proteasome: a macromolecular assembly designed for controlled proteolysis. *Philos Trans R Soc Lond B: Biol Sci*; 354(1389): 1501–1511

EKLER

EK A: Çalışmada Kullanılan Büyüklük Belirteçeri



Şekil A.1: Protein Deneylerinde Kullanılan Büyüklük belirteci (Thermo Scientific, #26634)



Şekil A.2: DNA Deneylerinde Kullanılan Büyüklük Belirteci (Thermo scientific, #SM0311)