

AKÜ FEMÜBİD 19 (2019) 011004 (22-33)

AKU J. Sci. Eng. 19 (2019) 011004 (22-33)

Doi: 10.35414/akufemubid.428822

Araştırma Makalesi / Research Article

Kanser hücrelerinde Hipoksik Koşullarda ADAMTS2 İfadesinin Değişimi

SümeYYe AYDOGAN TÜRKÖĞLU¹, Arife Sinem GÜLTEKİN¹, Feray KÖÇKAR¹¹Balıkesir Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, BALIKESİRsaydogan@balikesir.edu.tr, <https://orcid.org/0000-0003-1754-0700>

Geliş Tarihi: 30.05.2018

; Kabul Tarihi: 20.03.2019

Öz

ADAMTS'ler (A Disintegrin And Metalloproteaz With Trombospondin Motifs; Trombospondin Motifli Matris Metalloproteazlar) dokuların yeniden düzenlenmesi, matris yapımı ve yıkımı gibi fizyolojik olaylarda rol aldığı gibi; kanser, kas-iskelet sistemi hastalıkları, enflamasyon, fibrozis gibi patolojik olaylarda da yer alır. ADAMTS ailesine ait 19 üye tanımlanmış ve birçok özelliğine göre gruplandırılmıştır. Bu gruplardan ADAMTS2, 3 ve 14 kollajen ADAMTS'leri oluşturur ve kollajen işlenmesinde görev alır. ADAMTS2'nin önemli özelliklerinden biri kollajenlerin amino uçlarının kesilip uzaklaştırılmasında görev alması yeni tespit edilen diğer bir fonksiyonu ise anti-anjiyogenik aktiviteye sahip olmasıdır. Hipoksik regülasyon hücresele düzeyde çok sayıda genin ifadesini etkileyen bir süreçtir. Hücrelerde meydana gelen hipoksiya ile başta HIF-1 olmak üzere birçok gen aktive olur. HIF-1 hücresele oksijen konsantrasyonundaki değişimleri algılayarak yanıt oluşturmadan sorumlu transkripsiyon faktörüdür. Çalışmamızda ilk kez ADAMTS2 geninin hipoksik regülasyonu çalışılmış ve farklı hücre hatlarında hipoksik koşullardaki değişimi mRNA seviyesinde tespit edilmiştir. Hipoksinin ADAMTS2 ifade düzeyi üzerindeki etkileri Saos-2, MG-63 (kemik karsinomu), PC-3, DU-145 (prostat karsinomu), MCF-7 (meme karsinomu), HT29, Colo-205 (kolon karsinomu), MKN-45 (gastrik karsinomu), Panc-1, Mia PaCa-2 (pankreas karsinomu), K-562 (insan kronik myeloid lösemi hücresi) ve HUVEC (insan umbilikal ven endotel hücresi) hücrelerinde değerlendirilmiştir. ADAMTS2'nin en çok MG-63 kemik karsinomda ifade olduğu tespit edilmiştir. Mia PaCa-2 ve K-562 hücrelerinde ise tespit edilebilir düzeyde ekspre olmadığı belirlenmiştir. Kimyasal hipoksi modeli oluşturulmuş ve ADAMTS2 mRNA seviyesi farklı hücre hatlarında incelenmiştir. DU-145, PC-3, HT-29, MCF-7 ve Saos-2 hücre hatlarında mRNA düzeyinde ADAMTS2 seviyesinin hipoksiyada arttığı tespit edilmiştir. En yüksek hipoksik cevap Saos-2 ve MCF-7 hücrelerinde gözlenmiştir.

Anahtar kelimeler

ADAMTS2; Kollojen;
Hipoksi; Anjiogenez;
Hücre hattı

Variation of ADAMTS2 Gene Expression in Hypoxic Conditions in Cancer

Cells

Abstract

ADAMTS (A Disintegrin And Metalloproteinase with Trombospondin Motifs) is involved in pathological events such as cancer, fibrosis, musculoskeletal disorders, inflammation as well as physiological events such as tissue reorganization, matrix building and destruction. 19 members of the ADAMTS family have been identified and grouped according to many characteristics. The important features of ADAMTS2 is processing the amino ends of the collagen and also has an anti-angiogenic activity. Hypoxic regulation is a process that affects the expression of many genes at the cellular level.

Keywords

ADAMTS2; Collagen;
Hypoxia; Angiogenesis;
Cell Line

Hypoxia activates many genes, mainly HIF-1 transcription factor which is responsible for detecting changes in cellular oxygen concentration and for generating responses. For the first time, the hypoxic regulation of ADAMTS2 gene was studied and the variation in hypoxic conditions was determined at the mRNA level using different cell lines. We evaluated the effects of hypoxia in the expression level of ADAMTS2 in different cell lines namely; Saos-2, MG-63 (bone carcinoma), PC-3, DU-145 (prostate carcinoma), MCF-7 (breast carcinoma), HT29, Colo-205 (colon carcinoma), MKN-45 (gastric carcinoma), Panc-1, Mia PaCa-2 (pancreatic carcinoma), K-562 (chronic myeloid leukemia cell) and HUVEC (umbilical vein endothelial cell). We found the most expression level in MG-63. Mia PaCa-2 and K-562 cells were not expressed detectable level of ADAMTS2. A chemical hypoxic model was constructed and the level of ADAMTS2 mRNA was examined. It has been determined that ADAMTS2 mRNA level is increased in hypoxia in DU-145, PC-3, HT-29, MCF-7 and Saos-2 cells. The highest hypoxic response was observed in Saos-2 and MCF-7 cells.

© Afyon Kocatepe Üniversitesi

1. Giriş

Estrasellüler matriks (EMS), doku ve hücreleri hem bağlayıcı hem de destekleyici bir iskelet oluşturur. Ayrıca, hücre yüzey reseptörlerini aktive ederek hücreler ve dokular arasındaki iletişimi sağlar. ESM'nin temel bileşenlerinden birisi olan kollajen memeli vücut ağırlığının % 6'sını, bütün vücut proteinlerinin ise yaklaşık % 30'unu oluşturur. Kollajenler üç polipeptit alt birimin sarmal yapı oluşturması ile yapı kazanmaktadırlar [Brodsky and Persikov 2005, Khun *et al.* 1987, Robert 2011]. Polipeptit alt birimi olan α -zincirleri ortak bir eksenle kıvrılarak iplikçikleri, iplikçikler de bir araya gelerek kollajen liflerini meydana getirir. Bu iplik ve lifler deride ve tendonda düzenli, kıkırdakta gevşek, akciğerde düzensiz bir ağ yapısına sahiptir. Kollajen iplikçik ve lifleri kemik ve dişlerde fosfat kristalleri olarak hücreler arası maddeye yerleşirler. Dokusal ve hücrel önemi yüksek olan kollajenlerin sentezlenmesi de bir o kadar önem arz etmektedir [Lodish *et al.* 2017]. Sentez sırasındaki kollajen tiplerinin ya da sentez için gerekli ara ürünlerin oluşmasındaki anomaliler sonucunda çeşitli mutasyonlar ve hastalıklar oluşabilir. Örneğin;

marfan sendromu, menke sendromu, çeşitli tipte alport sendromu, fibrozis, knobloch ve pigment dağılım sendromları, bruck sendromu, epidermoliz bulloza, çeşitli distrofi hastalıkları sayılabilir [Richard *et al.* 2005, Cömertoğlu vd. 2014, Martin and Shapiro 2007, Bell and White 2000, Bonaventure *et al.* 1992, Kantaputra 2002, Murayama *et al.* 2000, Chefetz *et al.* 2005, Forestier *et al.* 2008].

Kollajen biyosentezi sırasında kollajenler, öncül molekül olarak sentezlenir ve sonrasında olgunlaşmak üzere işlenir. İlk olarak kollajen, bağ doku fibroblastlarında intrasellüler prekürsör molekül halinde sentezlenir. Sentezlenme aşamasında ilk olarak ortaya çıkan kollajen prekürsörü, preprokollajendir. Daha sonra sırasıyla çeşitli modifikasyonlar geçirerek olgun kollajen lifler meydana gelir [Lodish *et al.* 2017, Persikov, and. Brodsky 2002].

Estrasellüler matriksin proteolitik işlenmesinde birçok proteaz aktivitesine sahip molekül rol oynar. Domain yapılarına göre bu moleküller çok sayıda protein ailesi olarak gruplandırılır. İlk grup, serin proteazlar; doku plazminojen aktivatörü, trombin,

plazmin, ve urokinazı bulundurur. İkinci grup, matriks metalloproteazlar (MMP); 23 üyeden oluşan yüksek oranda korunmuş Zn⁺⁺ bağımlı endopeptidazlardır. Bu iki grup ESM yıkımında ve kanser metastasında rol alır. Üçüncü grup, kemik farklılaşma protein 1/tolloid ailesi metalloproteazlarıdır. Dördüncü grup ise hücre-hücre adezyonu ve proteolizde görev alan ADAM (A Disintegrin and Metalloprotease; Disintegrin Metalloproteazları) olarak adlandırılan transmembran glikoproteinlerdir [Rocks et al., 2011, Chou and Chen 2008].

ADAMTS gen ailesine ait 19 üye tanımlanmıştır. ADAMTS üyeleri protein dizisi, domainlerin organizasyonu, substrat tercihi ve gen dizisi korunmuşluğuna göre gruplandırılmıştır [Kaushal and Shah 2000, Jones and Riley 2005]. Anti-anjiyogenik aktiviteye sahip olanlar: ADAMTS1, 8 ve 9, Agrekanazlar: ADAMTS1, 4, 5, 8, 9, 15, 16 ve 18, prokollajen N-proteazlar (pNP): ADAMTS2, 3 ve 14, Gonodal organ gelişiminde görev alanlar (GON): ADAMTS9 ve 20, von Willebrand faktörü kesen proteaz (vWFCP): ADAMTS13, Kıkırdak oligomerik matriks proteinler (COMP): ADAMTS7 ve 12'dir. Ailenin fonksiyonu ve substratları tam olarak aydınlatılmamış üyeleri olan Orphan (yetim) ADAMTS'ler: ADAMTS6, 10, 17, ve 19 olarak adlandırılmaktadır.

Prokollajen N-propeptidazlar; ADAMTS2, 3 ve 14 olmak üzere üç üyeden oluşur. Prokollajen kesim izoenzimleri olarak bilinirler ve kollajen biyosentezinde önemli görev alırlar. ADAMTS2 geni 5. kromozomun uzun kolunda (5q35.3) lokalize olur ve 22 ekzona sahiptir. 134 kDa ağırlığındadır ve 1211 amino asitten oluşur [Colige et al. 2002].

N-propeptidaz izoenzimlerinden ADAMTS2, prokollajenlerin işlenmesinin yanı sıra anti-anjiyogenik aktivitesine de sahiptir. Anti-anjiyogenik özellik, nude farelerde yapılan bir çalışma ile gösterilmiştir. HEK hücreleri tarafından farelerde tümör oluşturulduktan sonra hücrelere rekombinant ADAMTS2 transfekte edilmiş ve ADAMTS2'nin aşırı ifade edildiği zaman tümör oluşumunun hızla azaldığı görülmüştür. Bu sebeple tümör vaskülarizasyonu azalmış ve doğrudan anti-tümör ilişkili olduğu ispat edilmiştir. Ayrıca çalışmanın farklı bir basamağı olarak yapılan in vitro çalışmalarda, rekombinant ADAMTS2'nin hızlı bir şekilde endotel hücrelerin apoptozunu indüklediği görülmüştür [Dubail et al. 2010].

Hipoksik regülasyon hücresel düzeyde çok sayıda genin ifadesini etkileyen bir süreçtir. Hücrelerde meydana gelen hipoksiya ile başta HIF-1 olmak üzere birçok gen aktive olur. HIF-1 hücresel oksijen konsantrasyonundaki değişimleri algılamadan ve yanıt oluşturmadan sorumludur. Hipoksik koşullarda vücutta iki ana sinyalizasyon sistemi devreye girer: AMPK yolağı (AMP activated protein kinase; adenosin monofosfat aktive eden protein kinaz) ve HIF yolağı (hypoxia inducible factor; hipoksiya ile indüklenebilir faktör) [Malagelada et al. 2005]. Hücre içi ATP düzeyi azaldığında AMPK yolağı aktive olarak katabolik süreçleri hızlandırır ve anabolik süreçleri inhibe eder. HIF ise oksijen yetersizliği (hipoksi) durumunda memeli hücrelerinde hücresel yanıt oluşturur [Ouyang et al. 2005].

Oksijen algılama mekanizmasında "Von Hippel Lindau" molekülü görev alır. Hipoksiyada anahtar rol oynayan HIF üyelerinden HIF-1'in önemli

fonksiyonları vardır. HIF-1 oksijene hassas birim olan α ve yapısal alt birim olan β 'dan oluşur. HIF-1'in nükleer α alt ünitesi yapısal olarak işlev görürken α alt ünitesi regülatör bileşen olarak işlev görür. HIF-1 α alt ünitesi normal durumlarda kararsızdır ve bir süre sonra Von Hippel Lindau E ubiquitin ligaz kompleksinin bir parçası olan pVHL ile parçalanır ve hidrolize olur. Hipoksik koşullarda ise HIF-1 α proteozomal yıkımdan kaçır, sitozolde birikir, kararlı hale gelir, fosforillenir ve nükleusa geçerek heterodimerik bir kompleks meydana getirir. Bu kompleks hipoksiya ile indüklenebilen genlerin güçlendirici bölgesi ile bağlanır ya da promotor bölgesinde 50 baz çiftli bir DNA bağlanma motifi olan HRE (hypoxia response element; hipoksiya yanıt elementi) ile bağlanır ve hedef genlerin transkripsiyonlarını başlatır [Semenza 2000, Arslan 2012].

Hücrede hipoksiya ile beraber, başta HIF-1 olmak üzere eritropoietin (EPO), fibroblast büyüme faktörü (FGF), transferrin, laktik dehidrojenaz A, vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF), trombosit kökenli büyüme faktörü (PDGF) ve endotelin-1 gibi gen yolları aktive olur.

ADAMTS2 ile yapılan literatür çalışmaları göstermektedir ki ADAMTS2 proteini hücre için kollajen biyosentezinde olduğu kadar kanserleşme sürecinde de önemlidir. Farklı hücresel yollarda etkisi görülen ADAMTS2 geninin hipoksik koşullara verdiği cevap çalışmamız kapsamında araştırılmıştır. Kimyasal hipoksiya modeli, memeli hücrelerinde düşük oksijen koşullarındaki biyokimyasal ve moleküler cevap oluşturması nedeniyle düşük oksijen koşullarını taklit etmede kullanılmaktadır. Kimyasal hipoksiya modeli oluşturulurken kobalt

klorür (CoCl_2) solüsyonu kullanılmıştır. CoCl_2 HIF-1'i indükleyen açık kırmızı renkli kimyasal bir maddedir. Hücre büyüme ortamına verilen CoCl_2 , normal oksijen koşullarında HIF-1'i inhibe eden prolin hidrosilazlara bağlanarak onların aktivitesini durdurur. Böylece HIF-1 hidrosillenir ve degrade olur. Oksijen azlığında ise HIF-1 hidrosillenmez ve kararlı hale geçer. Böylece HIF-1 hipoksiya ile regüle olan diğer genleri uyararak ekspresyon düzeylerini azaltır ya da artırır.

Çalışmamız kapsamında hem fizyolojik hemde patofizyolojik süreçlerde aktivite gösteren ADAMTS2'nin hipoksik koşullardaki ekspresyon seviyesi incelenmiştir.

2. Materyal ve Metot

2.1 Hücrelerin Büyütülmesi

Çalışmalarımızda Saos-2/MG-63 (insan kemik karsinomu), PC-3/DU-145 (insan prostat karsinomu), MCF-7 (insan meme karsinomu), HT29/Colo-205 (insan kolon karsinomu), MKN-45 (insan gastrik karsinomu), Panc-1/Mia PaCa-2 (insan pankreas karsinomu), K-562 (insan kronik myeloid lösemi hücresi) ve HUVEC (insan umbilikal ven endotel hücresi) hücre hatları kullanılmıştır. Çalışmalarımızda kullanılan Saos-2/MG-63 hücreleri Dr. Kennent Brown University of Cardiff, UK; PC-3/DU-145 ve MCF-7 hücreleri Dr.Kemal Sami KORKMAZ Ege Üniveristesi, İzmir; HT29 hücreleri ŞAP Enstitüsü Hücre Kültür Bankası, ANKARA ve Panc-1/Mia PaCa-2 hücreleri ise ATTC (Amerikan Hücre Kültür Bankası) 'den temin edilmiştir. Çalışmalarda kullanılan tüm hücreler 2mM L-Glutamin ve %10 FCS içeren DMEM içerisinde, % 5 CO_2 içeren 37°C'de inkübatörde büyütülmüştür.

2.2 Canlı Hücrelerin Belirlenmesi ve Hücre Sayımı

Toplam hücre süspansiyonunun milimetresindeki hücre sayısını hesaplamak için, 1mm²lik alana ve 0.1 mm derinliğine sahip, üzeri 25 küçük birim kareye ayrılmış thoma lamı kullanıldı. Bu sayede hücrelerin toplam hacmi hesaplanabildi. Canlı ve ölü hücreleri ayırt edebilmek için hücre süspansiyonundan ve tripan mavi solüsyonundan 1:1 oranında eklendi ve hücrelerin boya ile muamele olması için yaklaşık 3-5 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Ölü hücreler mavi boyanırken canlı olan hücreler boyanmadı ve boyanmayan canlı hücreler tek tek sayıldı. Süspansiyonun mililitresindeki hücre sayısı hesaplandı. Bunun için sayım yapılan hücre sayısı önce sulandırma katsayısı (2) ile daha sonrada 10⁴ ile çarpıldı.

2.3 CoCl₂ ile Kimyasal Hipoksi Modelinin Oluşturulması

Farklı hücre hatları 25 cm²lik flasklara 2.000.000 hücre olacak şekilde ekildi. Hücrelerin bir gece flask yüzeylerine tutunması beklendi. 24, 48 ve 72 saat hiçbir şey uygulanmamış kontrol grupları normoksiya olarak işaretlendi ve diğer gruplara 150 µM CoCl₂ [Türkoğlu and Köçkar 2016.] uygulaması yapıldı ve hipoksik gruplar olarak işaretlendi. Daha sonra hipoksik etkinin incelenmesi için sırasıyla 24, 48 ve 72 saatlerde hücre pelletleri alındı.

2.4 Farklı Hücre Pelletlerinden RNA İzolasyonu ve cDNA Eldesi

ADAMTS2 geninin ifadenme düzeyini belirlemek amacıyla RNA izolasyonu gerçekleştirildi.

Bu amaçla Thermo Scientific-GeneJET RNA purification kiti kullanılarak kitin ön gördüğü

protokole uygun RNA'lar izole edildi. RNA örneklerinin miktar tayini spektrofotometrik ölçümlerle belirlendi. cDNA sentezi için 1 µg RNA örnekleri kullanılarak Reverse transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PZR) gerçekleştirildi.

2.5 Gerçek Zamanlı PZR (q-PZR)

mRNA ekspresyon çalışmalarında özgül olmayan floresan işaretli Syber green boyası kullanıldı ve gerçek zamanlı PZR (q-PZR) gerçekleştirildi. q-PZR çalışmaları için Light Cycler 485 (Roche Diagnostic) cihazı kullanıldı. 100 ng/µl forward ve reverse primerlerinden 0,5'er µl, 1 µg olacak şekilde 1 µl hacimde cDNA, 5 µl SYBR® Green PZR Master Mix ve 3 µl dH₂O kullanılarak son hacim 10 µl olacak şekilde q-PZR gerçekleştirildi. Her bir cDNA üç tekrarlı çalışıldı. mRNA çalışmalarında istenen genlerin ekspresyon düzeylerinin incelenmesi amacıyla primerler kullanıldı (Tablo 1) ve bu primerler için ortak bağlanma sıcaklığı 60°C olarak belirlendi.

Çizelge 1: Ekspresyon çalışmalarında kullanılan primerler ve dizileri.

Primer Adı	Primer Dizisi
ADAMTS2 Forward	5'CTGTGGCGACGAGGTGCG'3
ADAMTS2 Reverse	5'GGTGACACATAGTCCCGTCC'3
β2M Forward	5'TTTCTGGCCTGGAGGCTATC'3
β2M Reverse	5'CATGTCTCCATCCCACTTAACT'3
HIF-1α Forward	5'CCACCTATGACCTGCTTGGT'3
HIF-1α Reverse	5'TGTCCTGTGGTGACTTGCC'3

2.6 q-PZR Sonuçların Değerlendirilmesi ve İstatistiksel Analizler

Gerçek zamanlı PZR sonuçları Livak metoduna göre değerlendirildi [Livak and Schmittgen 2001]. ADAMTS2 geni için elde edilen Ct değerlerini normalize etmek amacıyla internal kontrol gen olan

insan $\beta 2$ Mikroglobulinin Ct ortalamasından çıkartıldı. Elde edilen değerin 2 tabanında kuvveti alındı. Kat mRNA türünde sonuç elde etmek için kontrol grupları kendisine bölünerek "1" birim olarak kabul edildi ve daha sonra ilgili saatlerde çalışılan deney sonuçları kontrol değerine bölündü. Veriler $p \leq 0,05$ olduğunda istatistiksel olarak anlamlı olarak kabul edildi.

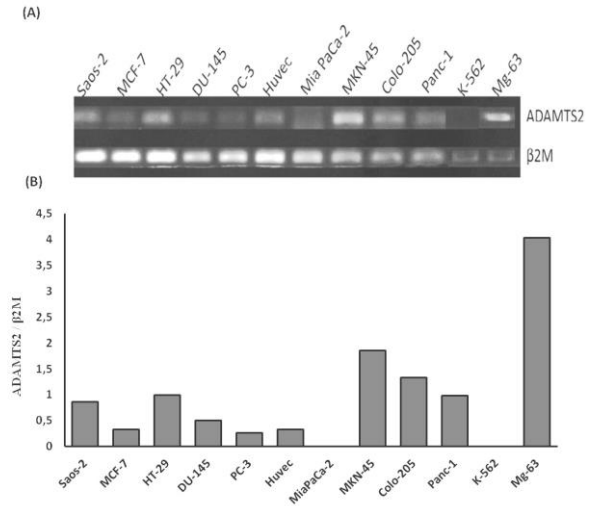
3. Bulgular

3.1 ADAMTS2'nin Farklı Hücre Hatlarındaki İfadesi

Literatürde ADAMTS2 ile ilgili yapılan ekspresyon analizlerine bakıldığında insana ait normal dokularda aort, kemik, cilt, tendon, mesane, retina, böbrek, akciğer, barsak, karaciğer, iskelet kasında ve fibroblast hücrelerinde ekspre olduğu bulunmuştur [Porter *et al.* 2005]. Epitel karakterli A549 (insan adenokarsinomik alveoler epitel hücresi), Calu-3 (akciğer adenokarsinomu), fibroblast karakterli MRC-5 (insan fetal akciğer fibroblast hücreleri), BT-20 (meme bezi/göğüs karsinomu), WI-38 (insan fibroblast benzeri fetal akciğer hücresi) hücre hatlarında ADAMTS2 ifadesi gösterilmiştir. Göz retinal pigment epitel hücre modeli olan ARPE-19 ile yapılan çalışmalarda TNF- α stimülasyonu sonrasında ADAMTS2 mRNA ve protein düzeyinde artış olduğu aydınlatılmıştır. Yapılan bir başka çalışmada şaşırtıcı olarak ADAMTS2'nin glukokortikoidler tarafından uyarılan makrofajlar ve periferik kan monositleri tarafından aşırı ekspre edildiği belirlenmiştir. Bu hücrelerin prokollajen işleme sürecine dahil olma şansı az olmasına rağmen doğal savunma mekanizmasına ait birkaç molekül (C1q, fikolinler, MBL) üçlü sarmal kollajen benzeri domaine sahip olduğu bulunmuştur [Hofer *et al.* 2008].

Çalışmamız kapsamında ADAMTS2 geninin farklı hücre hatları olan Saos-2/MG-63 (insan kemik karsinomu), PC-3/DU-145 (insan prostat karsinomu), MCF-7 (insan meme karsinomu), HT29/Colo-205 (insan kolon karsinomu), MKN-45 (insan gastrik karsinomu), Panc-1/Mia PaCa-2 (insan pankreas karsinomu), K-562 (insan kronik myeloid lösemi hücresi) ve HUVEC (insan umbilikal ven endotel hücresi) hücrelerindeki ekspresyon profillerini belirleyebilmek amacıyla spesifik ADAMTS2 ve insan $\beta 2M$ primerleri ile PZR gerçekleştirildi.

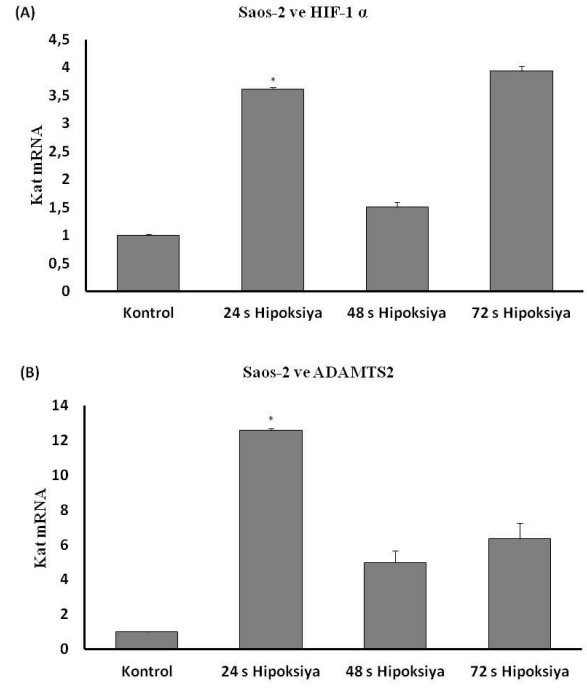
PZR sonuçları agaroz jelde görüntülendi ve jel görüntülerinin bilgisayar üzerinde ImageJ programı ile densitometrik analizi yapıldı (Şekil 1). Analize göre ADAMTS2 en çok MG-63 hücresinde, en az ise HUVEC hücresinde ekspre olduğu, Mia PaCa-2 ve K-562 hücrelerinde ise tespit edilebilir düzeyde ekspre olmadığı belirlendi.



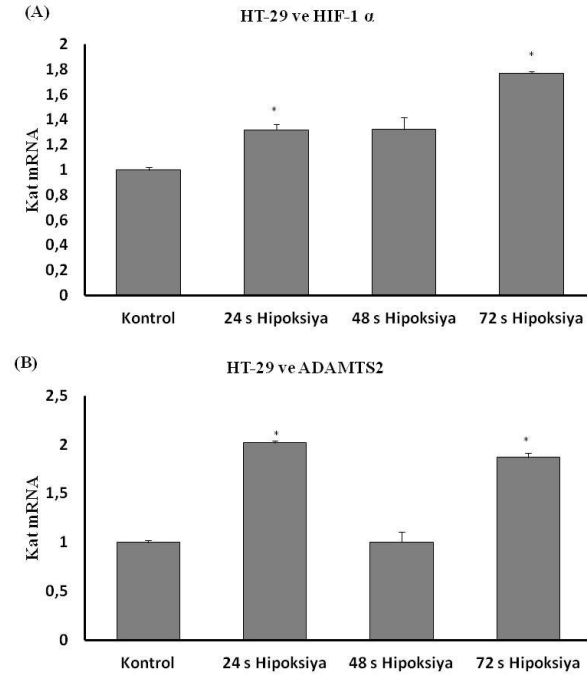
Şekil 1: (A) Farklı hücre hatlarında ekspresyon çalışmalarının agaroz jel elektroforezindeki görüntüleri, (B) ADAMTS2 ekspresyonunun densitometrik analizi.

Hipoksik regülasyon hücresel düzeyde çok sayıda genin ifadesini etkileyen bir süreçtir. Hücrelerde

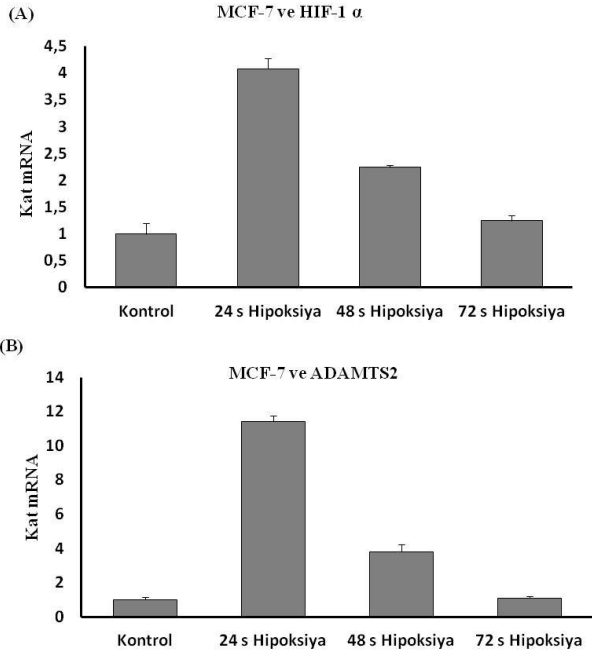
meydana gelen hipoksiya ile başta HIF-1 olmak üzere birçok gen aktive olur. HIF-1 hücrel oksijen konsantrasyonundaki değişimleri algılamadan ve yanıt oluşturmadan sorumludur. Tümör hücreleri hipoksiyaya yanıt olarak hücre çoğalması, hücre sağ kalımı ve anjiyogenez gibi moleküler programları uyarır. HIF-1 prostat, akciğer, meme, kolon, over, deri ve mide gibi birçok insan malign kanserlerinde aşırı ekspresyonu immunohistokimyasal analizler ile gösterilmiştir [Brusselmans *et al.* 2001]. Bu doğrultuda ADAMTS2'nin kanserle ilişkisi ve anti-angiogenik özelliği dikkate alınarak ifade olduğu tespit edilen farklı kanser hücre hatlarında hipoksiya çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Öncelikle hangi dozun hipoksik cevabı oluşturduğunun tespiti yapılmış ve bu dozun hücreler üzerinde sitotoksik etkisinin olup olmadığı test edilmiştir. 50, 100, 150 ve 200 μM CoCl_2 hücreler uygulanmış ve Real time PCR ile HIF-1 α düzeyi değerlendirilmiştir. HIF-1 α hipoksik koşulların belirteci olarak normal oksijen koşullarındaki düzeyi ile karşılaştırılmıştır. Ayrıca bu dozların sitotoksik etkisi MTT testi ile belirlenmiştir (Bu datalar makaleye konulmamıştır). Yapılan farklı konsantrasyonlardaki CoCl_2 uygulamalarından hücreler üzerinde toksik etki yaratmayan ve aynı zamanda en iyi HIF-1 cevabını oluşturan doz olarak 150 μM seçilmiştir. Hipoksiya için CoCl_2 kullanılarak kimyasal hipoksiya modeli oluşturulmuş ve böylece HIF-1 α 'nın farklı kanser hücrelerindeki ADAMTS2 seviyesi üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Hipoksiya çalışmaları mRNA seviyesinde incelenmiştir. Çalışmalar neticesinde DU-145, PC-3, HT-29, MCF-7 ve Saos-2 hücre hatlarında mRNA düzeyinde ADAMTS2 hipoksiyaya cevabı vermiştir (Şekil 2-5). Ancak en yüksek hipoksik cevap Saos-2 ve MCF-7 hücrelerinde gözlenmiştir.



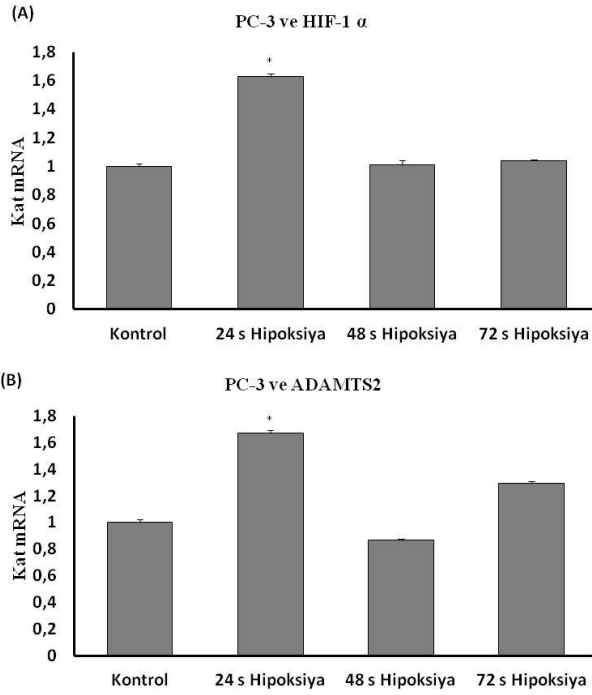
Şekil 2: Saos-2 osteosarkom kanser modelinde HIF1- α (A) ve ADAMTS2 (B) mRNA ifadesi



Şekil 3: HT-29 kolon kanser modelinde HIF1- α (A) ve ADAMTS2 (B) mRNA ifadesi



Şekil 4: MCF-7 Meme kanser modelinde HIF1- α (A) ve ADAMTS2 (B) mRNA ifadesi



Şekil 5: PC-3 Prostat kanseri modelinde HIF1- α (A) ve ADAMTS2 (B) mRNA ifadesi, DU-145 Prostat kanseri modelinde HIF1- α (C) ve ADAMTS2 (D) mRNA ifadesi

4. Tartışma ve Sonuç

ADAMTS ailesine ait ADAMTS2'nin birincil görevi tip I, II, III ve V prokollojenlerin amino propeptitlerini parçalamamaktır ve "aminoprokollojen peptidaz" olarak tanımlanmıştır [Dubail *et al.* 2010] ADAMTS2 proteini, inaktif zimojenler formda sentezlenir ve N-terminal propeptidi bir proprotein

dönüştürücü olan furin ile çıkarılır. Bu post-translasyonel modifikasyon proteinin aktivitesi için gereklidir [Tota *et al.* 2011]. ADAMTS2 eksikliği insanlarda resesif kalıtım gösteren bağ doku hastalığı olan dermatosparaksise (Ehlers–Danlos sendrom tip VIIC) neden olmaktadır [Le Goff *et al.* 2006, Wang *et al.* 2017]. Bu kalıtsal bağ dokusu bozukluğu, yanlış işlenmiş aminoprokollojenin birikiminin bir sonucu olarak ortaya çıkmakta ve hastalığın temel özelliği aşırı cilt kırılabilirliğidir [Dubail *et al.* 2010, Colige *et al.* 2005]. ADAMTS2, kalp dokusu da dâhil olmak üzere çeşitli yetişkin dokularında ifade olmakta ve çok sayıda fizyolojik süreçte görev almaktadır. Akut miyokard enfarktüsü geçiren hastalardan alınan koroner lezyon örneklerinde ADAMTS2'nin artmış ifadesi gözlenmiştir. ADAMTS2'nin akut miyokard enfarktüsü ve kardiyovasküler hastalık patogenezinde potansiyel bir rol oynadığını gösterilmiştir [Wang *et al.* 2017]. ADAMTS2'nin in vivo ve in vitro olarak nükleolin vasıtasıyla anti-anjiyojenik özellikler gösterdiğini ve bunun da hücre zarı ile ilişkili olduğu bulunmuştur [Dubail *et al.* 2010]. Akut miyeloid lösemi (AML) hastalarında nükleolin düzeylerinin belirgin şekilde yükseldiğini ve bu nükleolin aşırı ifadesinin DNA metil transferaz 1'in aşırı ifadesi ile ilişkili olduğu bulunmuştur [Shen *et al.* 2014]. ADAMTS2, anti-anjiyojenik özelliklerinden ötürü tümör baskılayıcı protein olarak rapor edilmiştir, ADAMTS2'yi içeren kromozomal yeniden düzenlenme ile işlevinin bozulabileceği tartışılmıştır. ADAMTS2 geninin yeniden düzenlenmesinin aktif bir proteinin üretiminden sorumlu olabileceği düşünülmüştür [Tota *et al.*

2011]. Grubumuz tarafından yapılan bir çalışmada ise IL-6'nın kemik kanser hücresi olan Saos-2 hücrelerinde ADAMTS2 genini transkripsiyonel olarak düzenlediği, mRNA ve protein düzeyinde ifadeyi arttırdığı bulunmuştur [Alper and Kockar 2014]. Yine bir başka çalışmada proinflatuar bir sitokin olan IL-1 α 'nın Saos-2 ve MG-63 hücrelerinde ADAMTS2 ve ADAMTS-3 gen ekspresyonlarını arttırdığını ilk kez grubumuzca göstermiştir [Alper and Kockar 2015].

Oksijen (O₂) homeostazı omurgalı yaşamı için oldukça önemlidir. Düşük O₂ seviyelerinde hipoksi indükleyici faktör-1 (HIF-1) tarafından anjiogenez, glukoz metabolizması, hücre proliferasyonu ve fizyolojik yanıtın düzenlenmesi ile ilgili pek çok genin ifadesi arttırılmaktadır [Semenza 2014]. Tümörün mikro çevresinde hipoksik koşullar oluşmaktadır [Rankin and Giaccia 2016]. Hipoksiyanın memeli hücrelerinde HIF-1 transkripsiyon faktörü tarafından düzenlenmektedir [Semenza 1991]. HIF aracılı hücre içi yollar gelişim, fizyoloji ve patofizyolojik süreçlerde etkindir. HIF 'in hedef aldığı gen ürünleri; O₂ verimini arttıran ve O₂ tüketimini azaltan proteinler olmak üzere iki belirgin kategoriye ayrılmaktadır. Özellikle, insan tümörlerinin büyük çoğunluğu bu gen ürünlerinin aşırı ifadesine sahiptir [Balamurugan 2016]. Tümör hücreleri hipoksiyaya yanıt olarak hücre çoğalması, hücre sağ kalımı ve anjiyogenez gibi moleküler programları uyarır. HIF-1 prostat, akciğer, meme, kolon, over, deri ve mide gibi birçok insan malign kanserlerinde aşırı ekspresyonu immunohistokimyasal analizler ile gösterilmiştir [Brusselmans *et al.*

2001]. Bu doğrultuda ADAMTS2'nin kanserle ilişkisi ve anti-angiogenik özelliği dikkate alınarak ifade olduğu tespit edilen farklı kanser hücre hatlarında hipoksiya çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Hipoksiya için CoCl₂ kullanılarak kimyasal hipoksiya modeli oluşturulmuş ve böylece HIF-1 α'nın farklı kanser hücrelerindeki ADAMTS2 etkisi araştırılmıştır. Hipoksiya çalışmaları için hücre kültürü ortamında birçok kanser hücre hattında hipoksik koşul oluşturmak için 24, 48 ve 72 saat hipoksiya gruplarına 150 µM CoCl₂ uygulanırken 24, 48 ve 72 saat normoksiya gruplarına hiçbir şey uygulanmamıştır. Hipoksiya çalışmaları mRNA seviyesinde incelenmiştir. Çalışmalar neticesinde DU-145, PC-3, HT-29, MCF-7 ve Saos-2 hücre hatlarında mRNA düzeyinde ADAMTS2 hipoksiyaya cevabı vermiştir. Ancak en yüksek hipoksik cevap Saos-2 ve MCF-7 hücrelerinde gözlenmiştir. Kanserleşme sürecinde hipoksik mikroçevre kanserin ilerlemesi ve yayılımı için oldukça önemlidir. Yaptığımız bu çalışma ile hem kollejen metabolizmasında hem de anti-angiogenik görevi tespit edilen ADAMTS2 geninin hipoksik koşullara yanıt verdiği tespit edilmiştir. Bu proteinin kanserleşme sürecindeki rolünün tam olarak aydınlatılabilmesi için hipoksik koşulların da dikkate alınması gerekliliği görülmektedir. Yaptığımız bu çalışma ile hipoksik koşullarda ifadesinin arttığı ilk kez tarafımızca tespit edilen bu proteinin daha detaylı olarak çalışılması ve regülasyonun kapsamlı olarak aydınlatılmasına ihtiyaç vardır.

5. Kaynaklar

- Alper, M. and Kockar, F., 2017. IL-6 Upregulates a Disintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin Motifs 2 (Adamts-2) in Human Osteosarcoma Cells Mediated by Jnk Pathway. *Molecular and Cellular Biochemistry*, **393(1-2)**, 165-75.
- Alper, M., Aydemir, A. T., and Kockar, F., 2015. Induction of human ADAMTS-2 gene expression by IL-1 alpha is mediated by a multiple crosstalk of MEK/JNK and PI3K pathways in osteoblast like cells. *Gene*, **573, 2**, 321-327.
- Arslan, N., 2012. Resveratrolün Hipoksi- Reoksjenasyon İle İndüklenen In Vitro Endotel Hücreleri Hasarına Etkisinin ve Nrf2'nin Olası Rolünün Araştırılması. Doktora tezi, Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İzmir, 129.
- Balamurugan, K., 2016. HIF-1 at the Crossroads of Hypoxia, Inflammation and Cancer. *International Journal of Cancer*, **138(5)**, 1058-66.
- Bell, R.B. and White, R.P., 2000. Osteogenesis imperfecta and orthognathic surgery: case report with long- term follow-up. *The International journal of adult orthodontics and orthognathic surgery*, **15**:171-178.
- Bonaventure, J., Stanescu, R., Stanescu, V., Allain, J.C., Muriel, M.P. and Ginisty, D. et al., 1992. Type II collagen defect in two sibs with the Goldblatt syndrome, a chondrodysplasia with dentinogenesis imperfecta, and joint laxity. *American Journal of Medical Genetics*, **44**, 738-53.
- Brodsky, B. and Persikov, A. V., 2005. Molecular structure of the collagen triple helix. *Advances in Protein Chemistry*, **70**: 301-39.
- Brusselmans, K., Bono, F., Maxwell, P., Dor Y, Dewerchin, M., Collen, D., Herbert, J.M. and Carmeliet, P., 2001. Hypoxia-inducible factor 2-α (HIF-2α) is involved in the apoptotic response to hypoglycemia but not to hypoxia. *Jornal of Biological Chemistry*, **276**: 39192-39196.
- Chefetz, I., Heller, R., Galli Galli-Tsinopoulou, A., Richard, G., Wollnik, B. and Indelman, M. et al., 2005. A novel homozygous missense mutation in FGF23 causes

- Familial Tumoral Calcinosi associated with disseminated visceral calcification. *Human Genetics*, **118(2)**, 261-266.
- Chou, C.W. and Chen, C.C., 2008. HDAC inhibition upregulates the expression of angiostatic ADAMTS1. *FEBS Letters*, **582**, 4059–4065.
- Colige, A., Ruggiero, F., Vandenberghe, I., Dubail, J., Kesteloot, F., Van Beeumen, J., Beschin, A., Brys, L., Lapiere, C.M., and Nusgens, B., 2005. Domains and Maturation Processes That Regulate the Activity of Adamts-2, a Metalloproteinase Cleaving the Aminopropeptide of Fibrillar Procollagens Types I-III and V. *Journal of Biological Chemistry*, **280(41)**, 34397-408.
- Colige, A., Vandenberghe, I., Thiry, M., Lambert, C.A., Van Beeumen, J. and Li S.W. et al., 2002. Cloning and characterization of ADAMTS-14, a novel ADAMTS displaying high homology with ADAMTS-2 and ADAMTS-3. *Journal of Biological Chemistry*, **277**:5756-66.
- Cömertoğlu, İ., Sarıkaya, E., Demirel, M., Akyol, S. ve Demircan, K., 2014. Role of ADAMTS Gene Family in Obstetrics and Gynecology. *The Journal of Gynecology Obstetrics and Neonatology*, **11**, 4, 144-149.
- Dubail, J., Kesteloot, F., Deroanne, C., Motte, P., Lambert, V., Rakic, J. M., Lapiere, C., Nusgens, B. and Colige, A., 2010. ADAMTS-2 functions as anti-angiogenic and anti-tumoral molecule independently of its catalytic activity. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **67 (24)**, 4213-32.
- Dubail, J., Kesteloot, F., Deroanne, C., Motte, P., Lambert, V., Rakic, J.M., Lapiere, C., Nusgens, B., and Colige, A., 2010. Adamts-2 Functions as AntiAngiogenic and Anti-Tumoral Molecule Independently of Its Catalytic Activity. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **67(24)**, 4213-32.
- Forestier, I.B., Berdal, A., Vinckier, F., Ravel, T., Fryns, J.P. and Verloes, A., 2008. The genetic basis of inherited anomalies of teeth. Part 2: Syndromes with significant dental involvement. *European Journal of Human Genetics*, **51**, 383-408.
- Hofer, T.P., Frankenberger, M., Mages, J., Lang, R., Meyer, P. and Hoffmann, R. et al., 2008. Tissue-specific induction of ADAMTS2 in monocytes and macrophages by glucocorticoids. *Journal of Molecular Medicine (Berl)*, **86**:323–32.
- Iozzo, R. V., Goldoni, S., Berendsen, a.d., Young, M.F., 2011. The Extracellular Matrix: An Overview, Mecham, R., Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 197.
- Jones, G.C. and Riley, G.P., 2001. ADAMTS proteinases: a multi-domain, multi-functional family with roles in extracellular matrix turnover and arthritis. *Arthritis Research and Therapy*, **7**, 4, 160.
- Kantaputra, P.N., Apparently new osteodysplastic and primordial short stature with severe microdontia, opalescent teeth, and rootless molars in two. *American Journal of Medical Genetics*, **111**, 420-8.
- Kaushal, G.P. and Shah, S.V., 2000. The new kids on the block: ADAMTSs, potentially multifunctional metalloproteinases of the ADAM family. *The Journal of Clinical Investigation*. **105**, 10, 1335.
- Khun, K., Mayne, R. and Burgeson, R., 1987. Structure and Function of Collagen Types. *Academic Press*, **2814-2**.
- Le Goff, C., Somerville, R.P., Kesteloot, F., Powell, K., Birk, D.E., Colige, A.C., and Apte, S.S., 2006. Regulation of Procollagen Amino-Propeptide Processing During Mouse Embryogenesis by Specialization of Homologous Adamts Proteases: Insights on Collagen Biosynthesis and Dermatosparaxis. *Development*, **133(8)**, 1587-96.
- Livak, K.J. and Schmittgen T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔC_T} Method. *Methods*, **25 (4)**, 402–408.
- Lodish, H., Berk, A., Kalsner, C.A., Krieger, M., Scott, M.P., Bretscher, A., Ploegh, H. and Matsudaira P., 2007. Moleküler hücre biyolojisi. Palme yayıncılık, W.H. Freeman and company, New York. 1150.
- Malagelada, C., Xifro, X., Minano, A., Sabria, J. and Alvarez, J.A., 2005. Contribution of caspase-mediated apoptosis to the cell death caused by oxygen-glucose deprivation in cortical cell cultures. *Neurobiology of Disease* **20**:27-37.
- Martin, E. and Shapiro, J.R., 2007. Osteogenesis imperfecta: epidemiology and pathophysiology. *Current Osteoporosis Reports*, **5**, 91-97

- Murayama, T., Iwatsubo, R., Akiyama, S., Amano, A. and Morisaki, I., 2000. Familial hypophosphatemic vitamin D resistant rickets: dental findings and histologic study of teeth. *Oral Surgery Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics*, **90**, 310-6.
- Ouyang, Y.B., Xu, L. and Giffard, R.G., 2005. Geldanamycin treatment reduces delayed CA I damage in mouse hippocampal organotypic cultures subjected to oxygen glucose deprivation. *Neuroscience Letters*, **380**:229-233.
- Persikov, A.V. and Brodsky, B., 2002. Unstable molecules form stable tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the America, Piscataway*, **5**, 99 (3), 1101-3.
- Porter, S., Clark, I.M., Kevorkian, L. and Edwards, D.R., 2005. The ADAMTS metalloproteinases. *Biochemical Journal*, **15**, 386(Pt 1), 15-27.
- Rankin, E.B. and Giaccia, A.J., 2015. Hypoxic Control of Metastasis. *Science*, **352(6282)**, 175-80.
- Richard, K., Ines, D., Grant, N.W. and Dylan, R.E., 2015. The ADAMTS (A Disintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin motifs) family. *Genome Biology*, **16**,1, 115.
- Rocks, N., Paulissen, G., El Hour, M., Quesada, F., Crahay, C., Gueders, M., Foidart, J.M., et al., 2011. ADAM-8, a metalloproteinase, drives acute allergen induced airway inflammation. *European Journal of Immunology*, **41**, 2, 380-91.
- Semenza, G.L., 2000. Surviving ischemia: adaptive responses mediated by hypoxia-inducible factor 1. *Journal of Clinical Investigation*, **106**, 809- 812.
- Semenza, G.L., 2014. Oxygen Sensing, Hypoxia-Inducible Factors, and Disease Pathophysiology. *Annual Review of Pathology*, **9**, 47-71.
- Semenza, G.L., Neufelt, M.K., Chi, S.M., and Antonarakis, S.E., 1991. Hypoxia-inducible Nuclear Factors Bind to an Enhancer Element Located 3' to the Human Erythropoietin Gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **88**, 13, 5680- 5684.
- Shen, N., Yan, F., Pang, J., Wu, L.C., Al-Kali, A., Litzow, M.R., and Liu, S. 2014. A Nucleolin-Dnmt1 Regulatory Axis in Acute Myeloid Leukemogenesis. *Oncotarget*, **5**, 14, 5494-509.
- Tota, G., Coccaro, N., Zagaria, A., Anelli, L., Casieri, P., Cellamare, A., Minervini, A., Minervini, C.F., Brunetti, C., Impera, L., Carluccio, P., Cumbo, C., Specchia, G., and Albano, F., 2014. Adamts2 Gene Dysregulation in T/Myeloid Mixed Phenotype Acute Leukemia. *BMC Cancer*, **14**, 963.
- Türkoğlu S. and Köçkar F., 2016. SP1 and USF differentially regulate ADAMTS1 gene expression under normoxic and hypoxic conditions in hepatoma cells. *Gene*, **575**, 1, 48-57.
- Wang, X., Chen, W., Zhang, J., Khan, A., Li, L., Huang, F., Qiu, Z., Wang, L., and Chen, X., 2017. Critical Role of Adamts2 (a Disintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin Motifs 2) in Cardiac Hypertrophy Induced by Pressure Overload. *Hypertension*, **69**, 6, 1060-1069.