Kolorektal kanser hücrelerinde Siklooksijenaz -2 (COX-2)'nin sodyum bütirat aracılı transkripsiyon sonrası regülasyonu

Program Kodu: 1001

Proje No: 215Z107

Proje Yürütücüsü:
Prof. Dr. Sreeparna BANERJEE

Araştırmacı:
Dr. Oğr Üye. Sinem Tunçer Gurbanov

Bursiyer:
Dr Shabnam Enayat

Nisan 2019

ANKARA

Önsöz

Bu çalışmada, bağırsak mikrobiyotası tarafından üretilen kısa zincirli bir yağ asidi olan bütiratın, bağırsak epitel hücrelerinde inflamasyon üzerindeki etkisi, post-transkripsiyonel düzenlenme mekanizmasına odaklanarak araştırılmıştır. Çalışma sonuçları bütiratın, inflamatuar bir enzim olan siklooksigenaz-2 (COX-2)'nin mRNA kararlılığını, RNA'ya bağlanan proteinlerin ifadelerinde ve aktivasyonlarında değişimlere neden olarak düzenlediğini ortaya koymuştur.

Bu proje TÜBİTAK 1001– Kimya Biyoloji Araştırma Grubu tarafından desteklenmiştir.

İçindekiler

Özet 1
Abstract 2
1. GİRİŞ 3
1.2 Çalışmanın Amacı 5
2. LİTERATÜR ÖZETİ 6
3. GEREÇ VE YÖNTEM 8
3.1 Hücre Büyütülmesi ve Alt Kültürleme 8
3.2 Protein Eldesi 8
3.3 RNA İzolasyonu ve cDNA Sentezi 9
3.4 Kantitatif Gerçek Zamanlı PZR (qRT-PZR) 9
3.5. Koloni PZR 10
3.6. Yüksek doğruluklu PZR 11
3.7. PGE_2 için Enzime Bağlı İmmunosorbent Testi (ELISA) 11
3.8 Klonlama 11
3.8.1 RBP'lerin Memeli Gen İfade Vektörüne Klonlanması 11
3.8.1.1. CUGBP2 geninin klonlanması 12
3.8.1.2. HuR geninin klonlanması 12
3.8.2. ARE Bölgelerinin Memeli Gen İfade Vektörüne Klonlanması 13
3.8.2.1 ARE Bölgelerinin Klonlanması 13
3.8.2.2. COX-2 ARE ve DELTA ARE Bölgelerinin Klonlanması 14
3.9 Bakteri Transformasyonu 14
3.10 Caco-2 ve HT-29 hücrelerinde NF-κB Aktivitesinin Raportör gen Analizi ile Belirlenmesi 15
3.11 HEK293, Caco-2 ve HT-29 Hücrelerinde COX-2 3'UTR Aktivitesinin Raportör Gen Analizi ile Belirlenmesi 15
3.11.1 HEK293 hücrelerinde EGFP analizi 15
3.11.2 Caco-2 ve HT-29 hücrelerinde EGFP analizi 16
3.12 HT-29 ve Caco-2 hücrelerinin akış sitometrisi ile senkronizasyonları ve hücre döngüsü analizi 16
3.13 Caco-2 Hücrelerinde ARE Bölgelerinin Aktivitesinin Tayini için Lusiferaz Raportör Gen Analizi 17
3.14. Western blot 18
3.15. RNA- İmmün Çöktürme 18

3.16 Biyoinformatik analizleri 20
3.16. İstatistiksel Analizler 21
4. BULGULAR 22
4.1 NaBt muamelesinin COX-2 gen ifadesine etkisinin belirlenmesi 22
4.1.1 NaBt muamelesinin referans gen ifadesine etkisinin belirlenmesi 22
4.1.2 NaBt muamelesinin PTGS-2 genin mRNA ifadesine etkisinin belirlenmesi 23
4.1.3 NaBt muamelesinin COX-2 protein ifadesine etkisinin belirlenmesi 24
4.1.4 NaBt'ın PGE_2 sentezine etkisi 26
4.2. Gen ifadesinin post-transkripsiyonel düzenlenmesinde NaBt'ın rolü 27
4.2.1. COX-2'nin transkripsiyonel düzenlenmesinde NaBt'ın etkisi 27
4.3 NaBt'ın COX-2 mRNA Kararlılığına Etkisinin Aktinomisin D Kullanılarak İncelenmesi 30
4.4. COX-2 3'UTR kararlılığının raportör gen ile araştırılması 33
4.5 RBP'lerin ifadesinde NaBt'ın rolünün in silico analizi 39
4.6 NaBt ile muamele edilmiş Caco-2 ve HT-29 hücrelerinde RBP'lerin ifadesi 42
4.7 RBP'lerin sitoplazmaya yer değiştirmesinde rol alan sinyal yolağının açıklanması 49
4.8 HuR'un kendi bağlanma sekanslarına bağlanmasında ve aktivitesinde NaBt'ın etkisi 55
4.9 NaBt varlığında HuR'ın ARE sekanslarınabağlanmasının RNA immün çöktürme ile incelenmesi 57
5. TARTIŞMA VE SONUÇ 60
6. KAYNAKÇA 66

Şekil ve Tablo Listesi

Şekil 1. NaBt ile 48 saat boyunca muamele edilen Caco-2 hücrelerinde, RPL0, RAB7A, RPL13A ve ACTB mRNA ifadelerinin qRT-PCR kullanılarak incelenmesi..... 22
Şekil 2. Farklı NaBt konsantrasyonlarıyla 48 saat ve 6, 12 ve 24 saat muamele edilmiş Caco-2 hücrelerinde COX-2 mRNA ifadesi. 23
Şekil 3. Farklı NaBt konsantrasyonları ile 24 saat ve 48 saat muamele edilmiş HT-29 hücrelerinde COX-2 mRNA ifadesinin RT-qPCR ile analizi. 24
Şekil 4. NaBt muamelesinin Caco-2 ve HT-29 hücrelerinde COX-2 protein ifadesine olan etkisi. 25
Şekil 5. NaBt'ın PGE_2 sentezine etkisi. 27
Şekil 6. NaBt ile muamele edilen hücrelerde NF-κB p65 nükleer yer değiştirmesini gösteren Western Blot. 28
Şekil 7. NaBt ile muamele edilen hücrelerde NF-κB transkripsiyonel aktivitesini gösteren Lusiferaz deneyi. 29
Şekil 8. NaBT'ın mRNA sentezinin durdurulması durumunda COX-2 mRNA stabilitesine etkisi. 31
Şekil 9. Caco-2 hücrelerinde NaBT'ın mRNA sentezinin durdurulması durumunda COX-2 protein ifadesine olan etkisi. 32
Şekil 10. NaBt muamelesi karşısında psiCHECK2 lusiferaz ve pGWIZ RPSM30 EGFP vektör sistemlerinde raportör aktivitesindeki değişimler..... 34
Şekil 11. CUGBP2 aşırı ifadesinin COX-2 ARE aktivitesine ve COX-2 protein ifadesine etkisi. 35
Şekil 12. HuR aşırı ifadesinin COX-2 ARE aktivitesine ve COX-2 protein ifadesine etkisi. 36
Şekil 13. NaBt muamelesi karşısında pGWIZ RPSM30 Nanoluc vektör sistemlerinde raportör aktivitesindeki değişimler. 37
Şekil 14. 3'UTR aktivitesinde NaBt'ın etkisini gösteren Lusiferaz analizi. 39
Şekil 15. NaBt ile muamele edilen fare kolon epitel hücrelerinde birçok RBP'nin azalışını gösteren ısı haritası. 40
Şekil 16. NaBt valığında RBP'lerin azalmasının zamana dayalı olduğunu gösteren GSE4410 analizi. 41
Şekil 17. HT-29 ve Caco-2 hücrelerinde NaBt muamelesinin AUF1 protein ifadesine etkisi. 44
Şekil 18. HT-29 ve Caco-2 hücrelerinde NaBt muamelesinin HuR protein ifadesine etkisi. 46
Şekil 19. HT-29 ve Caco-2 hücrelerinde NaBt muamelesinin CUGBP2 protein ifadesine olan etkisi. 47
Şekil 20. HT-29 ve Caco-2 hücrelerinde NaBt muamelesinin TIAR protein ifadesine olan etkisi. 49
Şekil 21. NaBt ile 48 sa. muamele edilen Caco-2 ve HT-29 hücrelerinde p38 ve MK2 sinyal aksisinin fosforlanması. 50
Şekil 22. SAHA ile 24 sa. muamele edilen Caco-2 ve HT-29 hücrelerinde MK2 fosforlanması. 51
Şekil 23. NaBt ile muammele edilmiş HT-29 hücrelerinde senkronizasyon için gece boyu aç bırakma sonrası hücre döngüsü profili. 52

Şekil 24. 3,6,9 ve 12 sa. NaBt ile muamele edilen senkronize HT-29 hücrelerinde Chk2 fosforlanmasındaki artış. 53
Şekil 25. 3-12 sa. NaBt ile muamele edilmiş senkronize HT-29 hücrelerinde HuR'ın sitoplazmik seviyesi. 54
Şekil 26. 6 sa. NaBt ile muamele edilmiş senkronize Caco-2 hücrelerinde Chk2 fosforlanması. 55
Şekil 27. Farklı Nanoluc raportör yapılarının 3'UTR aktivitesinde, HuR aşırı ifadelenmesiyle birlikte NaBt'ın etkisi. 56
Şekil 28. HuR'un eIF4E 3'UTR'ına bağlanmasının RNA immün çöktürme ile belirlenmesi. 57
Şekil 29. NaBt varlığında COX-2 3'UTR'sine HuR bağlanmasında azalmanın RNA immün çöktürme ile gösterilmesi. 58
Şekil 30. Bir HuR bağlanan ARE sekansına, NaBt varlığında HuR bağlanmasındaki azalmanın RNA immün çöktürme ile gösterilmesi. 59

Tablo 1. Çalışmada kullanılan primerlerin dizileri, çoğalttıkları gen bölgelerinin uzunlukları ve PZR'de kullanılan yapışma sıcaklıkları gösterilmiştir. 10
Tablo 2. pGWIZ RPS30M vektörüne klonlamak için HuR ve CUGBP genlerinin çoğaltılmasında kullanılan primerler ve pGWIZ RPS30M SuperNanoLuc vektörüne klonlamak için COX-2 ARE ve DELTA ARE bölgelerinin çoğaltılması için kullanılan primerler gösterilmiştir. 13
Tablo 3. pGWIZ RPS30M SuperNanoLuc vektörüne klonlanan ARE sekansları için kullanılan oligo dizileri sens ve anti-sens olarak gösterilmiştir. 14
Tablo 4. Çalışmada kullanılan antikorların adları ve taşıyıcı hayvanı tabloda gösterilmiştir. 18

Şema 1. AUF1'in uçbirleştirme (alternatif splicing) ile üreten dört varyantı……..43

Özet

Kısa zincirli yağ asitleri bağırsakta komensal bakteriler tarafından üretilmektedir ve bunların inflamasyonu azalttıkları bilinmektedir. Saptanan mekanizmalar içerisinde, siklooksigenaz-2 (COX-2) gibi inflamatuar proteinlerin ve sitokinlerin ifadesinde transkripsiyonel inhibasyon bulunmaktadır. Birkaç çalışma bütiratın inflamatuvar genlerin mRNA kararlılığını değiştirebileceğini belirtmektedir; fakat mekanizmalar açıklanmamıştır. Bu projede, kolon kanseri hücre hatlarının sodyum bütirat ile muamele edilmesinin, birçok inflamatuar mRNA'nın kararlılığını arttırdığı bilinen bir RNA'ya bağlanan protein olan HuR'nin sitoplazmadaki düzeyinde azalmaya neden olduğunu tespit edilmiştir. Mekanistik olarak, sitoplazmik HuR miktarındaki azalmanın, HuR'un fosforlanmasını ve çekirdekte tutulmasını düzenleyen protein Chk2'nin fosforlanmasındaki artma ve p38 ile MK2 proteinlerinin fosforlanmasındaki azalma aracılığıyla olduğunu gösterilmiştir. Raportör gen analiz deneyleri ise HuR'nin azalan sitoplazmik seviyesinin COX-2 mRNA düzeyinde ve HuR bağlanan sekansların 3'UTR aktivitesinde azalmaya neden olduğunu ortaya koymuştur. Ek olarak yapılan RNA immün çöktürme deneyleri bütirat muamelesinin HuR'nin COX-2 3'UTR'sine bağlanmasında önemli ölçüde azalmaya neden olduğunu göstermiştir. Bu çalışmadan elde edilen veriler şöyle özetlenebilir: bütirat sadece transkripsiyonel düzenleme ile değil aynı zamanda mRNA de-stabilizasyonu ile post-transkripsiyonel olarak da inflamatuar genlerin ifadesini azaltabilmektedir.

Anahtar kelimeler: COX-2, RNA'ya bağlanan protein, bütirat, kolon

Abstract

Short chain fatty acids are produced by commensal bacteria in the gut and are known to reduce inflammation. Among the mechanisms established, transcriptional inhibition of the expression cytokines and other inflammatory proteins such as cyclooxygenase-2 (COX-2) has been suggested. A few studies have also suggested that butyrate can alter the mRNA stability of inflammatory genes. However, the mechanisms have not been elucidated. In this project, we have established that treatment of colon cancer cell lines with sodium butyrate led to a reduction in the cytoplasmic translocation of HuR, an RNA binding protein that is known to increase the stability of several inflammatory mRNAs in the cytosol. Mechanistically, we have shown that the reduction in cytoplasmic translocation was through the reduced phosphorylation of p38 and MK2, and enhanced phosphorylation of Chk2, which regulate phosphorylation and nuclear retention of HuR. Using reporter assays we also observed that decreased cytoplasmic levels of HuR could resulted in reduced 3'UTR activity of the COX-2 mRNA and HuR binding sequences. Finally, using RNA immunoprecipitation, we observed that butyrate treatment also led to reduced *in vivo* binding of HuR to the 3'UTR of COX-2. Overall, our data suggest that butyrate can reduce the expression of inflammatory genes not only by transcriptional regulation, but also by post transcriptional regulation via mRNA destabilization.

Key words: COX-2, RNA binding protein, butyrate, colon

1. GİRİŞ

İnsan kolonu, birbirinden farklı ve çok sayıda üyesi olan, insan hücreleriyle bakterilerin simbiyotik bir ilişki içinde olduğu mikrobiyal bir komünitedir. Bu bakteriler tamamen sindirilemeyen nişasta ve lifleri metabolize ederek, kolonositler için önemli bir enerji kaynağı olan kısa zincirli yağ asitleri (SCFAs)'nin üretimini sağlayacak genlerle donatılmıştır (Wong vd., 2006). Bu bakterilerin büyük kısmının yer aldığı ilk ve orta kolon bölümünde 70-140 mM'a varan miktarda SCFA bulunur. Kolon kanser hücrelerinde, Warburg etkisinden dolayı metabolizma, SCFA kullanımından çok, glikoz kullanımı ve glikolize doğru meyillidir (Monteleone vd., 2013). Kullanılmadığı için biriken, kısa zincirli bir yağ asiti olan bütiratın sodyum tuzu olarak Sodyum Bütirat (NaBt), sahip olduğu Histon Deasetilaz İnhibitör (HDACi) aktivitesine bağlı olarak apoptoz ile ilişkili genlerin aktivasyonuna neden olur (Hagland ve Søreide 2015). Ek olarak, deneysel kolit modelinde, bütirat enemasının inflamasyon ve fibrozis açısından iyileştirici etki gösterdiği belirlenmiştir (Pacheco vd., 2012). NaBt'ın fonksiyonlarından biri olan HDACi özelliği, tümör oluşum ve gelişimi yönündeki etkileri açısından yoğun olarak çalışılan bir konudur. Asetile olan histonlar transkripsiyon başlangıç kompeksi için uygun, gevşek bir kromatin yapısı oluşturur. Bu açıdan, NaBt tarafından engellenen deasetilasyon, transkripsiyonda global bir artışa neden olur.

NaBt'ın bu bahsedilen fonksiyonundan doğrudan etkilendiği bilinen genlere örnek olarak Cdk inhibitörü olan p21 ve pro-apoptotik genlerden BAX ile FAS gösterilebilir (Hamer vd., 2008). NaBt'ın ayrıca IL-8 ve nitrik oksit sentezinde azalmaya neden olarak kronik inflamasyonu inhibe ettiği bilinmektedir: kronik inflamasyon, bütirat aracılığı ile gerçekleşen IL-8 ifadesinin azalması ve nitrik oksit sentaz enzimin inhibisyonuyla bir noktaya kadar önlenebilir (Huang vd., 1997).

PTSG2 geninden sentezlenen COX-2 proteini, araşidonik asidin PGE_2'ye dönüşümünde katalizör görevi görür. Bu basamak, PGE_2'nin başını çektiği prostaglandinlerin anabolizmasında kilit öneme sahip olan düzenleyici bir adımdır (Park vd., 2006). COX-2, COX-1 ile aynı reaksiyonu katalizlemesine rağmen, COX-1'in aksine, her zaman hazırda bulunacak şekilde ifade edilmez: patojen uyarıyla, nitrik oksit varlığında, radyasyon ve sitokinlerle ifadesi artırılır ve bu tür sinyaller kesildiği anda hücredeki COX-2 ifadesi hızlı bir şekilde azalır (Harper ve Tyson-Capper 2008). COX- 2 ifadesindeki aşırı artış ise pek

çok patofizyolojik durum ve pek çok kanserle ilişkilidir. Kolorektal kanser hastalarının %85'inde COX-2 mRNA seviyesinin ve aktivitesinin arttığı gözlenmiştir (Eberhart vd., 1994). COX-2, ifadesi hem transkripsiyonel hem de transkripsiyon sonrası düzenlemelerle kontrol edilen inflamatuar bir gendir. Hücre içi COX-2 mRNA seviyesinin, mikroRNA (miRNA)'lar ve 3' translasyona uğramayan bölge (3' Untranslated Region-3'UTR) aracılığıyla düzenlendiği bilinmektedir (Harper ve Tyson-Capper 2008).

Birçok çalışmada, RNA'ya bağlanan proteinlerin (RBP), inflamatuar mRNA'ların 3' UTR bulunan Adenilat ve Uridilat zengini elementler (ARE) gibi cis elementlere bağlanarak bu mRNA'ların seviyelerini hızlıca düzenleyebildiklerini ve dolayısıyla değişen çevre koşullarına adaptasyona katkı sağladıkları gösterilmiştir (Kafasla vd., 2014; Khabar, 2010). Bu proteinlerden bazıları, hnRNP A1 ve HuR/ELAVL1 gibi, mRNA stabilizasyonunu sağlayarak protein ifadelenmesinde artışa neden olurken, bazıları ise, AUF1 (hnRNP D), tristetraprolin (TTP), TIAR, TIA-1 ve CUGBP2 gibi, çoğunlukla mRNA ifadesini destabilizasyon ile azaltmaktadır (Cok vd., 2003). ARE'lerin destabilize eden RBP'ler tarafından tanınması, mRNA'nın deadenilasyonu (Mino ve Takeuchi, 2018), decapping veya translasyonda gecikme (Masuda ve Kuwano 2018) aracılığıyla mRNA'ların azalmasına neden olmaktadır. Stabilize eden RBP'ler ise, translasyonu önleyen RBP'lerin ve miRNA'ların bağlanmasını engellemekte görev almaktadırlar (Masuda vd., 2012). Stabilize ve destabilize eden RBP'lerin 3'UTR'daki benzer sekanslara bağlanmak için rekabeti, mRNA'nın kaderini belirler (Doller vd., 2008).

RBP'lerin çoğunlukla, hedef mRNA'ları işleme cisimciğinden (Processing bodies- P cisimciği) uzak tutarak sitoplazmada görev aldığı düşünülmektedir. Bu proteinlerin sitolazmada veya çekirdekte bulunması sıkı bir şekilde düzenlenmektedir (Kim ve Gorospe 2008; Doller vd., 2008). Kontrol noktası proteini Chk2 üzerinden ilerleyen sinyal yolağı hedef mRNA'ların yarı ömrünü arttırmak için HuR'ın sitoplazmaya yer değiştirmesini arttırırken, çekirdekte lokalize olan HuR, pre-mRNA uçbirleştirmesinde görev alabilmektedir (Lebedeva vd., 2011).

Projede, NaBt'ın COX-2 transkripsiyonu üzerindeki etkisinin ve NaBt muamelesi ile COX-2 3'UTR aktivitesindeki değişimlerin incelenmesi hedeflenmiştir. Projede yapılması hedeflenen çalışmalar, NaBt gibi epigenetik düzenleyicilerin, mRNA kararlılığını etkileyerek post-transkripsiyonel düzenleyici olarak da görev alabileceği konusunun

irdelenmesi açısından özgündür. Proje ile elde edilecek sonuçların, kolon eneması amacı ile NaBt kullanımı ya da klinikte NaBt üretimini arttırmak amacı ile diyet yoluyla alınan lif miktarının arttırılması veya kolon mikrobiyomunun değiştirilmesi gibi yöntemlerin kullanımını konularında önemli katkıları olacaktır.

1.2 Çalışmanın Amacı

1. Caco-2 ve HT-29 hücrelerinin NaBt ile muamelesi ardından COX-2 regülasyonunun 3'UTR aracılığı ile gerçekleşip gerçekleşmediğinin belirlenmesi,
2. COX-2 ifadesinin 3'UTR aracılı regülasyonu bu proteinlerin aktivasyonuna neden olan sinyal ileti yolaklarının tanımlanması,
3. RNA immün çöktürme yöntemi kullanılarak COX-2 3'UTR bölgesi ile etkileşen RNA bağlanan proteinlerin tespiti.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

İnflamasyon durumunda reaktif oksijen ve azot türleri, lökositler tarafından patojenlere karşı bir silah olarak kullanılır (Bryan vd., 2012). Bununla beraber inflamasyon, çevredeki hücrelere hayatta kalma işaretleri veren, NF-κB'nin başını çektiği anti-apoptotik sinyaller de oluşturur ve eğer inflamasyon çözülemez ve bunun yerine, düşük seviyede devam ederse (kronik inflamasyon), inflamatuar mekanizmalar kanser gelişimini tetikleyebilir. Tümörler içinde bulunan lökositler, 19. yüzyılda Rudolf Virchow tarafından gözlenmiştir. O zamandan bu yana, kanserle inflamasyonu ilişkilendiren birçok kanıt sunulmuştur ve kanser vakalarının %20'sinin kronik inflamasyonla ilişkisi olduğu ortaya konmuştur (Grivennikov vd., 2010). Bu durum, kolorektal kanserde daha da çarpıcı bir hal alır; öyle ki, kolorektal kanserlerin %95'i kronik inflamasyon belirtileri göstermektedir (Siegel vd., 2012). İnflamasyonun tümör oluşumundan ve gelişiminden önce ya da sonra gelip gelmediği bir tartışma konusu olmuştur; ancak, kronik inflamasyonun iki durumda da rolünün olduğu anlaşılmıştır.

COX-2 çoklu doymamış yağ asidi olan araşidonik asiti prostaglandinlere dönüştüren bir enzimdir. Prostaglandinler, acının oluşması, ateş, nötrofil infiltrasyonu ve inflasmasyon iyileşmesi gibi akut inflamasyon düzenlenmesinde önemli rol oynayan biyoaktif lipidlerdir (Hashemi Goradel vd., 2019). COX-2 ifadesi hem transkripsiyonel olarak hem de post-transkripsiyonel olarak sıkı bir şekilde düzenlenmektedir. Transkripsiyonel seviyede, COX-2 promotörü NF-κB, AP-2 ve p300-CREB'e Bağlanan Protein (CBP) gibi bazı transaktivatör ve koaktivatörler tarafından düzenlenmektedir (Hashemi Goradel vd., 2019). Post-transkripsiyonel seviyede ise, birkaç mikroRNA'nın [miR144 gibi (Yao vd., 2018)] ve ARE'ye bağlanan proteinlerin [TTP ve HuR gibi (Dixon vd., 2000)] COX-2 mRNA'sının 3'UTR'sine bağlandıkları ve bu oldukça inflamatuar genin ifadesindeki çok sıkı düzenlenmeye katkıda bulundukları bilinmektedir.

Altı karbondan az yağ asitine sahip olan bileşikler kısa zincirli yağ asitleri (Short Chain Fatty Acids-SCFAs) olarak adlandırılır. Vücut tarafından sindirilemeyen lifler, SCFA kaynağıdır. SCFA'ların emilimi pasif olarak difüzyonla gerçekleşebileceği gibi, SCFA'lar kolon epitelyum hücrelerinin apikal zarı üzerinde bulunan taşıyıcı proteinler aracılığıyla aktif olarak da emilebilir. Bütiratın sodyum tuzu olan sodyum bütirat (NaBt), dört karbon uzunluğunda kısa zincirli bir yağ asididir. Kolonda mukozaya yapışık mikrobiyotanın

60%‘ını Clostridium grubu XIVa oluşturur ve vücuttaki hemen hemen bütün bütiratın üretiminden bu bakteri sorumludur (Van den Abbeele vd., 2013). Bütirat, mukozal bariyerin bütünlüğünü sağlaması, bağışıklığı module etmesi, inflamatuar tepkileri düzenlemesi, sıvı ile elektrolit akışının ayarlanması, kolonik hareket, hücre büyümesi ve farklılaşmasının düzenlemesi fonksiyonları nedeni ile kolon homeostazda son derece önemlidir.

NaBt’ın fonksiyonlarından biri olan histon deasetilasyonu inhibe etme özelliği, tümör oluşum ve gelişimi yönündeki etkileri açısından yoğun olarak çalışılan bir konudur. Fakat NaBt’ın RNA’ya bağlanan proteinlerin işlevini düzenlemedeki rolü net olarak keşfedilmemiştir. Yakın zamanda yapılan çalışmalar, bir destabilize eden RBP olan TTP’nin butirat varlığında daha çok ifadelendiğini ve bunun inflamatuar bir protein olarak COX-2’nin (Sobolewski vd., 2015) ve hücre döngüsü proteini siklin B1’in (Zheng ve Xiao 2015) transkript seviyelerinde azalmaya neden olduğunu göstermiştir. Bütiratın ayrıca TTP’nin de dahil olduğu protein ailesine ait bir RBP olan TIS11B’yi arttırarak (Fukae vd., 2005) TNFα mRNA seviyesini azalttığı gösterilmiştir. Her ikisi de birçok pro-inflamatuar sinyal tarafından indüklenebilen erken yanıt genleridir. COX-2’nin 3’UTR’ı yaklaşık olarak 2 kilobaz uzunluğundadır ve genellikle ilk 100 baz civarında bulunan ve RBP’ler de dahil olmak üzere çeşitli düzenleyici proteinlerin varlığına cevap veren, WAUUUAUUUAUUUAW kısmı taşıyan Tip III ARE olarak sınıflandırılmaktadır. TNFα ise, 3’UTR’ın ARE bölgesinde (Sakai vd.,1999) 5 veya daha fazla AUUUA kopyası içeren Tip I ARE’si olan (Bakheet, 2001) başka bir inflamatuar gendir.

Laboratuvarımızda elde edilen veriler, NaBt muamelesinin kolon kanseri hücre hatlarında COX-2’nin mRNA ve protein ifadesinde değişime neden olduğunu göstermiş olup bu projede, gözlenen bu değişimlerin altında yatan mekanizmaların açıklanması hedeflenmiştir. Ek olarak, halka açık mikrodizi verilerinin [GSE4410 (Tabuchi vd., 2006)] analizi, bütirat muamalesi görmüş kolon epitel hücrelerinde RBP ifadesinde genel bir azalma olduğunu göstermektedir. Bu projede ayrıca RBP ifadesinde bütirat aracılı azalmanın COX-2 gibi inflamatuar genlerin post-transkripsiyonel düzenlenmesini nasıl etkileyebilceği tartışılmış olup, bu tür bir düzenlenmenin bütiratın özellikle bağırsaktaki anti-inflamatuar etkisi (McNabney ve Henagan 2017) ile nasıl ilişkili olabileceği irdelenmiştir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Hücre Büyütülmesi ve Alt Kültürleme

İnsan kolon kanser hücreleri olan Caco-2 ve HT-29 hücreleri ŞAP Enstitüsü (Ankara, Türkiye)'den ve HCT-116 hücreleri DKFZ, Almanya'dan temin edilmiştir. HEK293 hücreleri Prof. Dr Mesut Muyan'dan (ODTÜ Biyolojik Bilimler Bölümü) hediye olarak alınmıştır. Caco-2 hücreleri 1,5 g/L sodyum bikarbonat, 1 mM sodium piruvat, 2 mM L-glutamin, 0,1 mM esansiyel olmayan amino asit, %20 Fetal Bovin Serum ve %1 penisilin/streptomisin içeren Eagle's minimum esansiyel medyum (Gibco, Life Technology)'u kullanılarak 37°C'de ve %5 CO2 içeren steril ortamda büyütülmüştür. HCT-116, HT-29 ve HEK293 hücreleri ise 37°C'de, nemlendirilmiş ve %5 CO_2, %95 hava bileşimine sahip ortamında; %10 fetal bovin serumu, %1 penisilin/streptomisin, 2 mM L-glutamin ilave edilen RPMI-1640 besiyeri (Biological Industries) içerisinde büyütülmüştür. Alt kültürleme için, hücreler en fazla %70 konfluenside iken, %0,25 Tripsin-EDTA (Biological Industries) kullanılmıştır.

3.2 Protein Eldesi

Hücrelerden protein eldesi için kültürde büyütülen veya muamele edilen hücrelerden besi yeri uzaklaştırılmış, hücreler PBS ile yıkanmış ve kazınarak önceden soğutulmuş 1,5 ml'lik eppendorf tüplerine toplanmıştır. Takiben, 1X fosfataz inhibitörü (Roche) içeren 1 ml PBS çözeltisinde çözülüp 5 dakika boyunca 300x*g*'de santrifüj edilmiştir. Süpernatanlar uzaklaştırıldıktan sonra hücre pelletleri 10 mM HEPES (pH 7,5), 4 mM NaF, 10 mM sodyum molibdat ve 0,1 mM EDTA içeren 1X hipotonik çözeltide 15 dakika süresince buzda bekletilmiştir. 14000xg'de 30 saniye santrifüjün ardından süpernatan (sitoplazmik kısım) toplanmış ve -80°C'de saklanmıştır. Çekirdek fraksiyonu eldesi için, fosfataz inhibitörü içeren 1 ml PBS ile yıkanan pellet, 15 dakika boyunca RIPA tampon çözeltisinde (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 140 mM NaCl, 1 mM EDTA,1% Triton-X-100, 0.1% SDS, 0.1% sodium deoxycholate, 1X protease inhibitor kokteyli) buzda inkübe edilmiştir. Verimi arttırmak için hücre süspansiyonları 3x10 saniye süresince sonike edilmiştir. 14000x*g*'de

4°C'de 10 dakika santrifüj sonunda toplanan süpernatanlar -80°C'de saklanmıştır.

Total protein eldesi için ise hücre pelletleri 100 µl of RIPA tampon çözeltisinde 15 dakika boyunca buzda inkübe edilmiştir. 14000x*g*, 4°C'de 10 dakika santrifüj sonunda süpernatan toplanmıştır. Proteinler sonrasında kullanılmak üzere -80°C'de saklanmıştır. Protein konsantrasyon tayini için Coomassie Assay Reagent (Thermo Scientific) kullanılmıştır. Coomassie Assay Reagent içinde dilüe edilmiş proteinin absorbansı, OD595'de MultiSkan GO Microplate Spectrophotometer (Thermo Scientific) kullanılarak ölçülmüştür. Bovin serum albüminin bilinen konsantrasyonları ile oluşturulan standart eğri, elde edilen proteinlerin konsantrasyonlarının belirlenmesinde kullanılmıştır.

3.3 RNA İzolasyonu ve cDNA Sentezi

RNA eldesi NucleoSpin RNA kit (Macherey Nagel) kullanılarak, talimatlara uygun şekilde yapılmıştır. RNA miktarı BioDrop µLITE (BioDrop) kullanılarak belirlenmiştir. RNA'dan cDNA sentezi için RevertAid First Strand cDNA Sentez Kiti (Thermo Scientific) kullanılmıştır.

3.4 Kantitatif Gerçek Zamanlı PZR (qRT-PZR)

mRNA ifadelerinin transkripsiyonel düzeyde belirlenmesi için qRT-PCR yönteminden faydalanılmıştır. Kullanılan primerler, reaksiyon koşulları ve ürün boyları **Tablo 1**'de detaylı olarak verilmiştir. qRT-PCR reaksiyonlarında kullanılan primerlerin reaksiyon etkinliğinin belirlenmesi amacı ile öncelikli olarak standart çoğaltma eğrileri oluşturulmuştur. Beta aktin (β-Aktin) ifadesi normalizasyon için kullanılmıştır.
Analiz edilecek cDNA'lar nükleaz içermeyen dH_2O ile 1:20 oranında dilüe edilmiştir. Bu oran RNA immün çöktürmeden elde edilen input cDNA'lar için 1/500 tutulmuştur. Dilüsyonlu cDNA örneklerinin 2 µl'si, 5 µl 2X Fast Start SYBR Green (Roche) ve 0,25 uM final konsantrasyonu olmak üzere ileri ve geri primerler ile dH_2O'nin kullanıldığı 10 µl hacimli PCR reaksiyonu hazırlanmıştır. qRT-PCR, Rotor GeneQ 6000 series (Qiagen) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. 40 döngülük reaksiyonun ardından transkripsiyonel ifade

düzeylerinde değişimlerin belirlenmesi için C_t (threshold cycle-eşik döngü değeri) değerleri, göreceli standart eğri (relative standard curve) metoduna göre belirlenmiş, transkripsiyonel düzeydeki değişimler Pfaffl metoduna göre hesaplanmıştır.

Hedef	İleri (5'->3')	Geri(5'->3')	Ürün Boyu	Yapışma Sıcaklığı (˚C)
RPLO	GGAGAAACTGCTGCCTCATA	GGAAAAAGGAGGTCTTCTCG	191	60
RAB7A	AGTGTTGCTGAAGGTTATCATCC	TTCCTGTCCTGCTGTGTCC	187	60
RPL13A	TGCGACAAAACCTCCTCCTT	TTCACAGCGTACGACCACC	156	60
PTGS2	CCCCACAGCAAACCGTAGAT	GGCCATGGGGTGGACTTAAA	192	60
ACTB	CAGCCATGTACGTTGCTATCCAGG	AGGTCCAGACGCAGGATGGCATG	151	60
S.NanoLuc	GCACTACGGCACACTGGT	TGTTGCCGTTCCACAGGG	131	60
HuR	ATGAAGACCACATGGCCGAAGACT	AGTTCACAAAGCCATAGCCCAAGC	189	66
eIF4E	TGTGGCGCTGTTGTTAATGT	ATTGCTTGACGCAGTCTCCT	252	59

Tablo 1 Çalışmada kullanılan primerlerin dizileri, çoğalttıkları gen bölgelerinin uzunlukları ve PZR'de kullanılan yapışma sıcaklıkları gösterilmiştir.

3.5. Koloni PZR

İleriki başlıklarda detaylıca belirtilen gen klonlamalarını doğrulamak için koloni PZR yapılmıştır. Koloniler 0,2 ml'lik PZR tüplerine sıyırılıp, üzerine reaksiyon karışımından sadece suyu eklendikten sonra 95°C'de 10 dakika süresince kaynatılmış; bu şekilde bakteri hücrelerinin patlatılması ve DNA'nın açığa çıkması sağlanmıştır. Takiben, karışımın geri kalanı (dNTP, ileri ve geri primerler, Taq polimeraz reaksiyon tamponu ve Taq polimeraz) eklendikten sonra toplam hacim 20 µl olmak üzere PCR reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. **Tablo 1**'de PCR reaksiyonunda kullanılan primerler ve reaksiyon koşulları verilmiştir.

3.6. Yüksek doğruluklu PZR

Klonlama ve dizileme amacıyla yapılmış PZR'lerde yüksek doğruluklu Phusion Taq polimeraz (NEB), üretici fimanın talimatlarına uygun olarak kullanılmıştır. Bu polimeraz için kullanılacak primer bağlanma sıcaklıkları https://tmcalculator.neb.com/ ile belirlenmiştir. Primer dizileri ve reaksiyon koşulları **Tablo 1**'de verilmiştir.

3.7. PGE_2 için Enzime Bağlı İmmunosorbent Testi (ELISA)

Hücreler 6 kuyulu plakalara ekilerek %40-%50 hücre doluluk oranına ulaştığında NaBt ile 3 mM ve 5 mM dozlarında olacak şekilde muamele edilmiştir. 48 saat sonrasında, hücreden yoksun süpernatanlar toplanarak kullanım zamanına kadar −80°C'de muhafaza edilmiştir (en fazla 4 gün). Salgılanan PGE_2 miktarının belirlenmesinde, üretici firmanın kılavuzuna uyulmuştur (Cayman Chemical). Elde edilen sonuçlar hücre sayısına göre normalize edilmiş, PGE_2 miktarı pg/ml olarak verilmiştir.

3.8 Klonlama

3.8.1 RBP'lerin Memeli Gen İfade Vektörüne Klonlanması

CUGBP2 ve HuR kodlayan bölgeleri pGWIZ RPS30M EGFP vektörüne (King Faisal Specialist Hospital and Research Center, Suudi Arabistan'dan Dr. Khalid S. A. Khabar'ın hediyesidir) klonlanmıştır. Aşırı ifade vektörleri, 3'UTR EGFP raportör vektörü ile birlikte transfekte edileceğinden, AREBP klonlamalarında pGWIZ vektöründen EGFP dizisi atılmıştır. pGWIZ vektöründe, promotör bölgesinden sonra gelen EGFP dizisi, *SalI* (5') ve *BamHI* (3') kesim bölgeleri arasında olduğundan, EGFP kodlayan dizinin çıkarılması için pGWIZ RPS30M vektörü *SalI* HF (NEB) ve *BamHI* (Thermo) kullanılarak kesilmiştir. Elde edilen, EGFP raportörü içermeyen bu vektör, CUGBP2 genin klonlanması için hedef vektör olarak kullanılmıştır.

CUGBP2 geninin klonlanması için pGEX-6P-1 CUGBP2 vektörü (Dundee University MRC PPU Reagents & Services'den temin edilmiştir), HuR geninin klonlanması için ise pGEX-6P-1 ELVAL1 vektörleri (Dundee University MRC PPU Reagents & Services'den temin

edilmiştir) kalıp olarak kullanılmıştır ve **Tablo 2** de gösterdiği primerler kullanarak çoğalmştır.

Klonlanacak her iki genin 5' ucuna, başlama kodonundan hemen önce Kozak sekansı (5' GCCACC 3') ve 3' ucuna sonlandırma kodonundan (5' TAA 3') hemen önce ise MYC dizisi (5' GAACAAAAACTCATCTCAGAAGAGGATCTG 3') PZR yoluyla eklenmiştir. MYC dizisi eklenmesi de dahil tüm PZR reaksiyonlarında yüksek doğrulukla çoğaltma yapan Phusion Polimeraz (NEB) kullanılmıştır. Uygun vektörlerle ligasyon reaksiyonu vektör:klonlanan DNA oranı 1:5 ve 1:10 olacak şekilde 50 ng vektör kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

3.8.1.1. CUGBP2 geninin klonlanması

CUGBP2 kodlayan dizinin ilk PZR reaksiyonuyla MYC sekansının tamamı ve *SalI* (5') kesim bölgesi sekansı eklenmiş, ikinci PZR reaksiyonunda ise *BamHI* (3') kesim bölgesi dizisi eklenmiştir. CUGBP2 kodlayan dizisi, yine bu enzimlerle kesilmiş ve GFP'si çıkartılmış pGWIZ RPS30M vektörüyle T4 DNA Ligaz (NEB) kullanılarak 16°C'de gece boyu inkübe edilmesiyle birleştirilmiştir.

3.8.1.2. HuR geninin klonlanması

Labımızda, p45 geninin klonlanmasıyla elde edilen pGWIZ RPS30M p45_MYC vektörü (Rapor 3) *SalI* HF (NEB) ve *NotI* (NEB) enzimleriyle kesilerek bu bölgeler arasındaki p45_MYC DNA fragmanı çıkartılmış, geriye kalan boş vektör HuR geninin klonlanması için kullanılmıştır. Yapışkan uçlu klonlama yapabilmek için HuR genine MYC dizisi Q5 polimeraz kullanılan PZR ile eklendikten sonra bu ürünün 5' ucuna *SpeI* ve *SalI*, 3' ucuna ise *NotI* ve *BamHI* kesim bölgelerinin eklendiği PZR yapılmıştır. Elde edilen bu ürün *SalI* ve *NotI* enzimleriyle kesilip, PZR pürifikasyonu yapıldıktan sonra yine bu enzimlerle kesilmiş, jelde yürütüldükten sonra izolasyonu yapılmış pGWIZ RPS30M vektörüyle, T4 DNA Ligaz (NEB) kullanılarak 16°C'de gece boyu inkübe edilerek birleştirilmiştir. PZR reaksiyonlarında elde edilen DNA fragmanları ve enzimlerle kesilen hedef vektörler agaroz jelde yürütüldükten sonra NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Kit (Macherey Nagel) kullanılarak jelden izole edilmiştir. Klonlama enzimleri ile kesilen DNA fragmanları için ise yine aynı kit kullanılarak pürifikasyon yapılmıştır.

Primer Adı	İleri (5'->3')	Geri (5'->3')	Yapışma Sıcaklığı (˚C)
CUGBP2 1	ACGCGTCGACGCCACCATGGTCGAGGGCCGC	GAAGGTTTGCTGTCGTTCTTGTTTTTGAGTAGAGTCTTCTCCTAGACTTAGCG	65
CUGBP2 2	ACGCGTCGACGCCACCATGGTCGAGGGCCGC	TAGAGTCTTCTCCTAGACTTAGCGGGATCCCGC	65
HuR 1	GCCACCATGTCTAATGGTTATGAAGAC	TTACAGATCCTCTTCTGAGATGAGTTTTTGTTCTTTGTGGGACTTGTTGG	54
HuR 2	ACGCGTCGACACTAGTGCCACCATGTCTAATGG	GCGGGATCCGCGGCCGCTTACAGATCCTCTTCTGAGAT	2 Adımlı PZR
COX-2 ARE	GGGGGATCCAGAACGTTCGACTGAACT	GCGCGGATCCGTAGTGACATAAAAGTCT	53
DELTA ARE	GGGGGATCCTACTCTAAAGATTTTGCTGTTGC	GCGCGGATCCAGAGGAGCTAAATAGCAGTCC	61

Tablo 2 pGWIZ RPS30M vektörüne klonlamak için HuR ve CUGBP genlerinin çoğaltılmasında kullanılan primerler ve pGWIZ RPS30M SuperNanoLuc vektörüne klonlamak için COX-2 ARE ve DELTA ARE bölgelerinin çoğaltılması için kullanılan primerler gösterilmiştir.

3.8.2. ARE Bölgelerinin Memeli Gen İfade Vektörüne Klonlanması

3.8.2.1 ARE Bölgelerinin Klonlanması

Yapay ARE ve HuR bağlanan yapay ARE ve TNFα 3'UTR'in ARE bölgeleri için oligomerler (**Tablo 3**) kullanılarak klonlama yapılmıştır. Oligo çiftleri 10μg/ml olacak şekilde su ile seyreltilmiştir. Her bir oligo, T4 Polinükleotit Kinaz (NEB) ile fosforlanmıştır. Oligo çiftleri her birinden 3μg/ml kullanılarak 1X birleştirme tampon çözeltisinde (10X: 100mM Tris pH:8, 500mM NaCl, 10mM EDTA pH:8); 90°C'de 4 dk, 70°C'de 10 dk, 37 °C'de 20 dk, 25 °C'de 10 dk, 10°C'de 10 dk olacak şekilde inkübe edilerek birleştirilmiştir. Önceden BamHI (Thermo) ile gece boyu 37°C'de kesilen pGWIZ RPS30M SuperNanoLuc vektörü 1U CIAP fosfataz (Thermo) ile 37°C'de 7 dk. muamele edilmiştir. Birleştirilen oligolar ile kesilmiş vektör T4 DNA Ligazı ile 16°C'de gece boyu inkübe edilerek birleştirilmiştir.

Oligo Adı	Sens Dizi (5'->3')	Anti-sens Dizi (5'->3')
TNF ARE	GATCCTTATTATTTATTATTTATTTATTATTTTTATTATTTATTATTTATTTATTATTTGCTAGCG	GATCCGCTAGCAAATAATAAATAAATAATAAATAATAAAAATAATAAATAAATAATAAATAATAAG
Art. ARE	GATCCATTTTATTTATATTATTTAATTTTATTTATATTATTTAGCTAGCG	GATCCGCTAGCTAAATAATATAAATAAAATTAAATAATATAAATAAAATG
HuR ARE	GATCCTTCCGATTTCCGATTTATTTCGGATTTTTCCGATTTCCGATTTATTTCGGATTTGCTAGCG	GATCCGCTAGCAAATCCGAAATAAATCGGAAATCGGAAAAATCCGAAATAAATCGGAAATCGGAAG

Tablo 3 pGWIZ RPS30M SuperNanoLuc vektörüne klonlanan ARE sekansları için kullanılan oligo dizileri sens ve anti-sens olarak gösterilmiştir.

3.8.2.2. COX-2 ARE ve DELTA ARE Bölgelerinin Klonlanması

COX-2 ARE ve DELTA ARE bölgelerinin pGWIZ RPS30M SuperNanoLuc vektörüne klonlanması için daha önceden Rapor1 ve Rapor 2'de gösterildiği gibi psiCHECK2 vektörüne klonlanmış COX-2 ARE ve DELTA ARE bölgeleri kalıp olarak kullanılmıştır. Klonlama için **Tablo 2**'de belirtilen primerler ile Q5 (NEB) enzimi kullanılarak PZR'de bu bölgeler, uçlarına BamHI kesim bölgesi sekansı eklenerek çoğaltılmıştır. Agaroz jelde yürütülen PZR ürünleri jelden kesildikten sonra jel pürifikasyonu yapılmıştır. Pürifiye edilen COX-2 ARE ve DELTA ARE ürünleri BamHI ile 4 sa. boyunca 37°C'de kesildikten sonra, yine BamHI kesilmiş pGWIZ RPS30M SuperNanoLuc vektörü ile 16°C'de T4 DNA Ligazı ile gece boyu birleştirilmiştir. Transformasyon sonrası pozitif koloniler RPS30M primerleri (**Tablo 1**) ile tespit edilmiştir.

3.9 Bakteri Transformasyonu

Transformasyon için, ligasyon ürünlerinin 10 µl'si 100 µl E.coli DH5α kimyasal kompetent bakterilerine eklenmiş, 30 dakika boyunca buzda inkübe edilmiştir. İnkübasyon ardından 42˚C'de 1,5 dakika boyunca ısı şoku uygulanmıştır. Isı şokunu takiben tüpler buza alınıp 2 dakika buzda inkübe edilmiştir. 900 µl eklenen tüpler 37˚C'de 1 saat boyunca çalkalamalı inkübatörde büyütülmüştür. 5000 rpm'de 3 dakika santrifüj ardından 900 µl süpernatan uzaklaştırılmış, bakteriler kalan 100 µl içerisinde süspanse edildikten sonra

50µg/ml kanamisin içeren agar-LB plakalarına yayılarak ekilmiş ve gece boyu 37˚C'de büyütülmüştür. Transforme edilmemiş kompetent hücreleri negatif kontrol olarak kullanılmıştır.

3.10 Caco-2 ve HT-29 hücrelerinde NF-κB Aktivitesinin Raportör gen Analizi ile Belirlenmesi

48 kuyucuklu plakalara ekilen Caco-2 (50-60% konfluent) ve HT-29 ($1X10^5$ hücre/kuyu) hücreleri NF-κB lusiferaz vektörü ve normalizasyon için Renilla lusiferaz vektörü ile Lipofectamine 2000 (Invitrogen) ile 6 sa. transfekte edildikten sonra Caco-2 hücreleri 6 sa. ve 48 sa. HT-29 hücreleri ise sadece 6 sa. 5mM NaBt ile muamele edilmiştir. Lusiferaz aktivitesinin tayini için Promega Dual Luciferase Analiz kiti kullanılmıştır.

3.11 HEK293, Caco-2 ve HT-29 Hücrelerinde COX-2 3'UTR Aktivitesinin Raportör Gen Analizi ile Belirlenmesi

3.11.1 HEK293 hücrelerinde EGFP analizi

HEK293 hücrelerinde transfeksiyon konfluensi %60 iken, 12 kuyulu plakalarda yapılmıştır. Transfeksiyondan önce mevcut besiyeri, serum içeren fakat antibiyotik bulundurmayan transfeksiyon besiyeri ile değiştirilmiştir. 100 µl Opti-MEM azaltılmış serum içeren besi yerine (Gibco) 1 µg vektör, bir diğer eppendorfta ise 100 µl Opti-MEM'e 2 µl Lipofectamine2000 transfeksiyon ajanı (Invitrogen) eklenmiştir. Oda sıcaklığında 5 dakika inkübasyonun ardından, DNA ve transfeskiyon ajanı bir tüp içinde karıştırılmış, transfeksiyon karışımı 20 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Karışım kuyulara damlalar halinde eklenmiş hücreler 37°C'de 24 saat boyunca inkübe edilmiştir. 24 saat sonra besiyeri çekilmiş ve hücreler transfeksiyon ajanını ve ortamda bulunan vektörleri uzaklaştırmak için 500 µl PBS ile yıkanmış, hücreler tripsin ile kaldırıldıktan sonra 350 xg'de 7 dakika sentrifüj edilmiştir. Hücre peletleri 400 µl PBS ile tekrar süspanse edilmiş ve hemen AccuriC6 flow sitometre'de CFlow software (Becton-Dickinson) ile analiz edilmiştir. 40.000 hücre sayılmış ve ileri saçılma grafiği (Forward Scatter, FS) ve

yana saçılma (Side Scatter, SC) grafiğindeki sinyal yoğunluğuna göre hücre popülasyonu seçilmiştir. EGFP sinyali, spektrumun yeşil kısmında 510/515 nm'de 488 nm lazer ve FL1 dedektörü kullanılarak belirlenmiştir. Mock hücreler, hücrelerin kendi flüoresansını belirlemek için negatif kontrol olarak kullanılmıştır.

3.11.2 Caco-2 ve HT-29 hücrelerinde EGFP analizi

Transfeksiyondan bir gün önce Caco-2 ve HT-29 hücreleri 24 kuyulu plakalara her bir kuyuda $2x10^5$ hücre olacak şekilde ekilmiştir. Hücreler, boş vektör (BV), COX-2 3'UTR ARE (ARE) bölgesini ya da COX2 3'UTR mutant ARE (mutARE) ile transforme edilmiştir. Bunun için 750 ng vektör ve 0,75 µl Plus Reagent, 100 µl Opti-MEM azaltılmış serum içeren besi yerine eklenmiş ve oda sıcaklığında 10 dakika boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda 5 µl lipofectamine LTX transfeksiyon ajanı (Invitrogen) eklenmiş ve 25 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübasyonun ardından, 250 µl Opti-MEM azaltılmış serum içeren besi yeri içeren kuyulara damlalar halinde eklenmiştir. Gece boyu 37°C'de tutulan hücrelerin besi yerleri düzenli besi yeri ile değiştirilmiş ve 24 saatin sonunda tripsin ile hücre kaldırılması ve PBS ile yıkama işlemleri sonunda AccuriC6 akış sitometrisi kullanılarak, FL-1 kanalından okuma yapılmıştır. Ortalama EGFP sinyali (mean FL-1), BV sinyaline göre normalize edilmiş ve kat artışı olarak verilmiş olup, deney her bir hücre hattı için bağımsız olarak üç kez tekrarlanmıştır.

3.12 HT-29 ve Caco-2 hücrelerinin akış sitometrisi ile senkronizasyonları ve hücre döngüsü analizi

HT-29 ve Caco-2 hücreleri gece boyu serum içermeyen besi yerlerinde aç birakildiktan sonra 12 sa. serum içeren besi yerinde serbest bırakılmışlardır. Ardından HT-29 hücrelerine 3, 6, 9 ve 12 sa boyunca, Caco-2 hücrelerine ise 6 sa boyunca 5 mM NaBt muamelesi yapılmıştır. Muamele yapılan her zaman noktasından sonra hücreler tripsin kullanılarak Eppendorf tüplere toplanmıştır. Hücreler farklı zaman noktalarında toplandığı için, hücrelere fiksasyon yapılmıştır. Toplanan hücrelere 4 ˚C'de, 6 dk. 300x*g*'de sentrifüj yapılmış, hücre pelletleri iki kez 1ml PBS ile yıkanmıştır. Son yıkama sonrası yapılan sentrifüjden sonra pellet üzerinde 50 µl PBS bırakılmış ve pellet bu sıvının içinde

çözülmüştür. Çözünen pelleti ara hızda vortekslenirken üstüne 1 ml buz soğukluğunda %70 etanol damlalar halinde eklenmiştir. Tüpler -20 ˚C'de gece boyu muhafaza edilmiştir. Fikse edilen hücrelere sentrifüj yapılmış ve PBS ile yıkanmıştır. Tekrar sentrifüjlenen hücrelerin üzerinden PBS uzaklaştırılmış, sadece hücre pelleti kalmıştır. Akış sitometrisinde hücre döngüsü analizi için hücre pelletleri 500 µl propidyum iyodür (PI) solüsyonunda (0,1% v/v TritonX-100 (Sigma), 0,2 mg/ml RNase A (Thermo Fisher) ve 0,02 mg/ml PI) çözünmüştür. Hücreler oda sıcaklığında 30 dk. inkübe edildikten sonra AccuriC6 akış sitometrisi kullanılarak, FL-3 kanalından okuma yapılmıştır.

3.13 Caco-2 Hücrelerinde ARE Bölgelerinin Aktivitesinin Tayini için Lusiferaz Raportör Gen Analizi

Caco-2 hücrelerinin transfeksiyonu, üretici firmanın talimatına uygun şekilde Lipofectamine 2000 (Invitrogen) kullanılarak yapılmıştır. Transfeksiyon için, 48 kuyulu plakalarda %50-60 konflüensideki hücreler kullanılmıştır. Transfeksiyondan önce hücre besi yeri 150 µl Opti-MEM azaltılmış serum içeren besi yeri (Gibco) ile değiştirilmiştir. 50 µl Opti-MEM içeren bir eppendorfta toplam 400 ng vektör (40 ng ARE içeren vektörler ve 380 ng Firefly vektörü ya da 40ng ARE içeren vektör, 80 ng pGWIZ_RPS30M_HuR_MYC vektörü ve pGWIZ RPS30M Firefly vektörü), 50 µl Opti-MEM içeren bir başka eppendorfta ise 0,8 µl transfeksiyon ajanı eklenmiştir. Oda sıcaklığında 5 dk. inkübasyondan sonra, vektörleri içeren karışım, lipofectamine içeren karışımın üzerine damla damla eklenmiş ve hafifçe karıştırılmıştır. Lipofectamine ve DNA karışımı oda sıcaklığında 20 dk. boyunca inkübe edilmiştir. Karışım, kuyulardaki hücrelerin üzerine damlalar halinde eklenmiş ve hücreler 37 ˚C'de 6 sa. inkübe edilmiştir. 6 sa. sonunda transfeksiyon besi yeri uzaklaştırılmış, kuyulara 5 mM NaBt içeren büyüme besi yeri eklenerek 48 sa. boyunca inkübe edilmiştir. Hücreler Nano-Glo Dual Luciferase Reporter Assay System (Cat. No: N1610) klavuzunda belirtildiği gibi lizis edilmiş, Firefly ve NanoLuc lusiferaz aktiviteleri luminometre (Turner Biosystems) kullanılarak belirlenmiştir.

3.14. Western blot

Protein düzeyindeki değişimlerin tayini için western blot yöntemi uygulanmıştır. Kullanılan antikorlar Tablo 4'te belirtilmiştir.

Antikor Adı	Orijin	Markası	Katalog No
COX-2	Fare	Cayman	CX229
NFκB p65	Tavşan	Santa Cruz	SC-109
β-Actin (C4)	Fare	Santa Cruz	SC-47778
GapDH (FL-335)	Tavşan	Santa Cruz	SC-25778
α-Tubulin		ProteinTech	HRP-66031
TopoII-β (A-12)	Fare	Santa Cruz	SC-365071
Lamin B1	Fare	ProteinTech	66095-I-Ig
CUGBP2	Tavşan	Abcam	ab186430
ELAVL1/HuR	Fare	ProteinTech	66549-I-Ig
AUF1	Tavşan	Novus	NBP1-88915
TIAR	Keçi	Santa Cruz	SC-1749
p-p38 (D8)	Fare	Santa CrUz	SC-7973
p38 MAPK	Tavşan	CST	9212P
p-MK2 (T222)	Tavşan	CST	3316P
MK2	Tavşan	CST	30425
pChk2 (T68)	Tavşan	CST	2661S
Chk2	Tavşan	Santa Cruz	SC-9064
Goat α-mouse		Advansta	R05072 500
Goat α-rabbit		Advansta	R05072 500
Donkey α-goat		Advansta	R05077 500
Normal mouse IgG		Santa Cruz	SC-2025

Tablo 4 Çalışmada kullanılan antikorların adları ve taşıyıcı hayvanı tabloda gösterilmiştir.

3.15. RNA- İmmün Çöktürme

RNA immün çöktürmesi için Peritz vd., (2006)'da uygulanan metoda başvurulmuştur. HCT116 hücreleriyle yapılan immün çöktürmede, HCT116 hücreleri 3,5 μg HuR bağlanan ARE sekansı içeren pGWIZ RPS30M SuperNanoluc vektörü ile 10 μl Lipofectamine 2000 (Invitrogen) aracılığıyla T25 kaplarındaki HCT116 hücrelerine 6 sa. boyunca transfekte

edildikten sonra hücrelere 48 sa. NaBt muamelesi yapılmıştır. Caco-2 hücreleri için ise transfeksiyon yapılmamış, sadece 48 sa. NaBt muamelesi yapılmıştır. Her bir immün çöktürme için $5x10^6$ hücre, input için $3x10^5$ hücre kullanılmıştır. Protein A/G manyetik boncuklar (Thermo) 0.5 ml polizom liziz tamponu (100mM KCl, 5mM $MgCl_2$, 10mMm HEPES, pH:7.0, 0,5% NP-40, 1mM DTT, $100Uml^{-1}$ RNasin RNase inhibitör (Promega, N2611), 2mM vanadil ribonukleaz kompleks solüsyon (Sigma, 94742), 25 μl ml^{-1} proteaz inhibitör kokteyli (Roche) ile iki kez yıkandıktan sonra, asıl hacmine getirerek, %50 olacak şekilde ekilibre edilmiştir. İki ön-yıkama ve bir inkübasyonda kullanmak üzere üç adet 50 μl'lik boncuk karışımı alikotlanmıştır. Boncuk karışımı alikotlarından biri 1 ml hücre lizatı üzerine eklenerek 4 ˚C'de 1 sa. boyunca döndürerek inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası manyetik raf kullanılarak uzaklaştırılan boncukların üzerinden supernatant çekilip bir diğer boncuk alikotu ile tekrar 4 ˚C'de 1 sa. boyunca döndürerek inkübe edilmiştir. Ön-yıkamalar sonrası toplanan supernatant HuR (ProteinTech) veya mouse IgG (Santa Cruz) antikorları ile 4˚C'de gece boyunca döndürülerek inkübe edilmiştir. Geriye kalan boncuk karışımı antikorlarla inkübe edilen hücre lizatının üzerine eklenmiş ve 4 ˚C'de 4 sa. boyunca döndürülerek inkübe edilmiştir. Manyetik rafa konulan boncuklar üzerinden supernatant uzaklaştırılmıştır. Boncuklar, 0,5 ml polizom liziz tamponu ile 4 ˚C'de 5 dk. döndürerek 4 kere yıkanmıştır. Yıkama işlemi 1 M üre içeren polizom liziz tamponu ile aynı şekilde tekrarlanmıştır. Boncuklar % 0,1 SDS ve 30 μg Proteinase K içeren polizom liziz tamponu ile süspansiye edilip, 50 ˚C'de 30 dk. boyunca inkübe edilmiştir. Boncukların üzerine hacmi kadar (100 μl) phenol-chloroform-isoamyl alkol karışımı eklenmiş ve vortekslenmiştir. Faz ayrımı için sentrifüj yapılmıştır. Üst kısım RNA izolasyonu için ayrılmıştır. Geriye kalan boncuklar için yıkama sonrası işlemler bir kez daha tekrarlanmıştır. Toplanan üst kısımlara 100 μl'ye 0,5 μl glycogen (20 mg/ml), 12 μl 3M sodyum asetat ve 250 μl %100 etanol eklenip, karıştırılıp, -20 ˚C'de gece boyu inkübe edilmiştir. RNA'lar 4˚C'de, 20 dk, 16000x*g*'de sentrifüj edilmiştir. Etanol uzaklaştırılmış, kalan etanol havada kurutulmuştur. RNA peletinin üstüne ribonükleaz içermeyen su eklenerek RNA çözülmüştür. RNA'lar -80 ˚C'de muhafaza edilmiştir. cDNA sentezi yukarıda belirtildiği şekilde uygulanmıştır.

RIP örneklerinin analizi qRT-PCR ile yapılmıştır. Öncelikle, input cDNA'lar için standart çoğaltma eğrisi oluşturulmuştur ve buna göre seyreltme faktörü 1/500 olarak belirlenmiştir.

Seyreltme faktörünün taban 2'de logaritmik değeri hem NaBt ile muamele edilmiş hem de edilmemiş input cDNA'larının Ct değerlerinden çıkarılmıştır ve elde edilen değerler input Ct değeri olarak kullanılmıştır. ΔCt değeri, muamele edilmemiş çöktürme örneklerinden yine muamele edilmemiş, yukarıda belirtildiği gibi hesaplanan input Ct değerinin çıkarılması ile hesaplanmıştır. Muamele edilmiş örnekler için de aynı şekilde muamele edilmiş input Ct değerlerinin çıkarılması ile ΔCt hesaplanmıştır. IgG örneklerinin ΔCt değerlerinin ortalaması alınıp, hem IgG hem de HuR ile çöktürülen örneklerin ΔCt değerinden çıkarılarak ΔΔCt değeri muamele edilen ve edilmeyen örnekler için ayrı olarak bulunmuştur. NaBt ile muamele edilmemiş ve edilmiş IgG örneklerine göre, HuR ile çöktürülen örneklerin kat artışı hesaplanmıştır.

3.16 Biyoinformatik analizleri

Kontrol ve 2mM NaBt ile 6-,12- ve 24- sa muamele edilmiş fare kolon epitel MCE301 hücrelerinin her zaman noktasında 2 tekrardan oluşan ifade değerlerini içeren halka açık fare mikrodizi veri seti (GSE 4410) incelenmiştir (Tabuchi vd., 2006). Önceden normalize edilmiş mikrodizi verileri Array Express veritabanından indirilmiştir (https://www.ebi.ac.uk/arrayexpress/experiments/E-GEOD-4410/?query=gse4410) ve 2 tabanında logaritmik ölçeğe dönüştürülmüştür. Ek olarak, toplam 404 fare RBP'leri RBPDB veritabanından indirilmiştir (Cook vd., 2011). Affymetrix Fare İfadesi 430A Dizisi sürüm numarası 35 için ek açıklama dosyası Affymetrix web sayfasından indirilmiştir (http://www.affymetrix.com/support/technical/byproduct.affx?product=moe430). Fare RBP'lerinin ifadelerini belirleyen Affymetrix probeları, R dili ortamında (versiyon 3.5.1) *dplyr* paketindeki (https://cran.r-project.org/web/packages/dplyr/index.html) ilgili fonksiyonlar kullanılarak ek açıklama dosyasından alınmıştır. Toplamda 301 geni temsil eden 608 probe eşleştirilmiş ve sonraki analizler için kullanılmıştır. Diferansiyel ifade analizinden sonra, iki veya daha çok probe ile eşleşen genlerden istatistiksel olarak önemli olanlar kullanılmıştır. Bioconductor'ın *limma* paketini kullanarak kontrol ile her bir muamele zaman noktasının (6,12 ve 24 sa.) karşılaştırılması için farklı bir diferansiyel ifade analizi yapılmıştır. Diferansiyel gen ifadesi, az sayıdaki tekrardan dolayı (her biri için 2) FDR<0.1 eşiğinin altında genelde istatistiksel anlamlı bir gen göstermemiştir, bu yüzden

seçim kriterlerimiz, *limma* paketinin empirik Bayes modülasyonlu t-test uygulandıktan sonra $p<0.05$'e dayandırılmıştır. Ven şemaları Venn Diagrams programı kullanılarak oluşturulurken (http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/), protein etkileşim ağları STRING versiyon 11 ile yapılmıştır (Jensen vd., 2009). Ağlar için etkileşim skorları indirilmiştir ve görüntüleme için Cytoscape versiyon 3.7.1' e taşınmıştır (Shannon vd., 2003). Isı haritaları Broad Enstitüsü'nün Morpheus programı kullanılarak oluşturulmuştur (https://software.broadinstitute.org/morpheus).

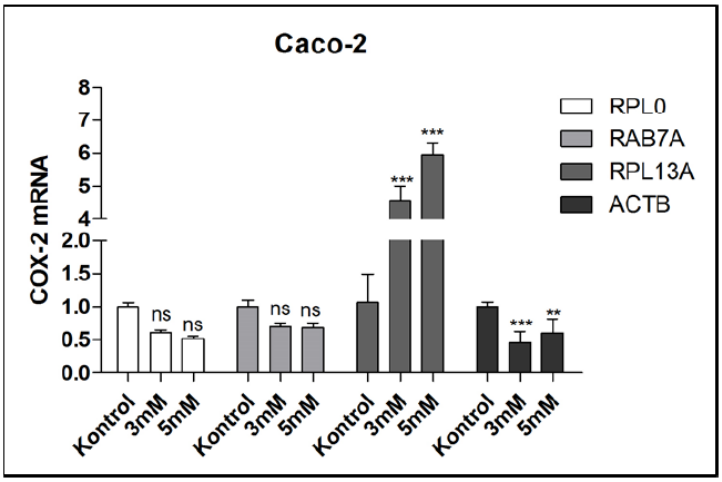
3.16. İstatistiksel Analizler

Elde edilen bulguların analizi ve grafik çiziminde GraphPad Prism 6 (La Jolla, CA, USA) programı kullanılmıştır. İstatistiksel anlamlılık dereceleri yıldız (*) ile ifade edilmiştir (*$p \leq 0.05$, **$p \leq 0.01$, ***$p \leq 0.001$, ****$p \leq 0.000$).

4. BULGULAR

4.1 NaBt muamelesinin COX-2 gen ifadesine etkisinin belirlenmesi
4.1.1 NaBt muamelesinin referans gen ifadesine etkisinin belirlenmesi

NaBt'ın, HDACi aktivitesi olduğundan gen ifadesini arttırabilir (Zhou vd., 2011). Deneylerimizde ilk olarak NaBt ile muamele edilmiş hücrelerde NaBt muamelesi görmemiş kontrol hücrelerine kıyasla referans genlerin değişip değişmediğini inceledik. Bu amaçla, birçok dokuda eşit oranda ifade edilen ve qRT-PCR tekniğinde referans gen olarak kullanılmaya uygun olan bir grup referans gen belirledik (Eisenberg ve Levanon 2013). NaBt muamelesi görmüş HT-29 hücrelerinin kullanıldığı halka açık mikrodizin veri setinden (GSE45220) bahsedilen referans genlerin ifade düzeylerini araştırdık. Bu genlerden, RAB7A (Ras-related Protein Rab-7a) ve RPL0 (Ribosomal Protein LO)'ın HT-29 hücrelerinde yüksek düzeyde ifade edildiğini gördük. NaBt ile 48 saat boyunca muamele edilmiş HT-29 ve Caco-2 hücrelerinde, RLP13A (Ribosomal Protein L13A) (Mogal ve Abdulkadir 2006) ve sık kullanılan bir referans gen olan ACTB ifadeleri kontrol hücreleri ile karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. **Şekil 1**'de görüldüğü gibi, ACTB ve RAB7A NaBt muamelesinden en az düzeyde etkilenmektedir; bu nedenle RAB7A, NaBt etkisinin incelendiği deneylerde ACTB ile birlikte referans gen olarak kullanılmıştır.



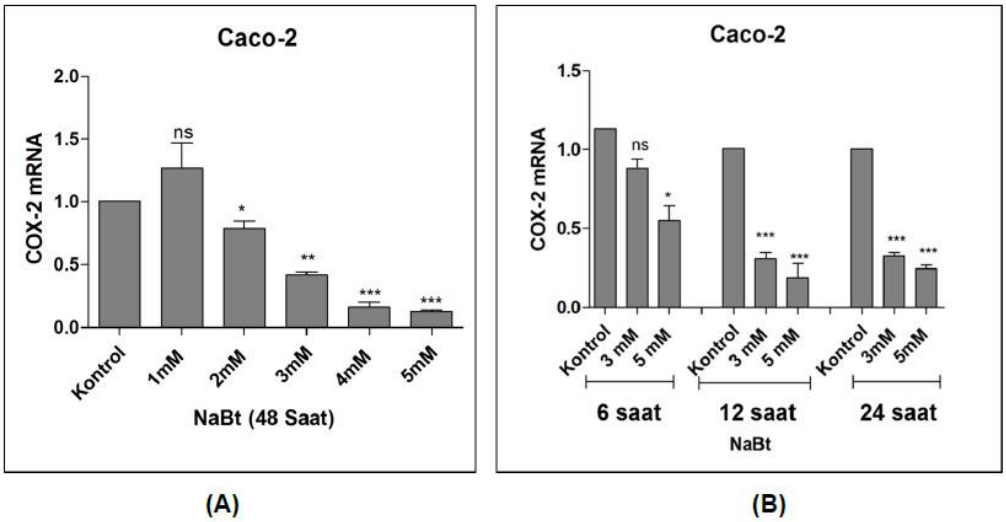
Şekil 1. NaBt ile 48 saat boyunca muamele edilen Caco-2 hücrelerinde, RPL0, RAB7A, RPL13A ve ACTB mRNA ifadelerinin qRT-PCR kullanılarak incelenmesi.

NaBt ile muamele edilmeyen hücreler kontrol olarak kullanılmıştır. Deneyler iki biyolojik, üç teknik replike olarak yapılmış; sonuçlar kontrol grubuna göre normalize edilerek, "kat artışı" olarak (mean±SD) verilmiştir. Kontrol grubuyla karşılaştırılan deney bulguları arasındaki istatiksel farklılıklar one way ANOVA ve Tukey's

multiple comparison test ile analiz edilmiştir. İstatistiksel anlamlılık dereceleri **p < 0.01 ve ***p ≤ 0.001 ile ifade edilmiştir.

4.1.2 NaBt muamelesinin PTGS-2 genin mRNA ifadesine etkisinin belirlenmesi

Referans gen olarak RAB7A ya da ACTB'nin kullanılabileceği belirlendikten sonra, değişik konsantrasyonlardaki NaBt ile muamele edilmiş Caco-2 ve HT-29 hücrelerindeki COX-2 ifadesi araştırılmıştır. Hem RAB7A'nın hem de ACTB'nin referans gen olarak kullanıldığı qRT-PCR deneylerinde benzer sonuçlar elde edilmiştir: NaBt'nin 3mM, 4mM ve 5mM konsantrasyonlarında, COX-2 ifadesinde konsantrasyona bağlı bir azalma görülmüştür. Ek olarak, Caco-2 hücreleri NaBt ile 6 sa., 12 sa. ve 24 sa. süreyle muamele edilmiş, takiben COX-2 gen ifadesindeki değişimler incelenmiştir **(Şekil 2)**. Belirtilen muamele süreleri için COX-2 mRNA'sında zaman ve doza bağlı bir azalma söz konusudur.

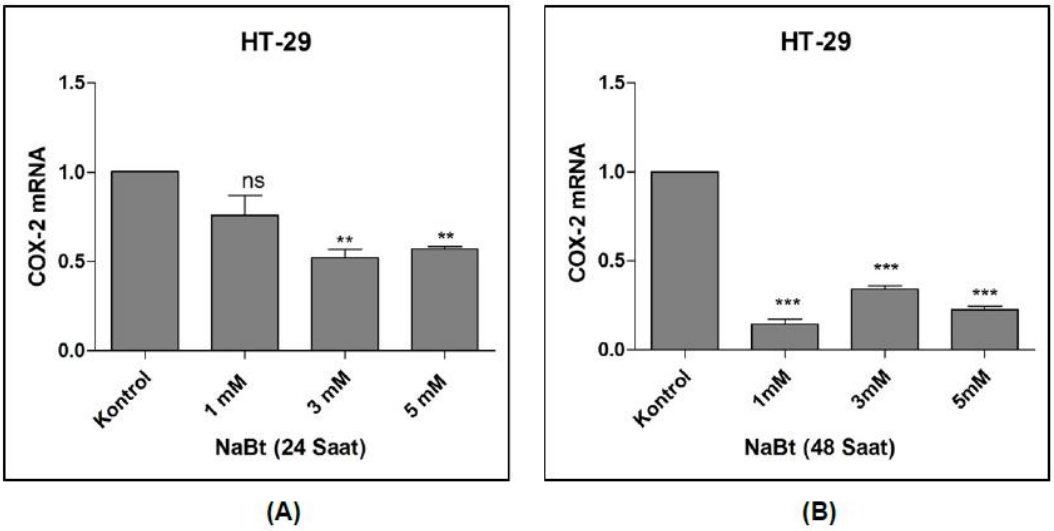


Şekil 2. Farklı NaBt konsantrasyonlarıyla 48 saat ve 6, 12 ve 24 saat muamele edilmiş Caco-2 hücrelerinde COX-2 mRNA ifadesi.

Caco-2 hücrelerinde NaBt'ın zaman ve doza bağlı olarak COX-2 mRNA'sında azalmaya neden olduğu görülmektedir. **(A)** 48 saat ve **(B)** 6, 12 ve 24 saatlik NaBt muamalesi sonrası COX-2 mRNA'sındaki değişim, her biri en az üç teknik replike olmak üzere, iki biyolojik replikenin ortalaması kontrol'e göre normalize edilerek, "kat artışı" olarak (mean± SD) verilmiştir. ACTB'nin referans gen olarak kullanıldığı deneyde, NaBt ile muamele edilmemiş kontrol grubuyla karşılaştırılan deney bulguları arasındaki istatiksel farklılıklar, unpaired Student t test ile belirlenmiş ve istatistiksel anlamlılık dereceleri *p < 0.05 ve ***p ≤ 0.001 ile ifade edilmiştir.

HT-29 hücrelerinde de NaBt'ın COX-2 mRNA'sında 24 (**Şekil 3A**) ve 48 saat (**Şekil 3B**) sonunda önemli ölçüde azalmaya neden olduğu görülmüştür. Özet olarak bu bulgular,

NaBt'ın incelenen doz ve muamele sürelerinde her iki hücre hattında da COX-2 mRNA ifadesinde azalmaya neden olduğunu göstermektedir.

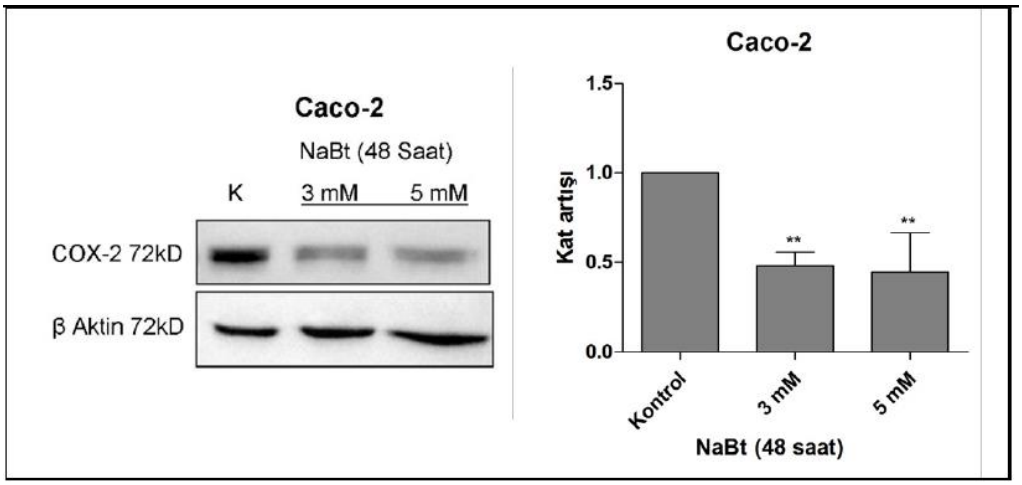


Şekil 3 Farklı NaBt konsantrasyonları ile 24 saat ve 48 saat muamele edilmiş HT-29 hücrelerinde COX-2 mRNA ifadesinin RT-qPCR ile analizi.

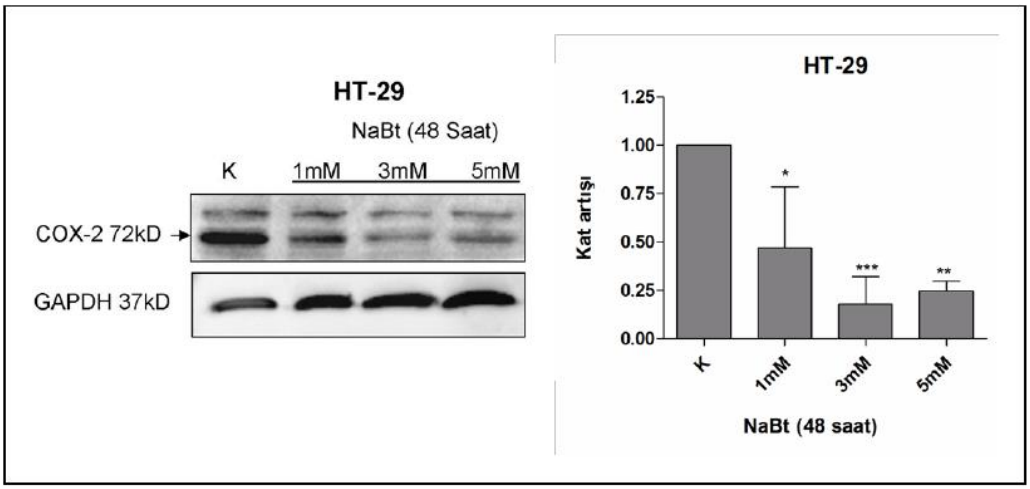
24 **(A)** ve 48 **(B)** saat sonunda COX-2 mRNA seviyelerinde NaBt'a bağlı değişim görülmektedir. Sonuçlar, kontrol'e göre normalize edilerek, "kat artışı" olarak (mean± SD) verilmiştir. ACTB'nin referans gen olarak kullanıldığı deneyde, kontrol grubuyla karşılaştırılan deney bulguları arasındaki istatiksel farklılıklar, unpaired Student t test ile belirlenmiş, istatistiksel anlamlılık dereceleri *p <0.01 ve ***p ≤ 0.001 ile ifade edilmiştir.

4.1.3 NaBt muamelesinin COX-2 protein ifadesine etkisinin belirlenmesi

NaBt muamelenin, Caco-2 ve HT-29 hücrelerinde COX-2 protein ifadesine etkisini araştırmak amacıyla western blot tekniği kullanılmıştır. Bu amaçla, COX-2 mRNA ifadesinde en dramatik azalmaya neden olan muamele süreleri seçilmiştir. 48 saat NaBt **(Şekil 4A ve B)** ile muamele edilen Caco-2 ve HT-29 hücrelerinden total protein izole edilerek, COX-2 antikoru ile blotlanmıştır. Deneylerde β-Aktin veya GAPDH yükleme kontrolü olarak kullanılmıştır. NaBt muamelesi, her iki hücre hattında da COX-2 protein ifadesinde azalmaya neden olmuştur. Western blot sonuçları, NaBt'in COX-2 mRNA ifadesini inhibe ettiği bulgusunu doğrular niteliktedir.



(A)



(B)

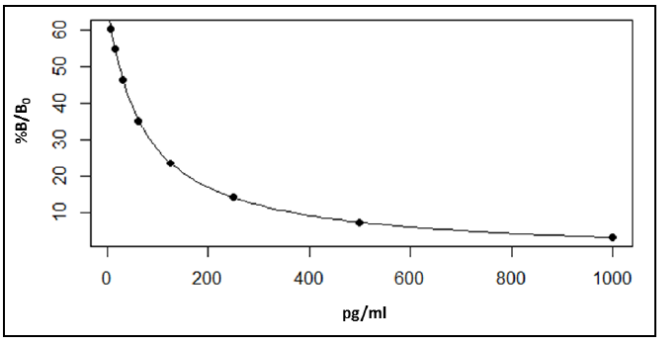
Şekil 4. NaBt muamelesinin Caco-2 ve HT-29 hücrelerinde COX-2 protein ifadesine olan etkisi.

Caco-2 **(A)** ve HT-29 **(B)** hücreleri 48 saat boyunca NaBt ile muamele edilmiş; COX-2 protein seviyeleri western blot ile belirlenmiştir. Bütün muamelelerde COX-2 protein seviyelerinde azalma gözlenmiştir. Western blot görüntüleri temsili olup, bar diyagramlar üç deneye ait sonuçların densitometrik analizidir. Densitometrik analizlerde protein ifadesi NaBt ile muamele edilmemiş kontrol grubuna (K) göre kat artışı olarak verilmiştir. β-Aktin ve GAPDH yükleme kontrolü olarak kullanılmıştır. İstatiksel anlamlılık one way ANOVA (Tukey's post hoc test) ile control grubuna göre belirlenmiştir (*$p \leq 0.05$; ***$p \leq$; **$p \leq 0.01$).

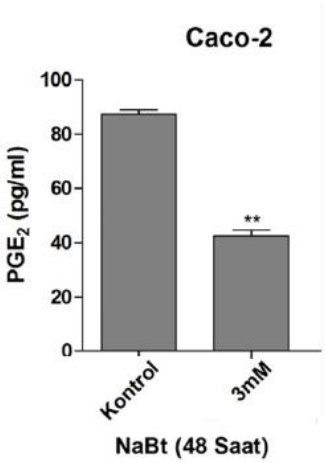
4.1.4 NaBt'ın PGE_2 sentezine etkisi

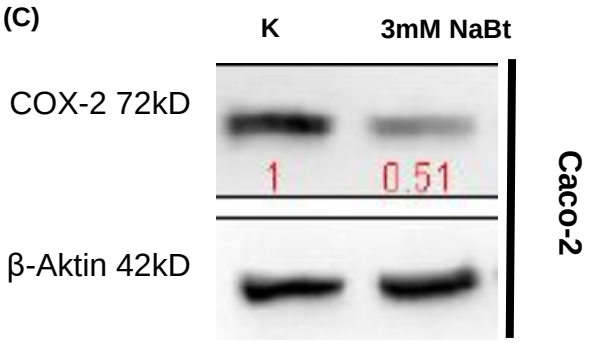
COX-2 ifade düzeyi ile birlikte, COX-2 enzimatik aktivitesinin bir sonucu olarak prostaglandin E_2 (PGE_2) seviyesindeki artışın, kolon kanserinin başlangıç, ilerleme ve metastaz evrelerinde etkili olduğu bilinmektedir (Greenhough vd., 2009). COX-2, araşidonik asitin, endoperoksidaz prostaglandin H_2'ye dönüşümünü katalizler (Williams vd., 1999). Sıvı ortamda kararsız bir ürün olan PGH_2, enzimatik olarak PGD_2 ve PGE_2'ye dönüşür (Tuncer ve Banerjee 2015). Bu nedenle, PGE_2 düzeyinin belirlenmesi, COX-2 enzimatik aktivitesinin ölçülmesi anlamında hızlı ve güvenilir bir yöntemdir. PGE_2 miktarının belirlenmesi amacı ile Caco-2 ve HT-29 hücreleri 48 saat boyunca NaBt ile muamele edilmiş, ardından besi yeri ELISA'da analiz edilmek üzere -80˚C'de saklanmıştır (en fazla 4 gün). ELISA'da besi yeri kullanılan hücrelere ait proteinler de COX-2 ifadesindeki değişimin belirlenmesi için kontrol amacıyla western blot'ta kullanılmıştır. Western blot analizi, COX-2 protein düzeyinde NaBt muamelesi ile önemli bir azalma olduğunu göstermiştir (**Şekil 4**). ELISA'da kullanılan standart grafiği **Şekil 5A**'da verilirken, besi yeri ELISA'da kullanılan hücrelerde NaBt ile COX-2 ifadesindeki değişim **Şekil 5B**'de verilmiştir. **Şekil 5C**'de görüldüğü gibi, Caco-2 hücrelerinde 3 mM NaBt muamelesi PGE_2 sentezini azaltmıştır. HT-29 hücrelerinde ise PGE_2 sentezinin oldukça düşük olduğu görülmüştür (veri gösterilemiyor). NaBt ile muamele edilmiş ve edilmemiş kontrol HT-29 hücrelerinden alınan en yüksek okumalar bile PGE_2 ELISA standart eğrisinin dışındadır.

(A)



(B)





Şekil 5. NaBt'ın PGE_2 sentezine etkisi.

(A) PGE_2 standart eğrisi. B=standartın bağlanma miktarı-blank, B0=maksimum bağlanma miktarı-blank olmak üzere, %B/B0-pg/ml PGE_2 miktarını veren 4 parametreli lojistik eğrisi, R programı kullanılarak oluşturulmuştur. Örneklerdeki PGE_2 miktarının belirlenmesi için bu eğriden faydalanılmıştır. (B) 48 saat boyunca NaBt ile muamele edilmiş Caco-2 hücrelerinde PGE_2 miktarı hücre sayısına göre normalize edilerek sonuçlar pg/ml olarak verilmiştir. Sonuçların analizinde t test kullanılmıştır (**$p \leq 0.01$). (C) ELISA'da kullanılan örnekler western blot ile analiz edildiğinde, 3mM NaBt ile muamele edilen Caco-2 hücrelerinde vehikül ile muamele eden kontrol (K) hücrelere göre COX-2 ifadesinde azalma görülmektedir. β-Aktin yükleme kontrolü olarak kullanılmıştır.

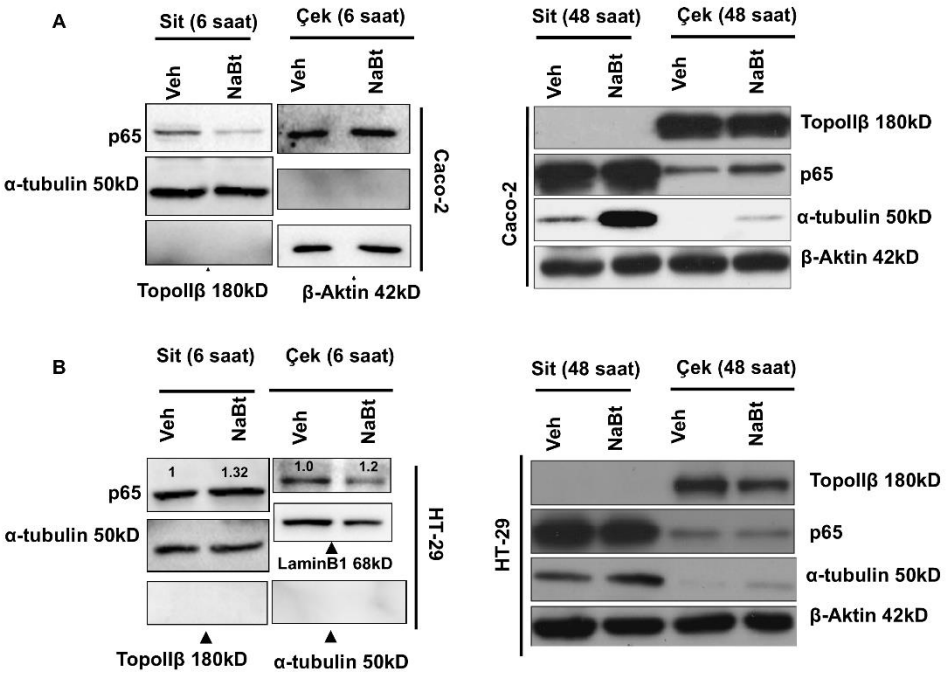
4.2. Gen ifadesinin post-transkripsiyonel düzenlenmesinde NaBt'ın rolü

4.2.1. COX-2'nin transkripsiyonel düzenlenmesinde NaBt'ın etkisi

Şu ana kadar verilerimiz, COX-2 ifadesinin (mRNA ve protein seviyesinde) NaBt ile muamele edilmiş Caco-2 ve HT-29 hücrelerinde doza bağlı şekilde azaldığını göstermektedir. Bu değişimin nedeninin gen ifadesinin transkripsiyonel düzeyde aşağı regülasyonu (down regulation) ya da post-transkripsiyonel mekanizmalar olabileceği düşünülmüştür.

Öncelikli olarak, uyarı sonucu çekirdeğe yer değiştiren ve COX-2'nin ifadesini güçlü bir şekilde arttıran transkripsiyon faktörü NF-κB'nin aktivasyonunu inceledik (Roelofs vd., 2014). Caco-2 hücreleri 6 sa (kısa süreli) veya 48 sa (uzun süreli) boyunca NaBt ile muamele edilmiştir ve bu hücrelerde p65'in (gen ifadesini trans-aktive eden NF-κB alt birimi) çekirdeğe yer değiştirmesi, lusiferaz raportörü deneyleri ile incelenmiştir. Bu deneylerin bir kısmı HT-29 hücreleri ile tekrarlanmıştır.

Caco-2 hücrelerinin 6 sa. NaBt ile muamelesi p65'in sitoplazmik seviyelerini arttırıp, nükleer seviyesinde ise herhangi bir değişikliğe sebep olmazken (**Şekil 6A, sol taraf**), 48 saat muamele p65'in nükleer yer değiştirmesinde artışa neden olmuştur (**Şekil 6A, sağ taraf).** HT-29 hücrelerinde, hem 6 sa (**Şekil 6B, sol taraf**) hem de 48 sa (**Şekil 6B, sağ taraf**) NaBt muameleleri sonunda p65 nükleer seviyesinde bir değişiklik gözlenmemiştir.

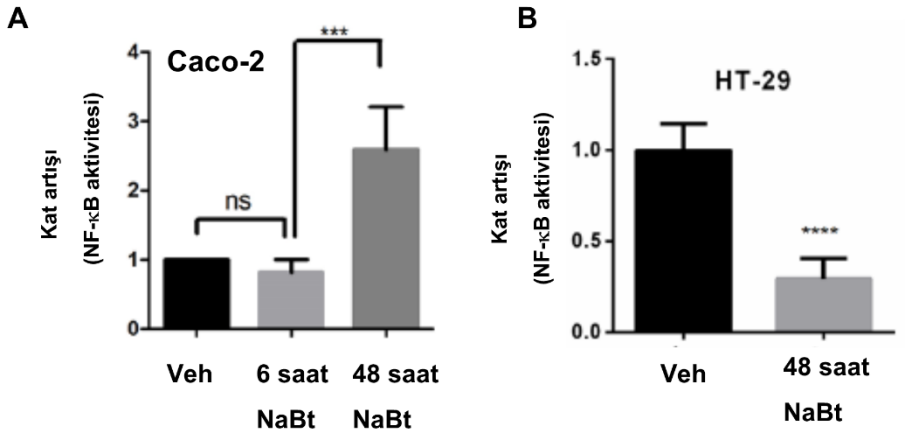


Şekil 6. NaBt ile muamele edilen hücrelerde NF-κB p65 nükleer yer değiştirmesini gösteren Western Blot.

Caco-2 ve HT-29 hücreleri 6 sa. veya 48 sa. NaBt ile muamele edilmiş ve bu hücrelerden sitoplazmik ve nükleer protein izolasyonu yapılmıştır. (A) p65'in işlevi için gerekli olan nükleer yer değiştirmesi Caco-2 hücrelerinde 48 sa muamele sonrası önemli ölçüde olmamakla birlikte artmıştır. (B) HT-29 hücrelerinde, 6 sa. ve 48 sa. muamele sonrası nükleer yer değiştirmede önemli bir değişim gözlenmemiştir. TopoIIβ nükleer markör olarak, α-tubulin sitoplazmik markör olarak, β-aktin ise yükleme kontrolü olarak kullanılmıştır.

NaBt'ın NF-κB'nin transkripsiyonel aktivitesini etkileyebildiğini doğrulamak için, NF-κB kanonik bağlanma sekansının 5 kopyasını içeren bir raportör vektör kullanarak lusiferaz deneyi yapılmıştır. Caco-2 hücrelerinde, 6 sa. NaBt muamelesinin lusiferaz aktivitesinde herhangi bir değişikliğe yol açmadığı, ancak 48 sa. muamelenin, western blot ile gözlenen

p65 nükleer yer değiştirmesini destekler şekilde transkripsiyonel aktivitede artışa sebep olduğu görülmüştür (**Şekil 7A**). HT-29 hücrelerinde ise lusiferaz aktivitesinde azalma gözlenmesi (**Şekil 7B**), NaBt ile muamele edilmiş HT-29 hücrelerinde NF-κB transkripsiyonel aktivitesinin engellendiğini ortaya koymaktadır.



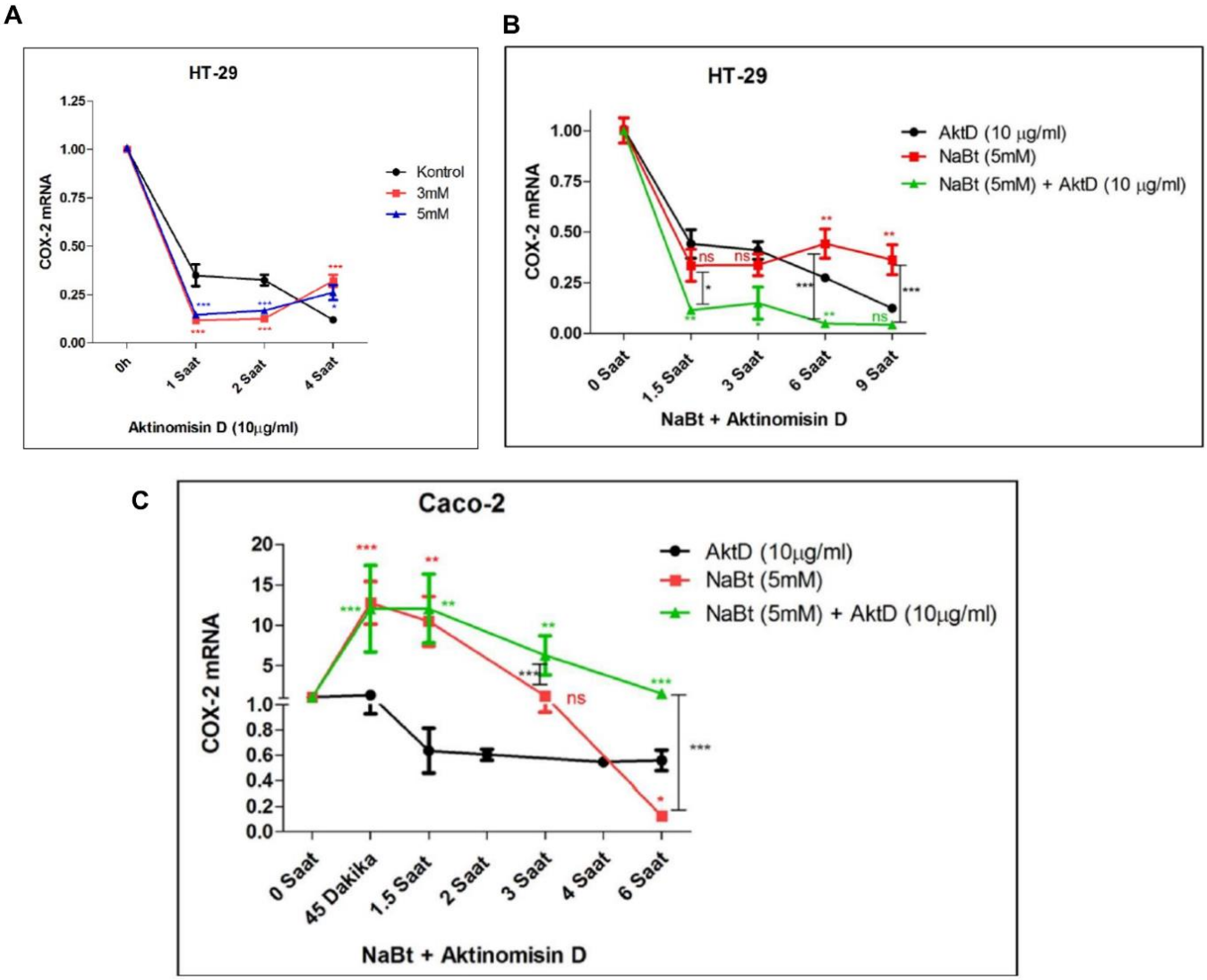
Şekil 7. NaBt ile muamele edilen hücrelerde NF-κB transkripsiyonel aktivitesini gösteren Lusiferaz deneyi.

(A) Caco-2 ve (B) HT-29 hücreleri NaBt ile 6 sa (sadece Caco-2) veya 48 sa. muamele edilmiş ve NF-κB lusiferaz vektörü ile 6 sa transfekte edilmişlerdir. Hücreler toplandıktan ve parçalandıktan sonra lusiferaz deneyinde kullanılmıştır. Hücreler aynı zamanda normalizasyon için Renilla lusiferaz vektörü ile transfekte edilmiştir. Örnekler Promega Dual Luciferase Analizi kullanılarak okunmuştur. Kontrol (vehikül) ile muamele edilmiş hücrelere göre hesaplanan istatistiksel anlamlılık için ANOVA ve ardından post-hoc testi uygulanmıştır. (***$p<0.001$, ****$p<0.0001$, ns: istatistiksel olarak anlamlı değil)

Bu veriler, COX-2 ifadesinin düzenlenmesindeki baş etmen olarak bilinen NF-κB'nin transkripsiyonel aktivitesindeki değişmenin, NaBt ile muamele edilmiş Caco-2 hücrelerindeki COX-2 mRNA ve protein ifadelerindeki dikkate değer azalmayı açıklayamadığını göstermektedir. Diğer yandan, HT-29 hücrelerinde azalan transkripsiyonel aktivite COX-2 ifadesindeki azalmaya katkıda bulunmaktadır. Bu yüzden, NaBt muamelesinin COX-2'nin post-transkripsiyonel düzenlenmesine yol açtığını varsaydık. Bu hipotezi test etmek için, NaBt varlığında COX-2 mRNA kararlılığını saptamak için Aktinomisin D takip deneyi kullanılmıştır.

4.3 NaBt'ın COX-2 mRNA Kararlılığına Etkisinin Aktinomisin D Kullanılarak İncelenmesi

NaBt'ın sentezlenmiş mRNA'nın kararlılığı üzerindeki etkisini belirlemek için promotör aktivitesine bağlı transkripsiyonun durdurulması hedeflenmiş; bu amaçla Aktinomisin D (Akt. D) kullanılmıştır. Akt. D, DNA'ya bağlanarak RNA polimerazın RNA zincirini uzatmasını engeller (Sobell, 1985). Bu özelliği ile promotör aktivitesini hesaba katmadan hücresel mRNA kararlılığının belirlenmesinde kullanılır (Cok vd., 2003). HT-29 hücreleri 48 saat boyunca 3 mM ve 5 mM NaBt ile muamele edilmiş, takiben hem NaBt ile inkübe edilmiş hem de edilmemiş hücrelere 1, 2 ve 4 saat boyunca 10 µg/ml Akt. D verilmiş, ardından COX-2 mRNA ifadesi RT-qPCR ile tayin edilmiştir. Bu deney, NaBt'ın hem 3 mM hem de 5 mM'lık konsantrasyonunun COX-2 mRNA stabilitesinde azalmaya neden olduğunu göstermiştir (**Şekil 8A**). Ayrıca, kısa süreli NaBt ve eş zamanlı Akt. D muamelesinin hem HT-29 hem de Caco-2 hücrelerinde COX-2 mRNA kararlılığına etkisi araştırılmıştır. NaBt+Akt. D muamelesi gören hücrelerle kıyaslandığında, sadece Akt. D ile muamele edilen hücrelerde COX-2 mRNA'sında hızlı bir azalma gözlenmiştir. Özet olarak, kısa süreli Nabt muamelesi HT-29 hücrelerinde uzun süreli NaBt muamelesi ile benzer sonucu vermiştir: Akt. D ile muamele gören kontrolle kıyaslandığında, NaBt+Akt. D ile muamele görmüş hücrelerde COX-2 mRNA'sının destabilizasyonunu söz konusudur (**Şekil 8B**). Fakat, Caco-2 hücrelerinde aynı deney düzeneği COX-2 mRNA'sının stabilize edildiğini göstermiştir (**Şekil 8C**). Sonuç olarak, yeni mRNA sentezi olmadığında NaBt, HT-29 hücrelerinde COX-2 mRNA yıkımını arttırırken; Caco-2 hücrelerinde bu yıkım süreci yavaşlamıştır. Caco-2 hücrelerinde gözlenen bu fenomen, COX-2 mRNA'sının Caco-2 hücrelerinde stabilize edildiğini göstermektedir. Akt. D'nin etkin olarak çalışarak COX-2 mRNA'sının azalmaya başladığı 45 dakikadan sonraki zaman noktalarında, sadece Akt. D uygulanmış ve sadece NaBt ya da NaBt+Akt. D uygulanmış hücreler arasında COX-2 mRNA düzeyleri farklılık göstermiştir. Ek olarak, Caco-2 hücrelerinde tek başına Akt. D ile karşılaştırıldığında, NaBt ya da NaBt+Akt. D muamelesi gören hücrelerde 45 dakikalık kısa süreli uygulamanın, COX-2 mRNA'sında büyük bir artışa neden olduğu görülmüş olup, bu artış NaBt'ın COX-2 mRNA'sını stabilize edici etkisine işaret etmektedir. Bununla birlikte, 45 dakikalık muamele sonunda COX-2 mRNA'sında görülen bu artış, doğrudan transkripsiyonel düzenlenmeden de kaynaklanıyor olabilir.

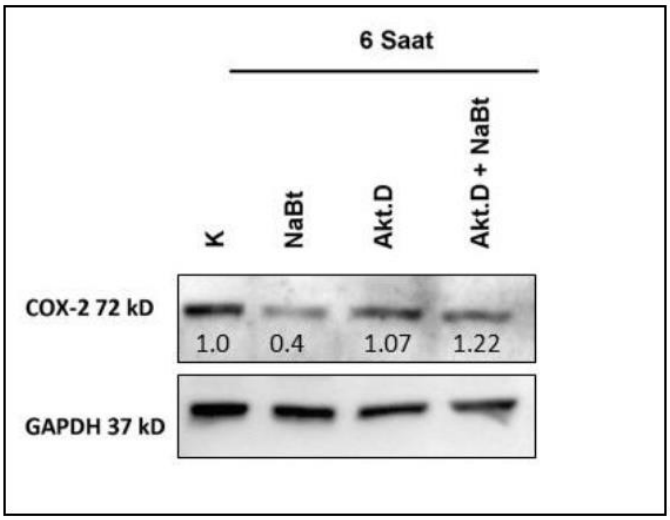


Şekil 8. NaBT'ın mRNA sentezinin durdurulması durumunda COX-2 mRNA stabilitesine etkisi.

(A) HT-29 hücreleri 48 saat boyunca 3mM ve 5mM NaBt ile muamele edilmiştir. Takiben hem NaBt ile inkübe edilmiş hem de edilmemiş hücrelere 1, 2 ve 4 saat boyunca 10 µg/ml Aktinomisin D verilmiş, ardından COX-2 mRNA ifadesi RT-qPCR ile tayin edilmiştir. Deneyin sonucunda NaBt ile muamele edilen hücrelerde kontrol grubuna oranla anlamlı bir azalma görülmüştür. (B) HT-29 ve (C) Caco-2 hücrelerinde Akt. D varlığında NaBt'ın COX-2 mRNA kararlılığına etkisi incelenmiştir. Hücreler NaBt (5 mM), Akt. D (10 µg/mL) ya da NaBt (5 mM) + Akt. D (10 µg/mL) ile serumsuz besi yerinde muamele edilmiştir. COX-2 mRNA seviyeleri qRT-PCR ile belirlenmiştir. Normalizasyon, RAB7A mRNA seviyelerine göre yapılmıştır. Sonuçlar, muamele edilmemiş 0. saat kontrolüyle karşılaştırılıp, kat artışı olarak verilmiş olup (mean± SD), istatiksel anlamlılık one-way analysis of variance (ANOVA), post hoc Tukey's multiple comparison test ile belirlenmiştir.

mRNA'ya ek olarak, Caco-2 hücrelerinde Akt. D varlığında NaBt muamelesinin COX-2 protein seviyesine etkisi de incelenmiştir (**Şekil 9**). 6 sa. sonunda, NaBt ile muamele

edilen hücrelerde, sadece Akt. D ile muamele edilen hücrelere kıyasla COX-2 proteininde azalma söz konusudur. 6. saatin sonunda COX-2 protein seviyesinin NaBt ve Akt. D ile eş zamanlı olarak muamele edilen hücrelerde, sadece Akt. D ile muamele edilen hücrelere kıyasla yüksek olduğu görülmüştür.



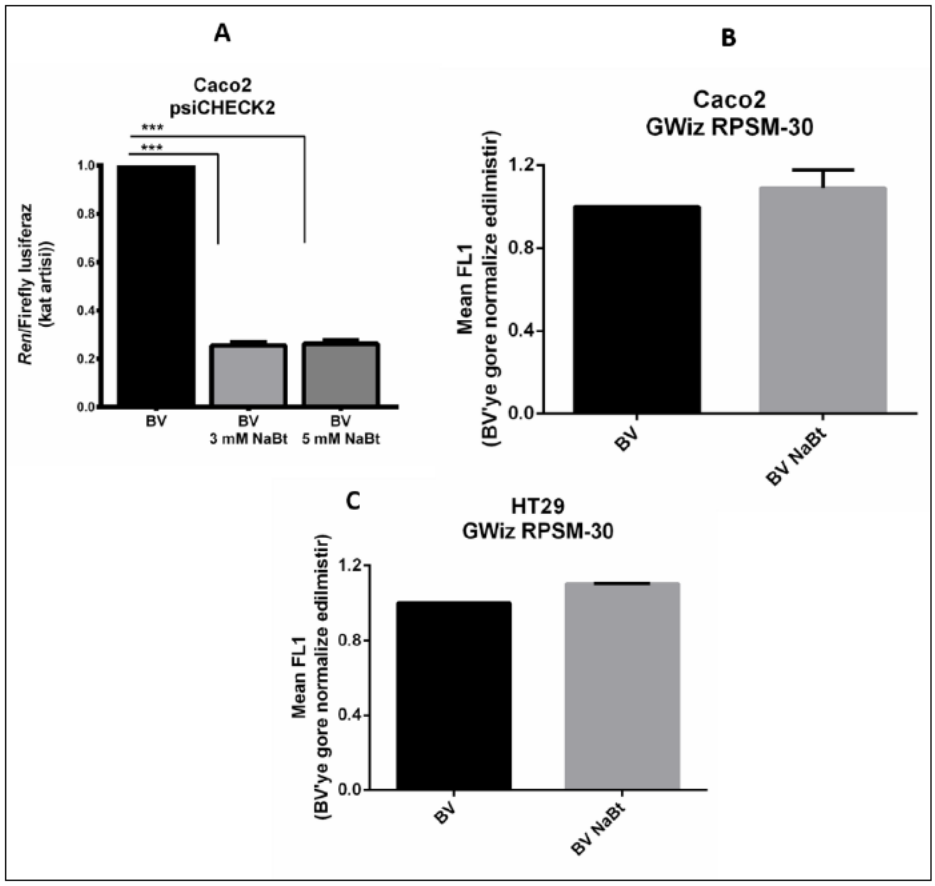
Şekil 9. Caco-2 hücrelerinde NaBT'ın mRNA sentezinin durdurulması durumunda COX-2 protein ifadesine olan etkisi.

Caco-2 hücreleri 6 saat boyunca NaBt, Akt. D veya NaBt ve Akt.D ile eş zamanlı olarak muamele edilmiş, COX-2 protein seviyesi western blot ile belirlenmiştir. GAPDH yükleme kontrolü olarak kullanılmış olup, densitometrik değerler 0. saat muamele edilmemiş kontrole (K) göre kat değişimi olarak verilmiştir.

Şekil 9'da gösterilen veri, Caco-2 hücrelerinin sadece NaBt ile muamelesinin COX-2 protein seviyesinde büyük bir azalmaya yol açtığını göstermektedir. mRNA sentezi AktD ile engellenen hücrelerde NaBt muamelesinin COX-2 protein seviyesinin sadece AktD muamelesi gören hücrelere kıyasla yüksek olduğu görülmüştür. Bu yüzden, NaBt'ın COX-2'nin hem transkripsiyonel hem de post-transkripsiyonel düzenlenmesine neden olabileceği düşünülmüş. Hipotezin incelenmesi için COX-2 geninin ve TNF (Tumor Necrosis Factor) geninin 3'UTR'larını ve birçok farklı ARE'ye bağlanan proteinin tanıdığı bir kanonik ARE sekansının klonlandığı lusiferaz vektörlerini kullanarak raportör gen analizleri yapılmıştır.

4.4. COX-2 3'UTR kararlılığının raportör gen ile araştırılması

Proje önerisinde, Rapor 1 ve Rapor 2'de belirtildiği gibi, COX-2'nin bütün 3'UTR'sini, ARE zengin bölgesini (ilk 170 baz çifti) ve delta ARE bölgesini (geriye kalan 3'UTR) psiCHECK2 vektörüne klonlamıştık; fakat, psiCHECK2'deki CMV promotörünün NaBt muamelesine oldukça duyarlı olduğunu gösterecek şekilde boş vektör ile transfekte edilmiş hücrelerde dahi lusiferaz aktivitesinde önemli ölçüde azalma gözledik. Bu nedenle, promotörü NaBt muamelesine yanıt vermeyen bir raportör vektör araştırılmıştır. gWIZ RPS30M GFP vektörü, Dr. Khalid S. A. Khabar (Molecular BioMedicine Program, King Faisal Specialist Hospital and Research Centre, Suudi Arabistan) ve ekibi tarafından viral promotörlerin, kullanılan uyarıcılar karşısında regüle olma problemini ortadan kaldırmak üzere tasarlanmış bir yeşil floresan protein raportör vektörüdür. Vektörün tasarlanmasında gWIZ GFP omurgası kullanılmış olup, vektördeki CMV promotörü kaldırılarak yerine RPSM30 ribozomal protein promotörü klonlanmıştır. Promotörün TATA sinyali ve SP1 transkripsiyon faktörü bağlanma bölgesi optimize edilmiş ve bu modifiye promotör "RPMS30M" olarak isimlendirilmiştir. Hitti vd., (2010) tarafından yapılan deneysel çalışmalar sonucunda, RPS30M promotörünün proinflamatuar sitokinlere cevap vermezken, ARE bağlanan proteinlerin çalışılması için son derece uygun olduğu görülmüştür (Hitti vd., 2010). gWIZ RPS30M EGFP boş vektörü ile COX-2 3'UTR ARE bölgesi ve mutasyona uğratılmış ARE bölgesini içeren gWIZ RPS30M EGFP vektörü laboratuvarımıza Dr. Khalid S.A. Khabar tarafından hediye edilmiştir. Öncelikle, GWIZ promotörünün NaBt'ye duyarlı olup olmadığını araştırılmıştır. Caco-2 hücreleri ya psiCHECK2 boş vektörü ya da pGWIZ RPS30M EGFP boş vektörü ile 24 sa transfekte edilip ardından 3 mM veya 5 mm NaBt ile 24 sa muamele edilmiştir. HT-29 hücreleri pGWIZ RPS30M EGFP boş vektörü ile 24 sa transfeksiyonu takiben 3 mM NaBt ile 24 sa muamele edilmiştir. Kontrol hücreleri vehikül (su) ile muamele edilmiştir. Hücreler toplanıp EGFP ifadesi için flow sitometre ile analiz edilmiştir. psiCHECK2 vektörünün aksine, pGWIZ RPS30M EGFP boş vektörünün NaBt'a duyarsız olduğu görüldüğünden (**Şekil 10**), lusiferaz raportör analiz deneylerine bu vektör ile devam edilmiştir.

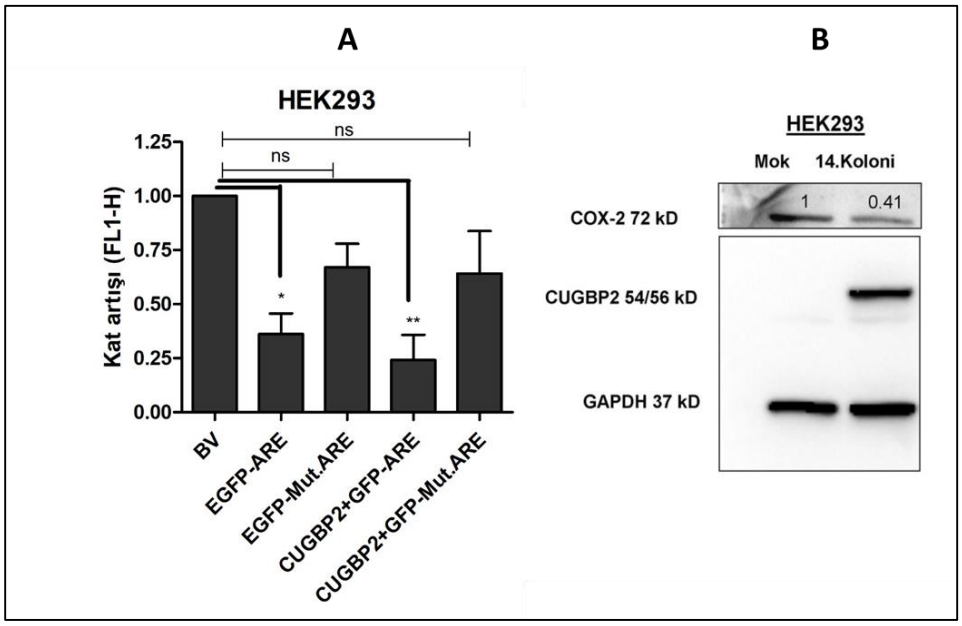


Şekil 10. NaBt muamelesi karşısında psiCHECK2 lusiferaz ve pGWIZ RPSM30 EGFP vektör sistemlerinde raportör aktivitesindeki değişimler.

(A) psiCHECK2 vektörü ile 24 saat boyunca transfekte edilen Caco-2 hücreleri, 24 saat boyunca 3 mM ya da 5 mM NaBt muamelesi görmüştür. Rennila/firefly oranı, NaBt ile muamele edilmemiş BV'e göre kat artışı olarak verilmiştir. pGWIZ RPSM30 -EGFP vektörü ile 24 saat boyunca transfekte edilen **(B)** Caco-2, **(C)** HT-29 hücreleri 24 saat boyunca 3 mM NaBt muamelesine tabi tutulmuştur. İnkübasyon sonunda akış sitometrisi ile belirlenen EGFP sinyal değerleri, NaBt ile muamele edilmemiş hücrelere kıyasla kat artışı olarak verilmiştir. İstatiksel anlamlılık t test ile belirlenmiştir (***p<0,001).

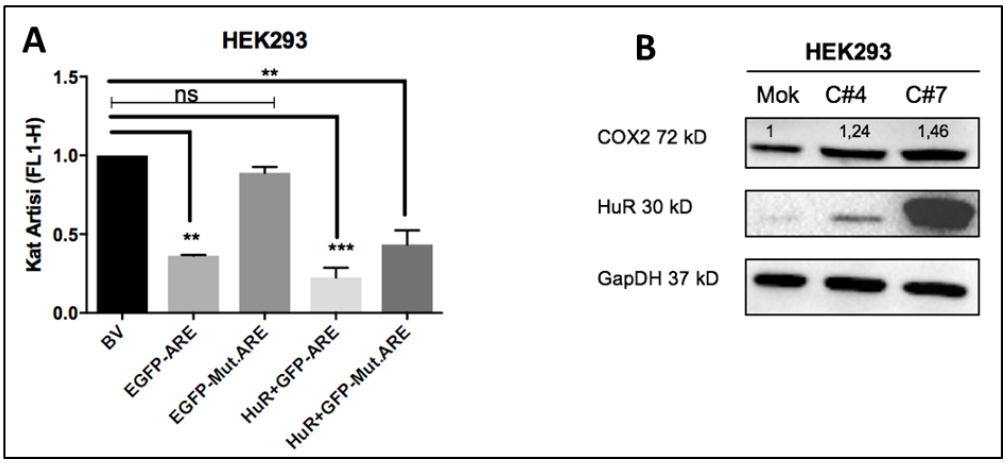
3. raporda belirtildiği gibi, ARE'ye bağlanan birkaç farklı proteini (HuR, AUF1 ve CUGBP-2) klonlayıp HEK293 hücrelerinde aşırı ifadeledik (Detaylar Rapor 3 Bölüm 3.4'de sunulmuştur). COX-2 3'UTR'ından pGWIZ RPS30M EGFP vektörüne klonlanan ARE sekansının ARE'ye bağlanan proteinler varlığında duyarlılığını saptamak için HEK293 hücrelerinde mRNA'yı stabilize eden CUGBP-2 ve HuR ARE'ye bağlanan proteinlerini, COX-2 ARE sekansını içeren pGWIZ RPS30M EGFP vektörüyle birlikte aşırı ifadeledik. Deneylerde mutant COX-2 ARE sekansını içeren pGWIZ RPS30M EGFP vektörü kontrol olarak kullanılmıştır. COX-2 ifadesinin yüksek olduğu durumlarda stabilizasyonu

gösterecek şekilde EGFP raportör sinyalinin yüksek olması beklenmiştir. Deney sonuçları CUGBP-2 (**Şekil 11**) veya HuR (**Şekil 12**) aşırı ifadelenmesinin EGFP sinyalinde herhangi bir artışa sebep olmadığı, başka bir ifade ile 3'UTR aktivitesinde stabilizasyon etkilerinin olmadığı görülmüştür.



Şekil 11. CUGBP2 aşırı ifadesinin COX-2 ARE aktivitesine ve COX-2 protein ifadesine etkisi.

(A) HEK293 hücreleri pGWIZ RPSM30 CUGBP2 aşırı ifade vektörü ve pGWIZ RPSM30 EGFP-ARE / veya EGFP-Mut.ARE raportör yapıları ile birlikte transfekte edilmiştir. GFP sinyali, akış sitometrisi ile ölçülmüş ve boş vektöre göre normalize edilmiştir. Sonuçlar kat değişimi olarak sunulmuş ve üç bağımsız deneyin ortalaması olarak verilmiştir. İstatistiksel anlamlılık Post hoc Tukey'in çoklu karşılaştırma testi kullanılarak belirlenmiştir. (B) HEK293 hücreleri pGWIZ RPSM30 CUGBP2 vektörü ile transfekte edilmiş ve elde edilen lizatlar Western blot tekniğinde kullanılarak CUGBP2 ve COX-2 proteinlerinin ifade seviyesi için analiz edilmiştir. İstatiksel anlamlılık ANOVA ve Tukey's post hoc test ile belirlenmiştir (*p<0,05, **p<0,01).



Şekil 12. HuR aşırı ifadesinin COX-2 ARE aktivitesine ve COX-2 protein ifadesine etkisi.

(A) pGWIZ RPSM30 EGFP-ARE veya EGFP-Mut.ARE vektörleri pGWIZ RPSM30 HuR vektörü ile beraber veya ayrı ayrı HEK293 hücrelerine transfekte edilmiştir. GFP sinyali, akış sitometresi ile ölçülmüş ve sinyaller boş vektöre göre normalize edilerek, iki bağımsız deneyin ortalaması olarak kat artışı olarak verilmiştir. İstatistiksel anlamlılık one-way analysis of variance (ANOVA), post hoc Tukey's multiple comparison test ile belirlenmiştir. (B) İki ayrı koloniden (C#4, C#7) izole edilen pGWIZ RPSM30 HuR vektörleri HEK293 hücrelerine transfekte edilmiş ve Western blot kullanılarak HuR ve COX-2 ifadesi belirlenmiştir. İstatiksel anlamlılık ANOVA ve Tukey's post hoc test ile belirlenmiştir (**p<0,01, ***p<0,001)

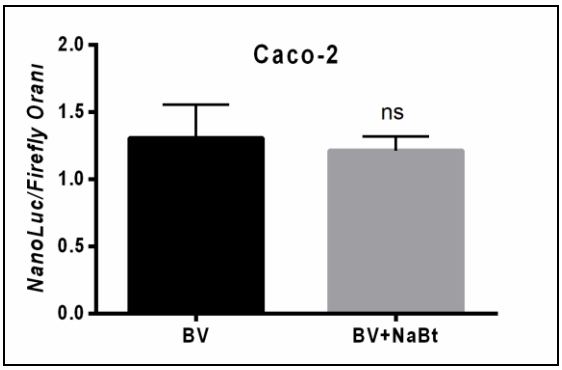
Şekil 11 ve **Şekil 12**'de görüldüğü gibi, ARE sekansının varlığı boş vektöre göre raportör (EGFP) sinyalinde azalmaya neden olurken, bu durum mutasyonlu ARE sekansı kullanıldığında tersine dönmüştür. Bu da raportör sistemin çalıştığını göstermektedir. Fakat ARE'ye bağlanan proteinlerin aşırı ifadelenmesi başarılı olmasına rağmenraportör gen ifadesinde bir değişikliğe yol açmamıştır. Bu durumun birçok açıklaması vardır:

1. EGFP sinyali, flow sitometre yardımıyla, eksitasyon 488nm'de ve emisyon 525nm'de kullanılarak saptanmıştır. Bu dalga uzunlukları, EGFP için en yüksek eksitasyon olan 395 nm ve en yüksek emisyon olan 509nm'den çok uzaktadır. Ayrıca Khabar grubu, raportör sinyali saptamak için flow sitometri kullanmamıştır (Hitti vd., 2010). Bu sebeple, raportör sinyaldeki küçük değişimleri saptayamamış olma ihtimalimiz vardır.

2. ARE'ye bağlanan proteinlerin sitoplazmik yer değiştirmesini (aktifleşmesi) ve RNA'ya bağlanmasını düzenleyen sinyal yolakları HEK293 hücrelerinde aktif değildir.

Bu yüzden, raportör gen ifadesinin kantitatif tayini için lüminesans temelli Super Nanoluc raportör sistemini kullanmaya karar verdik. Raportör analiz için normalizasyon ateşböceği

(Firefly) vektörü ile yapılmıştır. Bütün vektörler RPS30M promotörünü içermektedir (Hitti vd., 2010) ve Dr Khalid S.A. Khabar tarafından hediye edilmiştir. Öncelikle bu vektördeki RPS30M promotörünün de NaBt'a duyarlı olup olmadığı araştırılmıştır. Bunun için, Caco-2 hücreleri RPS30M Nanoluc boş vektörü ile transfekte edilmiş, ardından 48 sa. boyunca 5mM NaBt ile muamele edilmiştir. Hücre lizatlarının nanolusiferaz analizi için Nanoluc luciferase kit (Promega) kullanılmıştır. Sonuçlar bu vektör promotörünün de NaBt'a yanıt vermediğini göstermiştir (**Şekil 13**).



Şekil 13. NaBt muamelesi karşısında pGWIZ RPSM30 Nanoluc vektör sistemlerinde raportör aktivitesindeki değişimler.

pGWIZ RPSM30 Nanoluc boş vektörü (BV) ile 24 saat boyunca transfekte edilen Caco-2 hücreleri, 48 saat boyunca 5 mM NaBt muamelesi görmüştür. Nanoluc/firefly oranı, NaBt ile muamele edilmemiş BV'e göre kat artışı olarak verilmiştir. İnkübasyon sonunda İstatiksel anlamlılık t test ile belirlenmiştir.

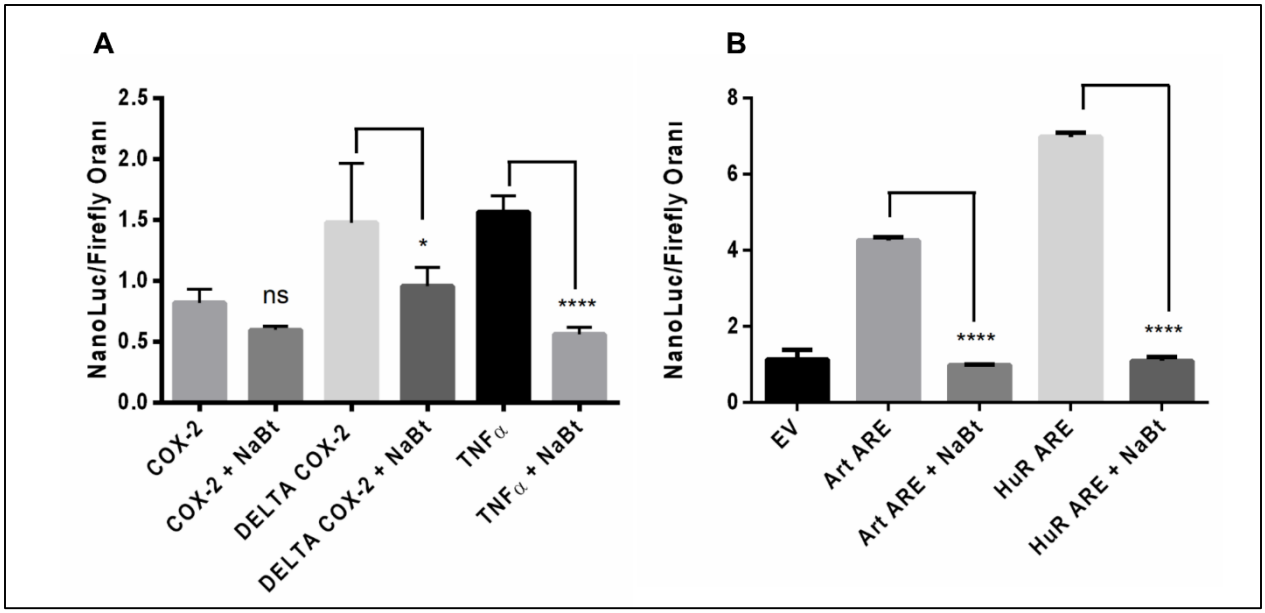
Birçok farklı sekansı, NaBt muamelesinden sonra gen ifadesindeki rollerini araştırmak için pGWIZ RPS30M Nanoluc vektörüne klonladık.

1. COX-2 3'UTR'nin ARE zengin bölgesi (ilk 170 baz çifti)
2. COX-2 3'UTR'nin ARE zengin bölgesi dışında kalan DELTA ARE bölgesi
3. RBP'ler tarafından post-transkripsiyonel düzenlemeye uğrayan başka bir inflamatuvar gen olan TNFα'nın 3'UTR bölgesi (Kafasla vd., 2014)
4. Birçok farklı RBP'nin bağlanabildiği yapay bir ARE sekansı (Helfer vd., 2012)
5. Sadece HuR RBP'nin bağlanabildiği bir yapay ARE sekansı

Caco-2 hücreleri bu vektörlerle 6 sa boyunca transfekte edilmiş ve ardından bu hücrelere 48 sa boyunca 5 Mm NaBt muamelesi uygulanmıştır. Boş vektör ile transfekte edilen ve

muamele görmeyen hücreler kontrol olarak kullanılmıştır. NaBt varlığında COX-2 ARE zengin bölgesi 3'UTR aktivitesinde önemli ölçüde olmamakla birlikte bir azalma gözlenmiştir (**Şekil 14A**). Ek olarak, COX-2 3'UTR'nin Delta ARE sekansının 3'UTR aktivitesinde de benzer bir değişim söz konusudur. TNFα 3'UTR'nın ARE sekansının klonlandığı vektörde ise 3'UTR aktivitesinde güçlü bir azalma söz konusudur (**Şekil 14A**).

İlginç olarak, yapay ARE vektörü (Art ARE) ve HuR'ın bağlandığı ARE vektörü (HuR ARE) ile transfekte edilip, muamele yapılmayan Caco-2 hücrelerindeki lusiferaz aktivitesi boş vektöre göre oldukça yüksektir ve bu durum stabilize eden proteinlerin bağlandığını göstermektedir. Ayrıca, 48 sa boyunca 5 mM NaBt muamelesi gören hücrelerden alınan lusiferaz sinyalinde, klonlanan her iki ARE sekansı için de önemli bir azalma söz konusudur (**Şekil 14B**). Hem stabilize eden hem de destabilize eden RBP'ler genlerin 3'UTR'lerine bağlanabilmektedirler ve bu RBP'lerin, ARE sekanslarına bağlanmak için birbirleriyle yarıştıkları bilinmektedir (White vd., 2013). Ek olarak, bu 3'UTR sekanslarında microRNA'lar için bağlanma sekansları da bulunabilmektedir. COX-2 ve TNFα 3'UTR sekanslarından düşük sinyal almamızın sebebi rekabet halindeki birçok farklı RBP'nin veya miRNA'nın muhtemel bağlanması olabilir. Yapay ARE (Art. ARE) sekansına bağlanan tahmini RBP'ler RBPDB (http://rbpdb.ccbr.utoronto.ca/) ile analiz edilmiştir ve HuR (ELAVL1, 5 bağlanma bölgesi), HuB (ELAVL2, 3 bağlanma bölgesi) ve TTP (ZFP36, 3 bağlanma bölgesi)'nin bulunduğu sınırlı sayıda RBP'lerin bu ARE'ye bağlanabildiği görülmüştür. Bu yüzden, bu yapay ARE, NaBt varlığında daha çok değişim göstermiştir. HuR'ın bağlandığı yapay ARE için yapılan analiz, sadece HuR'ın bu sekansa bağlandığını göstermiştir.



Şekil 14. 3'UTR aktivitesinde NaBt'ın etkisini gösteren Lusiferaz analizi.

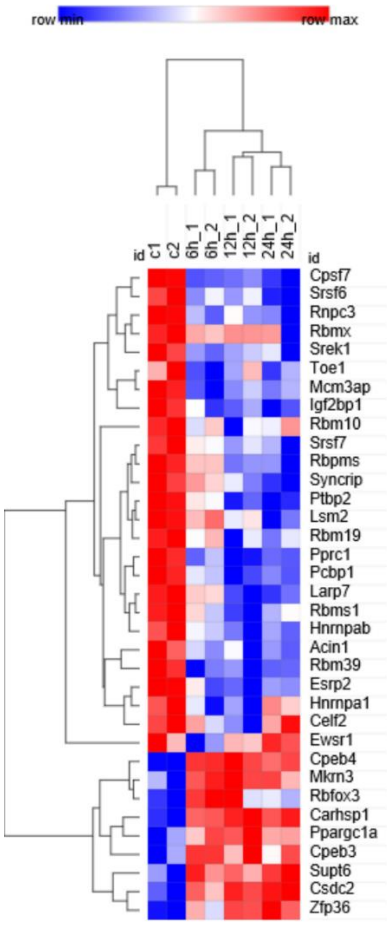
(A) COX-2 ve TNFα AREları ve (B) çeşitli RBP'nin bağlandığı yapay ARE ve sadece HuR'ın bağlandığı yapay ARE. Caco-2 hücreleri bu vektörlerle 6 sa boyunca transfekte edilmiş ve ardından bu hücrelere 48 sa boyunca 5Mm NaBt muamlesi uygulanmıştır Hücreler toplanıp lusiferaz aktivitesi için işlenmiştir. Firefly lusiferaz genini içeren bir vektör normalizasyon kontrolü olarak kullanılmıştır. İki bağımsız tekrarın istatistiksel analizi için ANOVA'yı takiben posthoc çoklu karşılaştırma testi uygulanmıştır (****p<0,0001, ns: istatistksel olarak anlamlı değil).

NaBt'ın hem Caco-2 hem de HT-29'da COX-2 ifadesini azalttığı Şekil 2, 3 ve 4'te gösterilmektedir. Her iki hücre hattında da yapılan Aktinomisin D takip deneyi post-transkripsiyonel düzenlemenin varlığına işaret etmiştir (**Şekil 8**). Çeşitli ARE sekanslarının kullanıldığı lusiferaz analizinde, NaBt muamelesinin lusiferaz aktivitesinde azalmaya sebep olması destabilize eden proteinlerin mRNA'ya bağlanmasındaki artmadan veya stabilize eden proteinlerin mRNA'ya bağlanmasındaki azalmadan kaynaklı olabilir. Bu sebeple, NaBt muamelesinin RNA'ya bağlanan proteinlerin ifadesinde bir değişikliğe sebep olup olmadığını incelenmiştir. Bunun için, halka açık mikrodizi verilerinin detaylı bioinformatik analizini yapılmıştır.

4.5 RBP'lerin ifadesinde NaBt'ın rolünün *in silico* analizi

0, 6,12 ve 24 sa 2 mM sodium bütirat (NaBt) ile muamele görmüş immortalize, transforme olmamış fare kolon epitel hücre hattından elde edilen halka açık mikrodizi veri seti

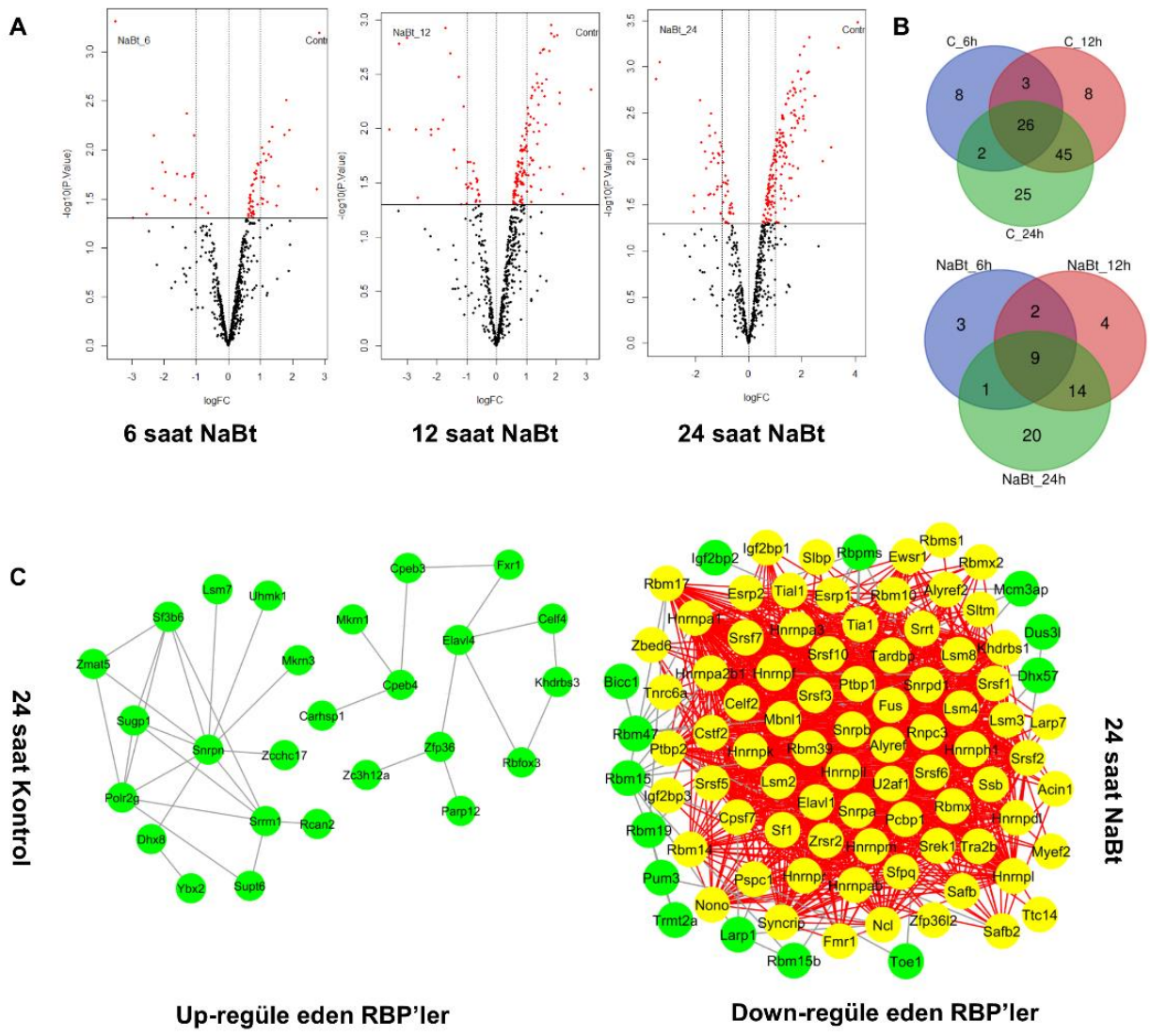
(GSE4410) RBP'lerin ifadesi için analiz edilmiştir (Tabuchi vd., 2006). Fare hücrelerinde ifadelenen RBP'lerin listesi RBPDB'den alınmıştır (Cook vd., 2011). 313 RBP ifadesi için oluşturulan ısı haritası NaBt muamelesinin RBP'lerin büyük bir kısmında azalmaya sebep olduğunu göstermektedir: 43 RBP geninin ifadesinde artış, 117 RBP gen ifadesinde azalma söz konusudur (**Şekil 15**).



Şekil 15. NaBt ile muamele edilen fare kolon epitel hücrelerinde birçok RBP'nin azalışını gösteren ısı haritası.

NaBt muamele süresi arttırkça, ifadesi artma ya da azalma yönünde değişen RBP'lerde görülen ifade değişiminin daha güçlü olarak ortaya çıktığı belirlenmiştir. (**Şekil 16A**). 26 RBP'deki azalma ve 9 RBP'deki artmanın, incelenen en erken muamele süresi olan 6 saat için de geçerli olduğu görülmüş olup (**Şekil 16B**); bu genlerin hepsi için incelenen muamele süresince gen ifadesi anlamında oldukça güçlü değişiklikler belirlenmiştir. NaBt

varlığında her zaman noktasında önemli ölçüde azalan ve artan genlerin bir sinyal ağı oluşturup oluşturmadığı STRING kullanarak sorgulanmıştır. Azalış gösteren RBP'lerin sıkı bir ağ oluşturduğunu görülürken (kırmızı çizgilerle gösterilmiştir), artış gösteren RBP'lerin görece daha zayıf bir etkileşim ağı (gri çizgilerle gösterilmiştir) oluşturduğunu görülmüştür (**Şekil 16C**). Artış gösteren RBP'lere oranla azalış gösteren RBP'lerin birbirine daha yakın ve daha geniş kapsamlı bir sinyal yolağının parçası olması olasıdır.



Şekil 16. NaBt valığında RBP'lerin azalmasının zamana dayalı olduğunu gösteren GSE4410 analizi.

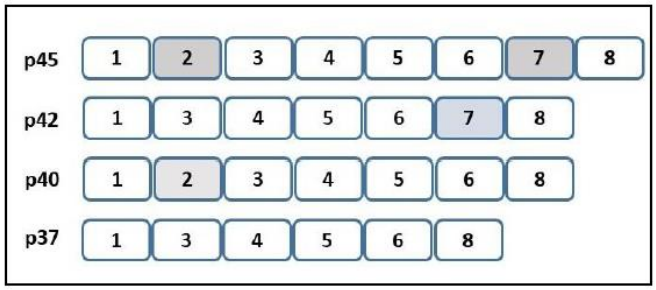
(A) Volkan grafikleri 6, 12 ve 24 sa NaBt muamelesi görmüş hücrelerde RBP'lerin (kırmızı noktalar) istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde (FDR<0.05) azalmasını göstermektedir. (B) Ven şemaları, artış

gösteren RBP'lere oranla (9 RBP), 6 saatlik muameleden başlayarak çok daha fazla RBP'nin azaldığını (26 RBP) göstermektedir. (C) STRING ağ analizi, azalan RBP'lerin (24 sa muamele ile) artan RBP'lere göre çok güçlü bir etkileşim ağı oluşturduğunu göstermektedir

4.6 NaBt ile muamele edilmiş Caco-2 ve HT-29 hücrelerinde RBP'lerin ifadesi

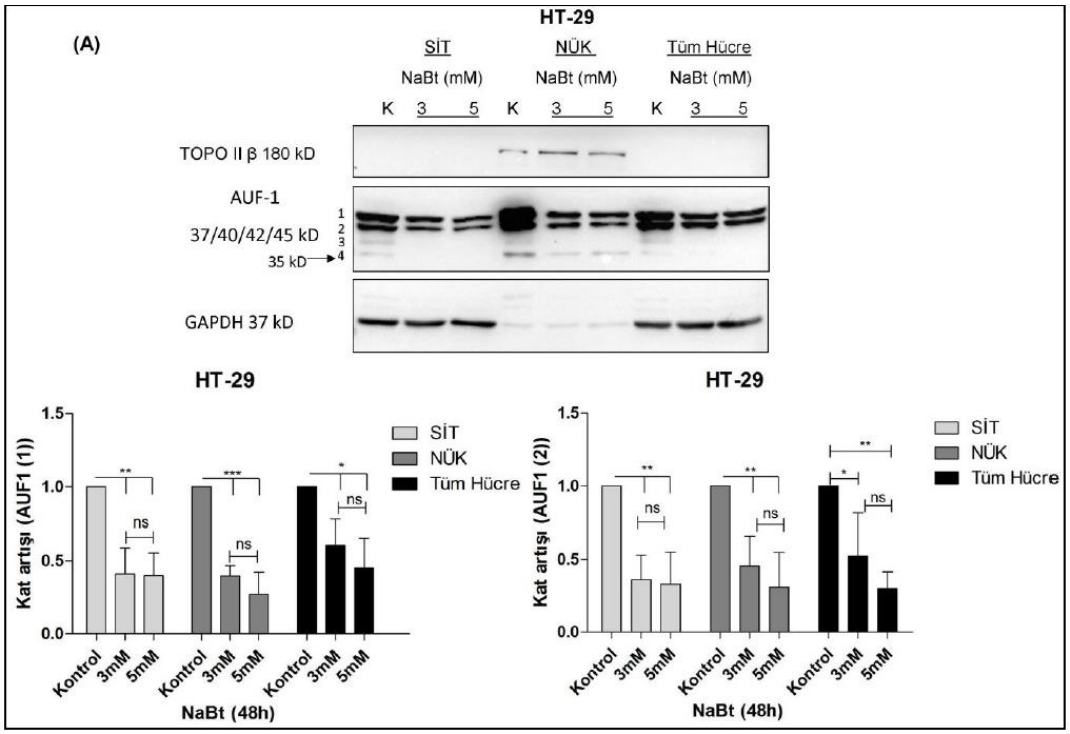
Akt. D varlığında, yani promotör etkisine bağlı yeni mRNA sentezi olmadığında, NaBt muamelesinin Caco-2 hücrelerinde COX-2 mRNA'sını stabilize ettiği, bu etkinin proteine de yansıdığı, HT-29 hücrelerinde ise NaBt'ın COX-2 mRNA kararlılığına dramatik bir etkisi olmadığı belirlendikten sonra, Caco-2 hücrelerinde görülen NaBt'a bağlı artan mRNA kararlığında 3'UTR'a bağlanan proteinlerin etkisi olup olmadığının araştırılması amacıyla, öncelikle aday protein ifade düzeyleri incelenmiştir. COX-2 3'UTR'ında birçok AU nükleotidlerince zengin diziler (AU zengini elementler veya AREs) bulunmaktadır. Bu dizilere bağlanan proteinler (ARE-binding protein-AREBP) mRNA kararlığını etkileyebilir; potansiyel olarak yeni sentezlenmiş RNA'ya bağlanabilir ve RNA'nın kararlılığını arttırarak yarı ömrü uzatabilir (HuR ve CUGBP2 gibi) ya da mRNA'nın hızlı bir şekilde yıkımına neden olabilir (AUF1 ve TTP gibi). Ayrıca mRNA'nın translasyonunu baskılayabilir (TIAR gibi) (Chen ve Shyu 1995). COX-2'nin ARE'ye bağlanan proteinler tarafından post-transkripsiyonel olarak düzenlendiği gösterilmiştir (Dixon vd., 2000). Bu verilerden yola çıkarak, COX-2 mRNA kararlılığında ve translasyonunda etkisi olan AUF-1, CUGBP-2, HuR ve TIAR'ın ifade düzeylerinin NaBt muamelesiyle nasıl değiştiğini araştırdık. AU zengin bölgelere bağlanan proteinler hem çekirdek hem de sitoplazmada bulunabilir, hücre altı konumları (çekirdek ya da sitoplazma) etki şekillerini ve hedef mRNA'larının hücre içi lokalizasyonlarını etkileyebilir (David vd., 2010). Bu nedenle, araştırdığımız her protein için ifade düzeyindeki değişim hem çekirdek hem de sitoplazmik fraksiyonlar için belirlenmiştir. Araştırılan proteinler arasında, AUF1 (ARE/ poly(U)-binding/ degradation factor 1) ve TTP (Tristetraprolin), hedef mRNA'larına bağlanarak mRNA yıkımını arttıran (de-stabilize edici) proteinlerdir. Ancak, AUF1'in uçbirleştirme (alternative splicing) ile oluşmuş, ARE içeren mRNA'ları stabilize veya de-stabilize eden dört varyantı vardır. Bunlardan p45 (45kD) 8 ekzona sahip olmakla birlikte, p42 varyantında ekzon 2, p40 varyantında ise ekzon 7 bulunmaz. p37'de ise hem ekzon 2 hem de ekzon 7 yoktur (**Şema 1**). Ekzon 2 ve ekzon 7'nin olması veya olmaması oldukça önemlidir, çünkü p37 ve p40'ta

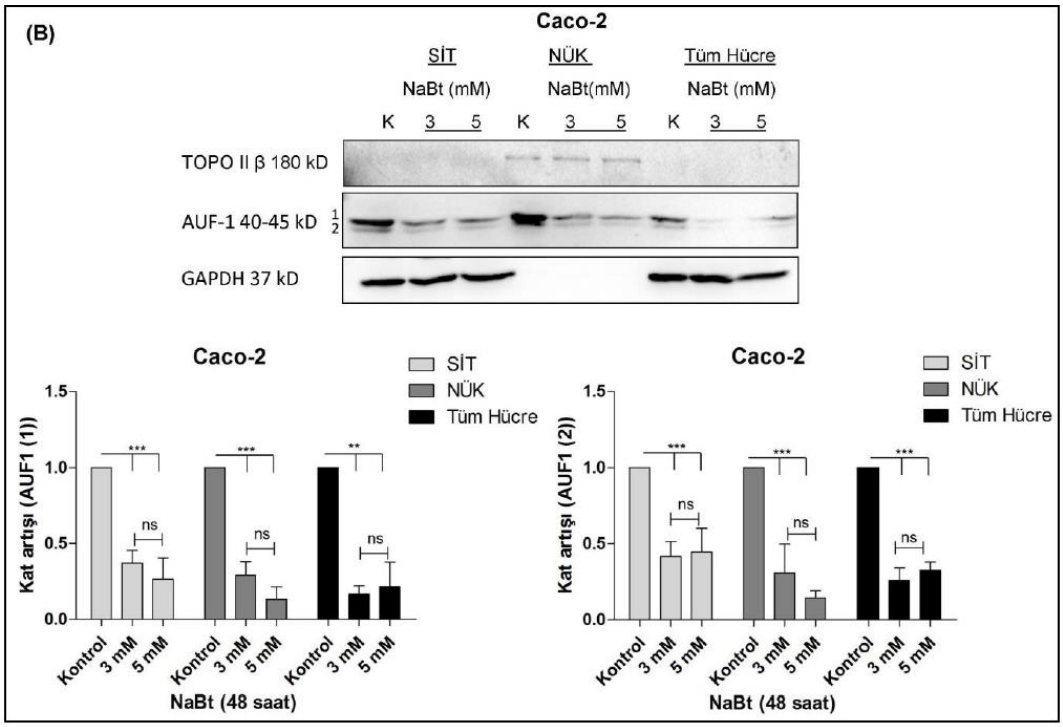
ekzon 7’nin olmaması bu izoformların ubikitinasyona uğramasına ve bu esnada bağlandıkları RNA ile birlikte degrade olmasına neden olmaktadır. Diğer yandan, p37 ve p42’de ekzon 2’nin bulunmaması, bu izoformların RNA’ya bağlanma eğilimini arttırır (Wagner vd., 1998).



Şema 1. AUF1'in uçbirleştirme (alternatif splicing) ile üreten dört varyantı.

Kullandığımız kanser hücre hatlarında TTP ifadesi oldukça düşük iken, AUF1 ifadesi oldukça yüksektir. Ek olarak, HT-29 ve Caco-2 hücrelerinde 48 saatlik NaBt muamelesi, hem sitoplazmada hem de çekirdekteki AUF1 protein seviyesini azaltmıştır (HT-29 hücrelerinde her iki fraksiyonda %70’e varan, Caco-2 hücrelerinde sitoplazmik fraksiyonda %65, çekirdek fraksiyonunda ise %85 azalma) (**Şekil 17**). **Şekil 17**’deki western blot deneyinde AUF1 izoformları, yüksek moleküler ağırlıktan başlayarak 1’den 4’e kadar numaralandırılarak gösterilmiştir: 1 numaralı bant en yüksek moleküler ağırlığa sahip olan izoformu, 4 numaralı bant ise en düşük moleküler ağırlığa sahip olan izoformu göstermektedir.



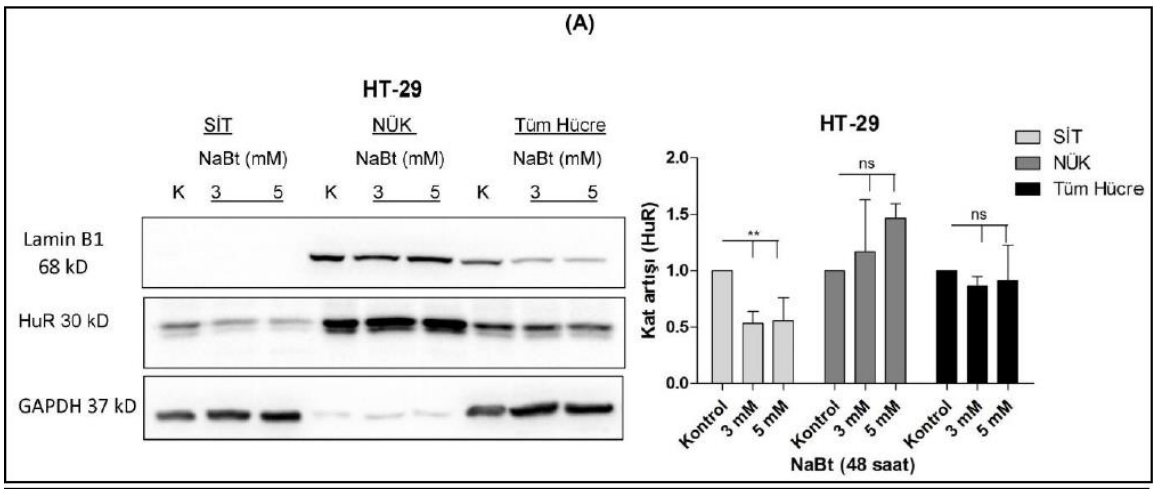


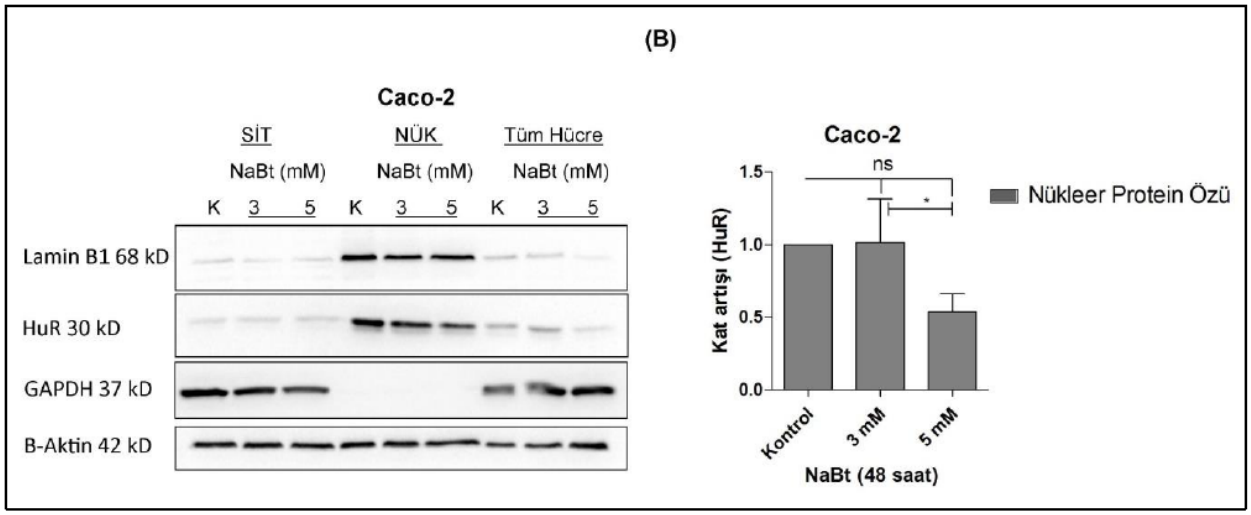
Şekil 17. HT-29 ve Caco-2 hücrelerinde NaBt muamelesinin AUF1 protein ifadesine etkisi.

(A) HT-29 ve (B) Caco-2 hücrelerinden 48 saat NaBt muamelesi ardından sitoplazmik/çekirdek (SİT/NÜK) proteinleri ve total protein (tüm hücre) izole edilmiştir. AUF1 ifadesindeki değişim, NaBt ile muamele edilen örneklerin muamele edilmemiş kontrol grubuna göre belirlenmiştir. TopoIIβ ve GAPDH sırasıyla nükleer ve

sitoplazmik yükleme kontrolü olarak kullanılmıştır. Şekildeki western blot deneyinde AUF1 izoform bantları, 1'den 4'e kadar numaralandırılarak gösterilmiştir. Bu numaralandırmada, 1 numaralı bant en yüksek moleküler ağırlığa sahip olan izoformu (p45), 4 numaralı bant ise en düşük moleküler ağırlığa sahip olan izoformu (p37) temsil etmektedir. NaBt muamelesi numaralandırılan AUF1 izoformlarının protein seviyelerini ciddi ölçüde azaltmıştır. Densitometrik analizlar sadece çok ifadelenen izoformlar için (p45 ve p42) yapılmıştır. Sonuçlar üç biyolojik replikenin ortalaması şeklinde olup kat değişimi ± SD şeklinde gösterilmiştir. Muamele edilmemiş kontrole göre istatistiksel anlamlılık Tukey's çoklu karşılaştırma testi ve one-way ANOVA ile belirlenmiştir.

HuR (Human antigen R) çalışmada ifadesi incelenen bir diğer AREBP'dir. HuR, mRNA'ya bağlandığında stabilize edici etki göstermekle birlikte translasyonu inhibe eder (Brennan ve Steitz, 2001). HuR'ın COX-2 3'UTR'ına bağlandığı bilinmektedir (Dixon vd., 2000). NaBt muamelesi HT-29 hücrelerinde sitoplazmik HuR miktarında %50 azalmaya neden olurken, total hücre proteiniyle gerçekleştirilen deneylerde, muamele edilmemiş hücrelerle kıyaslandığında protein seviyelerinde değişim gözlenmemiştir. Dolayısıyla, HT-29 hücrelerinde HuR'ın daha çok çekirdekte konumlandığı, NaBt muamelesi ile çekirdekteki HuR düzeyinde istatiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte artış trendi görüldüğü söylenebilir **(Şekil 18A)**. Caco-2 hücrelerinde ise 5 mM NaBt, çekirdekte lokalize olan HuR miktarında azalmaya neden olmuştur. Ek olarak, Caco-2 hücrelerinden toplanan total protein ve sitoplazmik fraksiyonda HuR miktarı göz ardı edilebilecek kadar az olmakla birlikte, protein çekirdekte toplanmıştır **(Şekil 18B**).

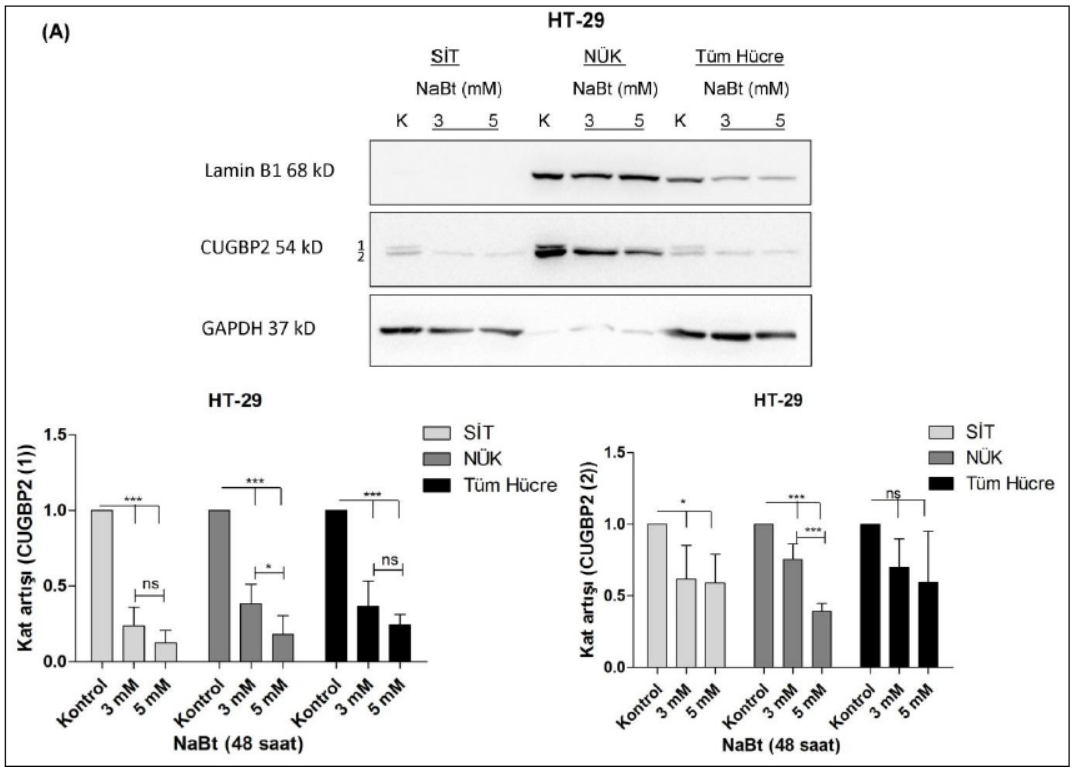


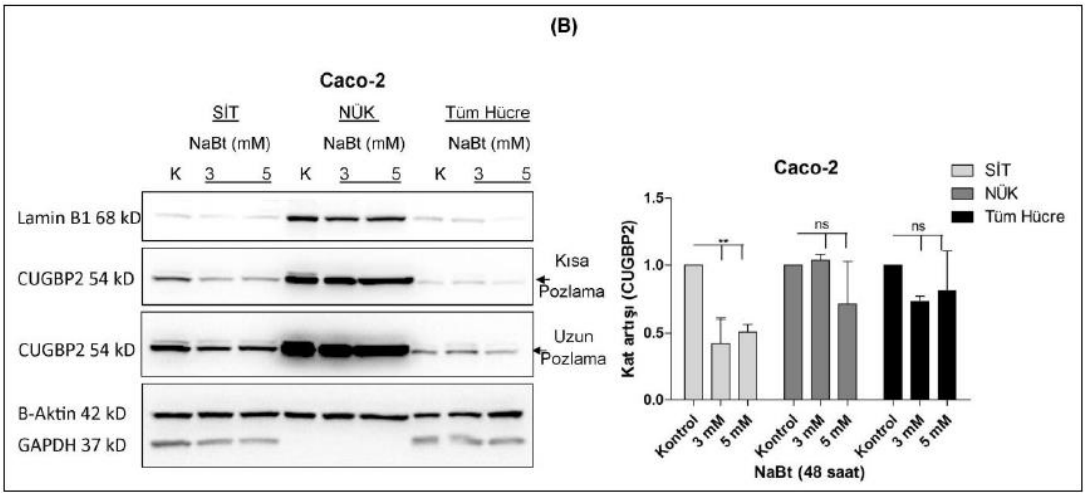


Şekil 18. HT-29 ve Caco-2 hücrelerinde NaBt muamelesinin HuR protein ifadesine etkisi.

(A) HT-29 ve (B) Caco-2 hücrelerinden 48 saat NaBt muamelesi ardından sitoplazmik/çekirdek (SİT/NÜK) proteinleri ve total protein (tüm hücre) izole edilmiştir. HuR ifade seviyelerinin analizi, NaBt ile muamele edilen örneklerin muamele edilmemiş kontrol grubuna göre kıyaslanmasıyla gerçekleştirilmiştir. Lamin B1 ve GAPDH sırasıyla nükleer ve sitoplazmik yükleme kontrolü olarak kullanılmıştır. NaBt muamelesi, HT-29 hücrelerinde sitoplazmik, Caco-2 hücrelerinde ise nükleer lizatlarda HuR protein seviyelerinin önemli ölçüde azalmaya neden olmuştur. Sonuçlar üç biyolojik replikenin ortalaması şeklinde olup kat değişimi± SD şeklinde gösterilmiştir. Muamele edilmemiş kontrole göre istatistiksel anlamlılık Tukey's çoklu karşılaştırma testi ve one-way ANOVA ile belirlenmiştir.

RNA'ya bağlanan bir diğer protein olan CUGP2'nin de NaBt ile nasıl değiştiği incelenmiştir. CUGBP2 western blot analizinde, iki bant halinde ve beklenilen moleküler ağırlıkta (52/54 kD) gözlenmiştir. CUGBP protein ailesi, yüksek homolojiye sahip 4 üyeden oluşmaktadır (Dasgupta ve Ladd 2012). Dolayısıyla, kullanılan antikorun CUGBP2 dışındaki diğer aile üyelerini tanıması olasıdır. Bununla birlikte bu bantlar proteinin post-translasyonel modifikasyonunu da gösteriyor olabilir. Üretici firmaya ait antikor bilgisinde bantlarla ilgili açıklama bulunmadığından, western blotta gözlenen her iki bant da densitometrik analize dahil edilmiştir. HT-29 hücreleri 48 saat NaBt ile muamele edildiklerinde, hem stoplazmik hem de çekirdek fraksiyonlarında CUGBP2 ifadesinin azaldığı görülmüştür. 54 kD CUGBP2 5 mM NaBt muamelesi ile yaklaşık %80 oranında azalmıştır **(Şekil 19A)**. NaBt ile muamele edilmiş Caco-2 hücrelerinde bu azalma daha düşük olmakla birlikte, sadece sitoplazmik fraksiyonda gözlenmiştir **(Şekil 19B)**.

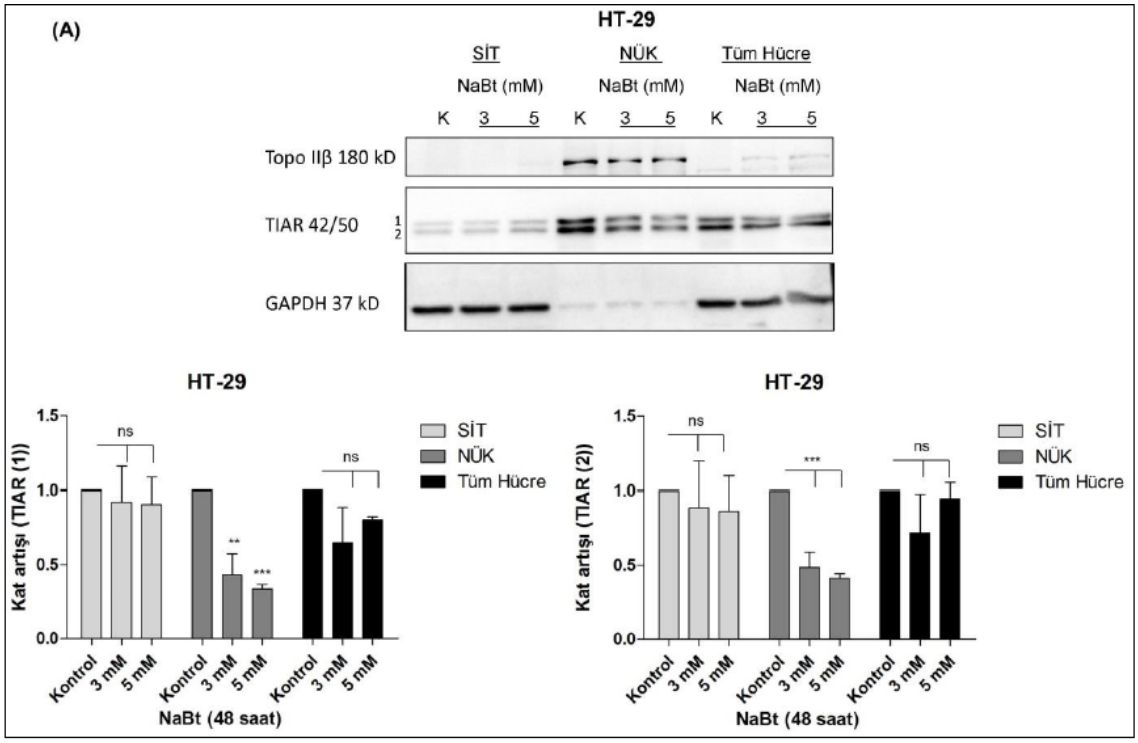


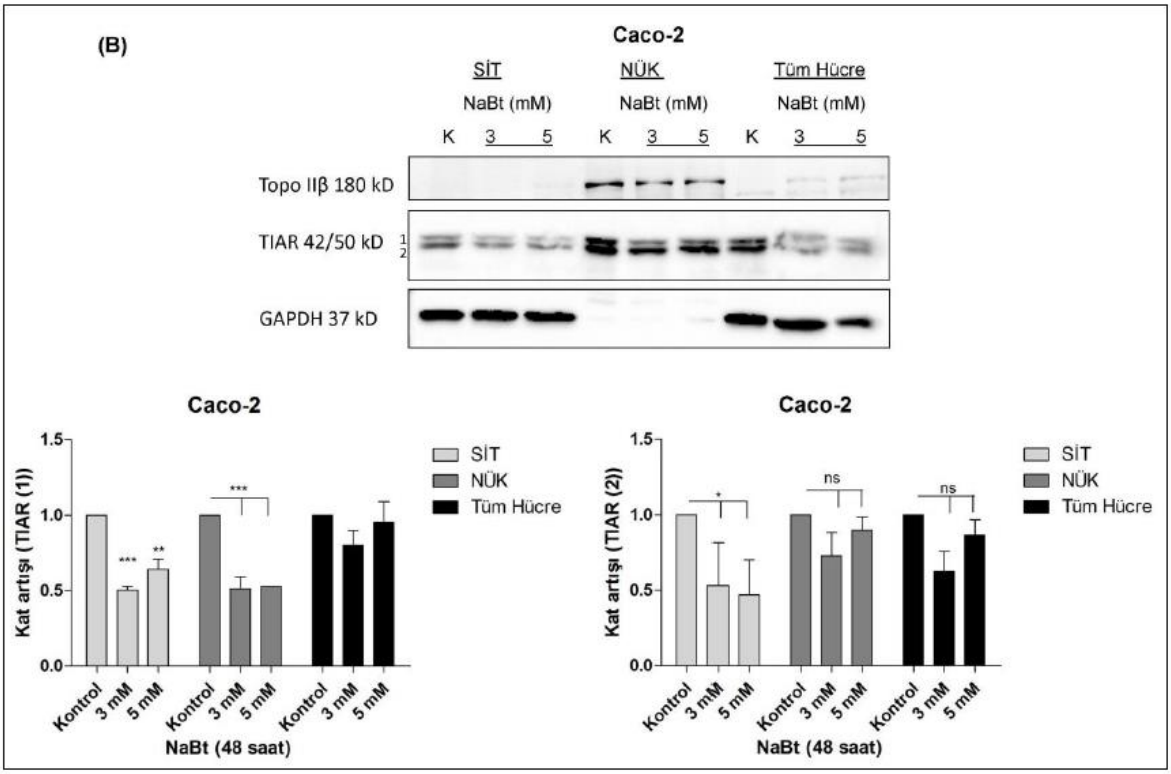


Şekil 19. HT-29 ve Caco-2 hücrelerinde NaBt muamelesinin CUGBP2 protein ifadesine olan etkisi.

(A) HT-29 ve (B) Caco-2 hücrelerinden 48 saat NaBt muamelesi ardından sitoplazmik/çekirdek (SİT/NÜK) proteinleri ve total protein (tüm hücre) izole edilmiştir. CUGBP2 ifade seviyelerinin analizi, NaBt ile muamele edilen örneklerin muamele edilmemiş kontrol grubuna göre kıyaslanmasıyla gerçekleştirilmiştir. Lamin B1 ve GAPDH sırasıyla nükleer ve sitoplazmik yükleme kontrolü olarak kullanılmıştır. NaBt muamelesi, CUGBP2 protein seviyelerinde büyük bir azalmaya neden olmuştur. Sonuçlar üç biyolojik replikenin ortalaması şeklinde olup kat değişimi± SD şeklinde gösterilmiştir. Muamele edilmemiş kontrole göre istatistiksel anlamlılık Tukey's çoklu karşılaştırma testi ve one-way ANOVA ile belirlenmiştir.

Bir başka AREBP olan TIAR, hedef mRNA'ya bağlanarak translasyonu inhibe eder (Gueydan vd., 1999). HT-29 hücrelerinde 48 saat NaBt muamelesi, çekirdek fraksiyonunda proteinin her iki izoformunda da (42/50 kD) önemli ölçüde azalmaya neden olmuştur. Sitoplazmik kısımda ise istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde değişim gözlenmemiştir **(Şekil 20A)**. Buna karşın, Caco-2 hücrelerinde 50 kD'luk izoformun NaBt muamelesiyle her iki hücre fraksiyonunda da yaklaşık %50 oranında azaldığı, 42kD'lik izoformun ise sadece sitoplazmik fraksiyonda azaldığı görülmüştür **(Şekil 20B)**.





Şekil 20. HT-29 ve Caco-2 hücrelerinde NaBt muamelesinin TIAR protein ifadesine olan etkisi.

(A) HT-29 ve (B) Caco-2 hücrelerinden 48 saat NaBt muamelesi ardından sitoplazmik/çekirdek (SİT/NÜK) proteinleri ve total protein (tüm hücre) izole edilmiştir. TIAR ifade seviyelerinin analizi yapılırken, NaBt ile muamele edilen örnekler muamele edilmemiş kontrol grubuna göre kıyaslanmıştır. TopoIIβ ve GAPDH sırasıyla nükleer ve sitoplazmik yükleme kontrolü olarak kullanılmıştır. Her iki hücre hattında da TIAR'ın nükleer seviyeleri 48 saatlik NaBt muamelesi ile önemli ölçüde azalmıştır. Üretici firmaya ait antikor bilgisinde TIAR proteini 2 bant olarak gösterilmiş olduğundan (1 ve 2 olarak etiketlenmiştir), her iki bant da densitometrik analize katılmıştır. Sonuçlar üç biyolojik replikenin ortalaması şeklinde olup kat değişimi± SD şeklinde gösterilmiştir. Muamele edilmemiş kontrole göre istatistiksel anlamlılık, Tukey's çoklu karşılaştırma testi ve one-way ANOVA ile belirlenmiştir.

4.7 RBP'lerin sitoplazmaya yer değiştirmesinde rol alan sinyal yolağının açıklanması

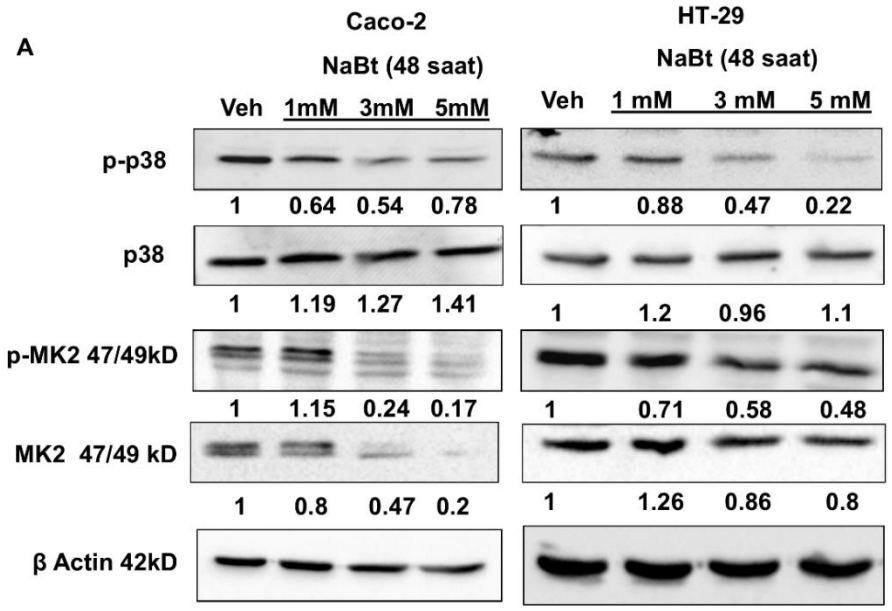
Bu projede ayrıca gerek *in silico* analizler gerekse laboratuvar çalışmalarımızda bir kısım RBP'nin NaBt varlığında hem ifadelerindeki hem de sitoplazma-çekirdek arasındaki yer değiştirmelerine dayanarak sinyal ileti yollarınını etkileyip etkilemediğini incelenmiştir. Bu amaçla, HuR aşağıda belirtilen nedenlerden dolayı aday olarak seçilmiştir:

1. HuR'un çekirdekten sitoplazmaya yer değiştirmesindeki sinyal mekanizmaları iyi tanımlanmıştır (Kim vd., 2010; Kim vd., 2008; Kim ve Gorospe 2008).

2. NaBt ile muamele edilmiş HT-29 hücrelerinde HuR'ın çekirdekteki protein seviyesinin artmasına bağlı olarak sitoplazmik yer değiştirmesinde azalış (istatistiksel olarak anlamlı olmamasına rağmen) görülmüştür (**Şekil 18**).

3. NanoLuc raportör geninin arkasına HuR'ın bağlandığı bir sekansı klonlayınca, NaBt ile muamele edilen hücrelerde, Nanoluc raportör vektörünün ifadesinde büyük bir azalma görülmüştür (**Şekil 14**).

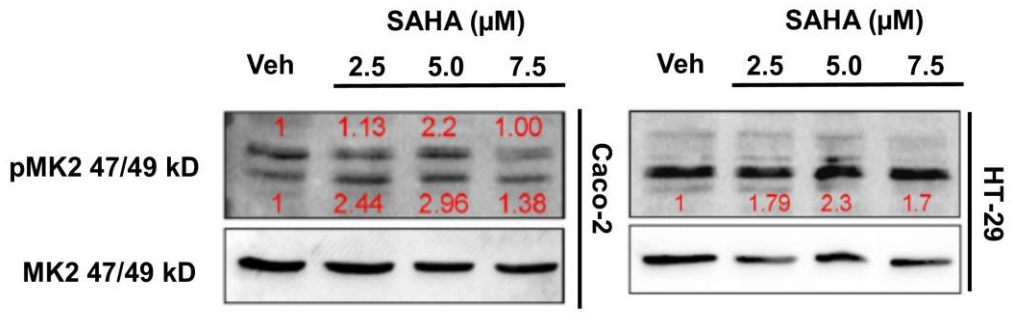
HuR'ın sitoplazmik yer değiştirmesinin, COX-2 and TNFα gibi birçok inflamatuar mRNA'nın stabilizasyonunda rol aynayan p38-MAP Kinaz-MAPKAP2(MK2) sinyal aksisi fosforlanması tarafından düzenlendiği gösterilmiştir (Gurgis vd., 2014). Caco-2 ve HT-29 hücrelerinin her ikisinde de, 48 sa, 1, 3 ve 5 mM NaBt muamelesi ile toplam (fosforlanmış ve fosforlanmamış) p38 protein seviyelerini değiştirmezken, fosforlanmış p38'de azalma görülmüştür (**Şekil 21**). NaBt ile muamele görmüş Caco-2 hücrelerinde hem toplam hem de fosforlanmış MK2 seviyelerinde azalma söz konusu iken, HT-29 hücrelerinde fosforlanmış MK2 seviyeleri azalmış, toplam MK2 ise değişmemiştir. Bu durum, p38-MK2 sinyal aksisinin aktivasyonundaki azalmanın HuR'nin sitoplazmik yer değiştirmesindeki azalmaya katkı sağladığını göstermektedir.



Şekil 21. NaBt ile 48 sa. muamele edilen Caco-2 ve HT-29 hücrelerinde p38 ve MK2 sinyal aksisinin fosforlanması.

Hücreler, farklı NaBt konsantrasyonlarıyla 48 sa. muamele edilmiş ve ardından Western Blot için total hücre lizatı toplanmıştır. Densitometrik analiz, vehikül ile muamele edilmiş hücrelere göre yapılmış ve yükleme kontrolüne (β-aktin) göre normalize edilmiştir.

İlginç olarak, başka bir HDAC inhibitörü olan salisilhidroksamik asit (SAHA) ile muamele edilen hücrelerde, MK2 fosforlanmasında, düşük dozlarda hafif bir artma ve yüksek dozda azalma (Caco-2) gözlenmiş veya hiçbir değişim gözlenmemiştir (HT-29) (**Şekil 22**). Bu durum, NaBt'ın bu sinyal ağındaki etkisinin, HDACi özelliğine bağlı olmadığını göstermektedir.

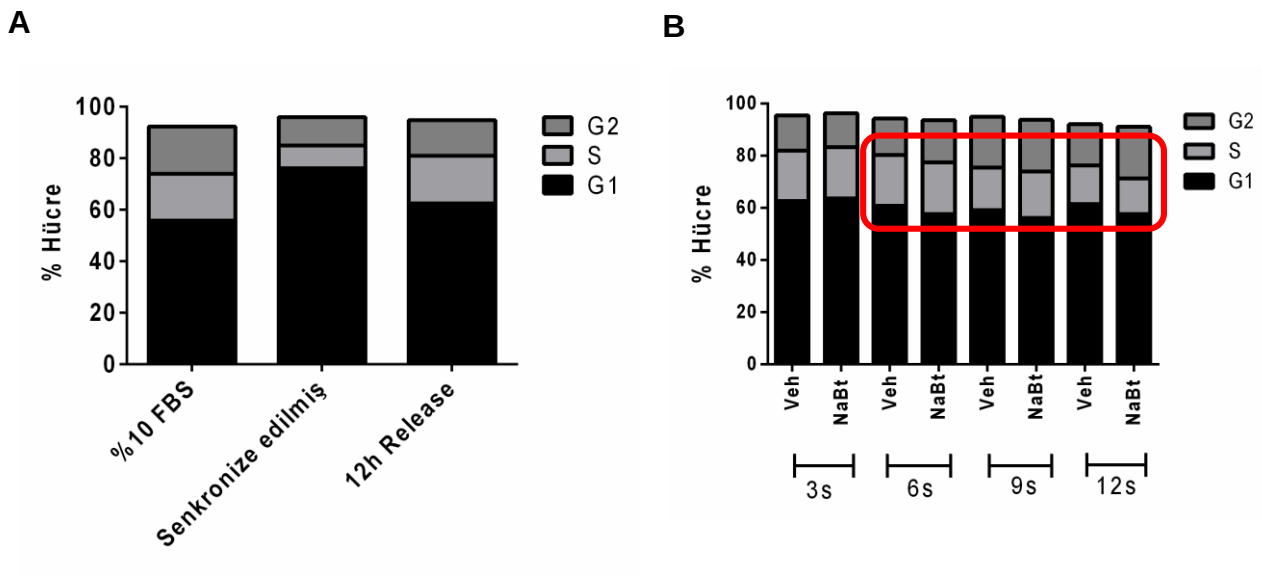


Şekil 22. SAHA ile 24 sa. muamele edilen Caco-2 ve HT-29 hücrelerinde MK2 fosforlanması.

Caco-2 ve HT-29 hücreleri 0 - 7.5μM SAHA ile muamele edilmiş ve total hücre lizatı Western Blot için toplanmıştır. Densitometrik analiz toplam MK2 protein ifadesine göre uygulanmıştır.

HuR'un hedef mRNA'larına bağlanması, stres bağlantılı kinaz Chk2 tarafından HuR'un belli hedef amino asitlerinden; S88, S100 ve T118 fosforlanması ile de düzenlenebilmektedir (Doller vd., 2008; Kim ve Gorospe 2008). HuR'un Chk2 tarafından fosforlanmasının, HuR'un SIRT1 3'UTR'ına bağlanmasını azaltarak SIRT1 mRNA bozunmasında artışa yol açtığı gösterilmiştir (Abdelmohsen vd., 2007). Hücrelerin NaBt ile muamelesinin Chk2 fosforlanmasına neden olup olmadığının araştırılması için western blot deneylerine ek olarak hücre döngüsü analizleri yapılmış (**Şekil 23**); NaBt muamelesinin hücre döngüsü arreste sebep olma durumunu incelenmiştir. Bu deney için HT-29 hücrelerini seçilmiştir çünkü bu hücrelerde NaBt muamelesi ile HuR ifadesindeki değişimden ziyade HuR'ın hücrenin sitoplazma-çekirdek fraksiyonlarındaki düzeyinin etkilenmesi söz konusudur (**Şekil 18A**). HT-29 hücrelerinin senkronizasyon için gece boyu aç bırakılması beklenildiği gibi G1/S arrestini belirtecek şekilde G1 hücrelerinin oranında artışa neden olmuştur; arrest edilmiş hücreler 12 sa. boyunca serum içeren besi yerinde büyümeye bırakılınca (release), hücrelerin tekrar hücre döngüsüne girdiği ve aç bırakma

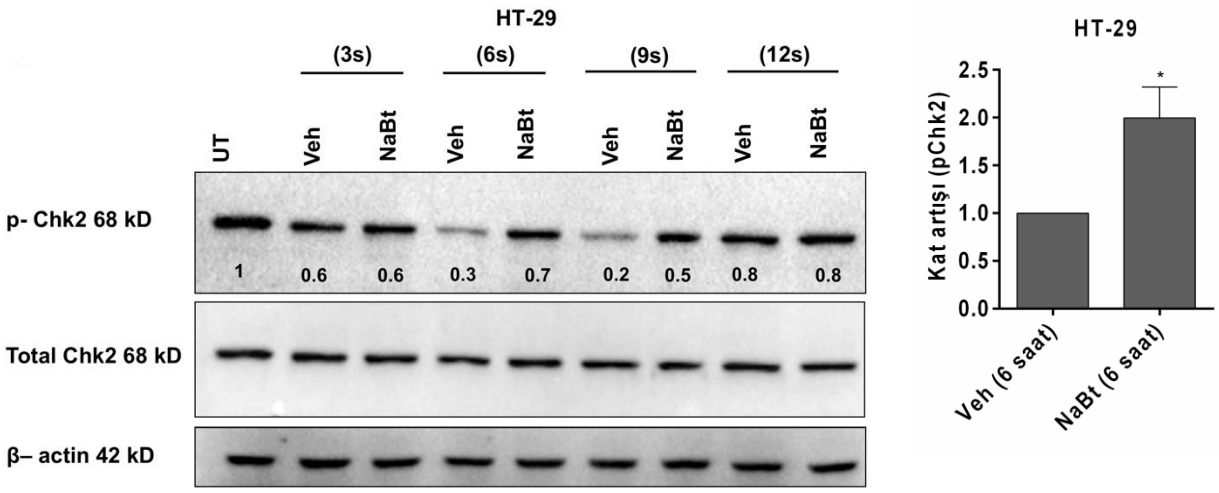
modelinin senkronizasyon için uygun olduğunu gösterecek şekilde G1 fazı hücrelerinde azalma olduğu görülmüştür (**Şekil 23A**). 5 mM NaBt ile 3,6,9 ve 12 sa. boyunca muamele edilen senkronize hücrelerin S/G2 fazda toplamasına görülmüştür (**Şekil 23B**).



Şekil 23. NaBt ile muammele edilmiş HT-29 hücrelerinde senkronizasyon için gece boyu aç bırakma sonrası hücre döngüsü profili.

(A): HT-29 hücreleri serum içermeyen besi yerinde 18 sa. büyütüldükten sonra %10 FBS içeren besi yerinde serbest bırakılmışlardır. Çoğu hücrenin G1/S'de senkronize olduğunu gösterecek şekilde G1 fazındaki (G1 arrestteki) hücrelerin yüzdesinde artış gözlenmiştir. (B) Senkronize edilmiş HT-29 hücrelerinin 3, 6, 9 ve 12 sa. NaBt ile muamele edilmesi, 6-12 sa. muamele sonrası bu hücrelerin S/G2 fazında artışı göstermektedir (kırmızı kutu).

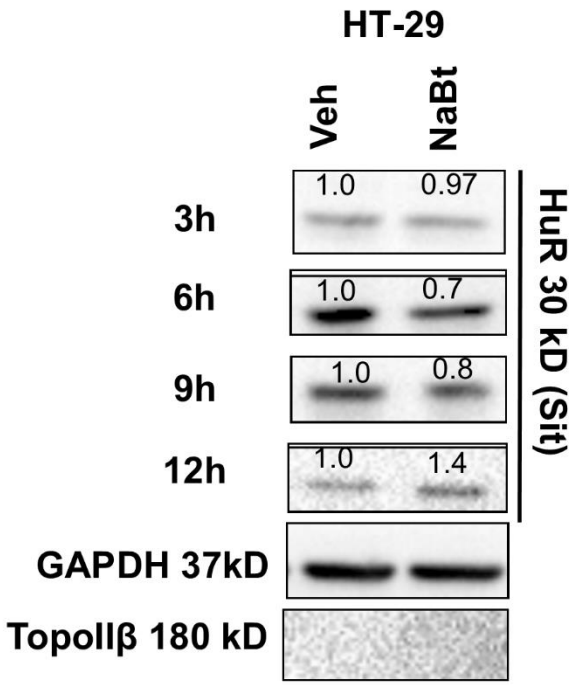
Hücre döngüsü kontrol noktası proteini Chk2'nin DNA'ya hasar veren maddeler varlığında S/G2'de hücre döngüsü arrestini başlattığı bilinmektedir (Kim vd., 2010). S/G2 arresti ile orantılı şekilde, NaBt ile muamele edilmiş senkronize HT-29 hücrelerde 3-12 sa. muamele sonrası Chk2'nun fosforlanmasında belirgin bir artış gözlenmiştir (**Şekil 24**).



Şekil 24. 3,6,9 ve 12 sa. NaBt ile muamele edilen senkronize HT-29 hücrelerinde Chk2 fosforlanmasındaki artış.

HT-29 hücreleri gece boyu aç bırakıldıktan sonra %10 serum içeren besi yerinde 12 sa. boyunca serbest bırakılmışlardır (UT). Hücreler daha sonra ya vehikül ile ya da NaBt ile 3-12 sa. muamele edilmişlerdir. Proteinler toplanıp, Chk2 fosforlanması için tahlil edilmişlerdir. Densitometrik analizler kontrole (muamele görmemiş hücrelere) göre yapılmış ve yükleme kontrolü β-actin'e göre normalize edilmiştir. Sağ taraftaki Şekil 6 sa. NaBt muamelesi görmüş HT-29 hücrelerinde Chk2 fosforlanmasındaki istatistiksel anlamlılık artışını göstermektedir. İstatistiksel anlamlılık t testi uygulanarak belirlenmiştir (*$p<0.05$).

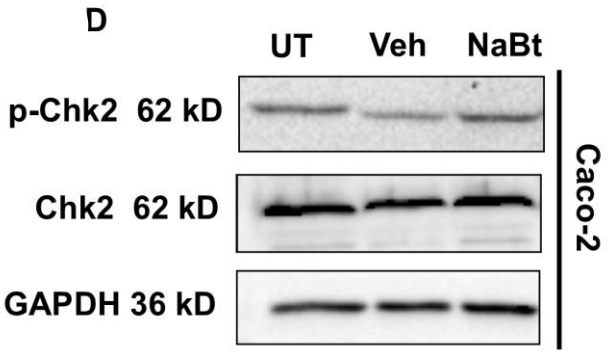
NaBt muamesinin gerek pChk2 gerekse hücre döngüsünü en dramatik şekilde etkilediği 6-9 saatlik sürede, HuR sitoplazmik seviyesinde de çok güçlü (%30) bir azalma gözlenmiştir.



Şekil 25. 3-12 sa. NaBt ile muamele edilmiş senkronize HT-29 hücrelerinde HuR'ın sitoplazmik seviyesi.

HT-29 hücreleri gece boyu aç bırakıldıktan sonra %10 serum içeren besi yerinde 12 sa. boyunca serbest bırakılmışlardır. Hücreler daha sonra ya vehikül ya da NaBt ile 3-12 sa. muamele edilmişlerdir. Sitoplazmik proteinler (Sit) toplanmış ve HuR Western Blot ile tahlil edilmiştir. Densitometrik analizler kontrole göre yapılmış ve yükleme kontrolü GAPDH'e göre normalize edilmiştir. Nükleer protein kontaminasyonun olmadığı TOPOIIβ kpontrolü ile gösterilmiştir.

Caco-2 hücrelerinde Chk2 fosforlanmasında bir değişiklik gözlenmemesi (**Şekil 26**) bu hücrelerde p38/MK2 aksisinin HuR yer değştirmesinin düzenlenmesinde daha aktif olabileceğini işaret etmektedir. Alternatif olarak, Caco-2 ve HT-29 hücrelerinin hücre döngüsü birbirinden farklı olabilir ve bu yüzden, hücre döngüsüne bağlı Chk2 fosforlanması için zaman diliminin ve HuR'nin sitoplazmik yer değiştirmesindeki değişimlerin farklı zaman noktalarında gerçekleşme olasılığı vardır.



Şekil 26. 6 sa. NaBt ile muamele edilmiş senkronize Caco-2 hücrelerinde Chk2 fosforlanması.

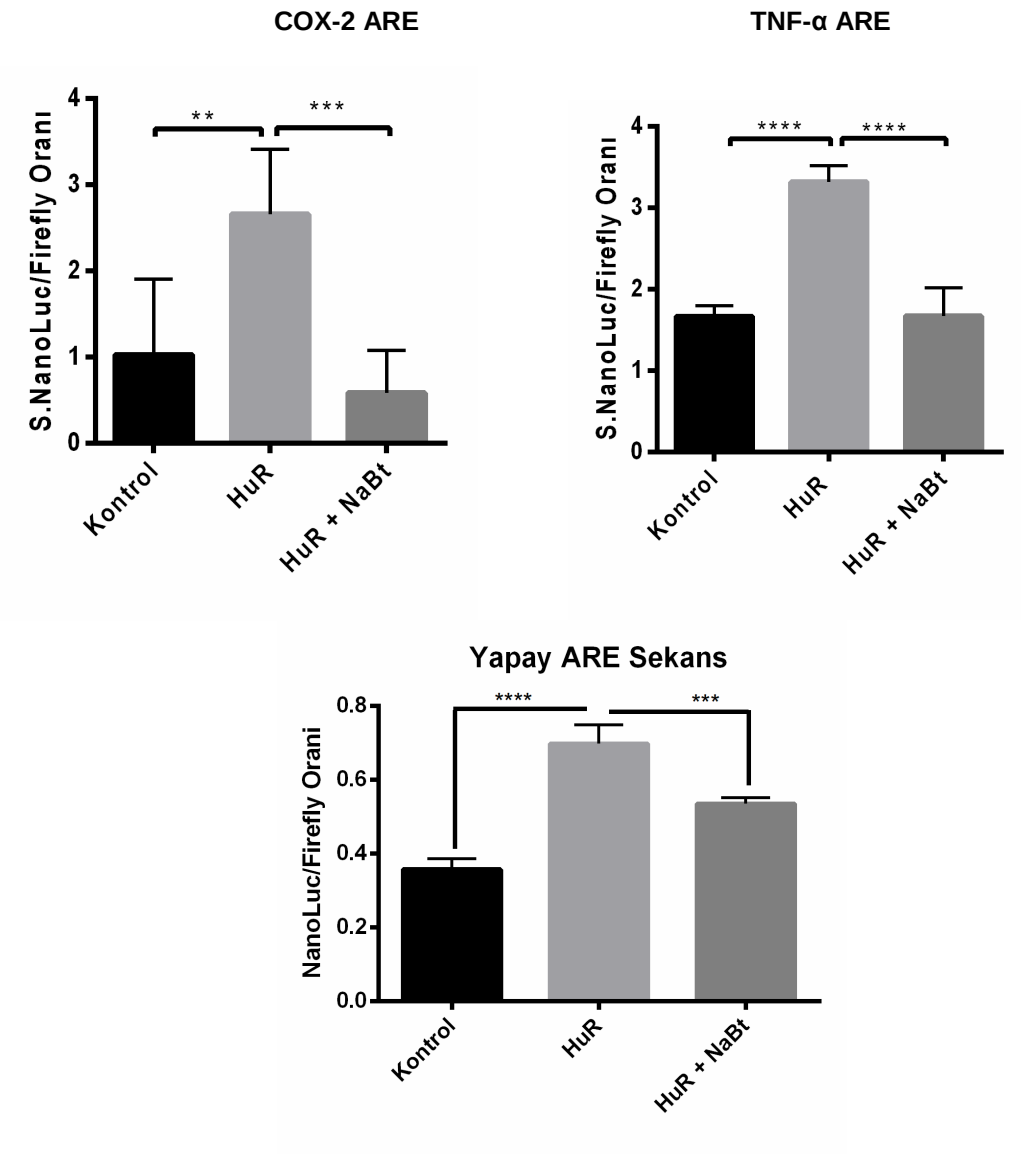
Caco-2 hücreleri gece boyu serumdan mahrum bırakılmış ve daha sonra 12 sa. boyunca %20 serum içeren besi yerinde serbest bırakılmıştır (UT). Hücreler ya vehikül ya da NaBt ile 6 sa. muamele edilmişlerdir. Sitoplazmik proteinler toplanmış ve Western Blot ile Chk2 fosforlanması tahlil edilmiştir. Densitometrik analizler kontrole göre yapılmış ve yükleme kontrolü GAPDH'ye göre normalize edilmiştir.

4.8 HuR'un kendi bağlanma sekanslarına bağlanmasında ve aktivitesinde NaBt'ın etkisi

NaBt varlığında HuR'nin sitoplazmik yer değiştirmesindeki azalmanın 3'UTR aktivitesinde etkisi olup olmadığını incelenmiştir. Bu amaçla, HuR cDNA'sı RPS30M promotörünü içeren GWIZ ifade vektörüne klonlanmıştır (Detaylar için lütfen Rapor 3'e bakınız). HuR'ın Caco-2 hücrelerinde aşırı ifadesi sağlanmış ve NaBt'ın HuR aktivitesindeki etkisi aşağıdaki vektörler kullanılarak incelenmiştir:

1. COX-2 3'UTR'nin ARE zengin bölgesi (ilk 170 baz çifti)
2. İfadesi RBP'ler tarafından 3'UTR aracılığı ile post-transkripsiyonel olarak düzenlendiği bilinen başka bir inflamatuvar gen olan TNFα'nın 3'UTR bölgesi
3. Sadece RBP'nin bağlanabildiği yapay bir ARE sekansı

Her bir vektör için, Nanoluc raportör sinyalindeki artışa bakarak, HuR aşırı ifadelenmesinin RNA sekansında kararlılığa sebep olduğu görülmüştür (**Şekil 27**). Hücreler 48 sa. NaBt ile muamele edilince, raportör aktivitede anlamlı bir azalma söz konusu olup (**Şekil 27**), bu durum HuR aşırı ifadelenmesinde bile, bu proteinin raportör vektördeki bağlanma sekansına bağlanmasının engellendiğini göstermektedir (**Şekil 27**).

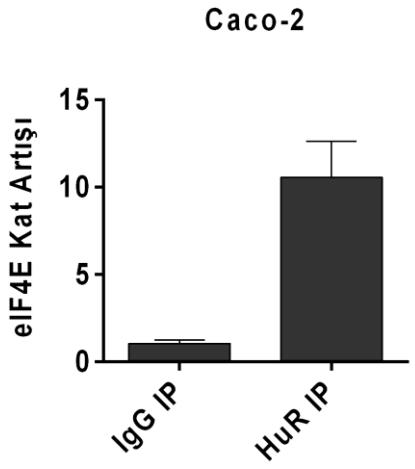


Şekil 27. Farklı Nanoluc raportör yapılarının 3'UTR aktivitesinde, HuR aşırı ifadelenmesiyle birlikte NaBt'ın etkisi.

Caco-2 hücreleri, COX-2 ve TNFα 3'UTR'de var olan ARE sekanslar veya yapay ARE sekans içeren Nanoluc vektörleri ile birlikte normalizasyon için bir firefly vektörü, 80 ng boş vektör (Kontrol) veya 80ng HuR aşırı ifade vektörü ile 6 sa. transfekte edilmiştir. Hücreler yıkanıp, 48 sa. boyunca NaBt ile muamele edilmiş (HuR + NaBt) ve sonrasında lusiferaz deneyi için kullanılmıştır. Nanoluc okuması Firefly okumasına göre normalize edilmiştir.

4.9 NaBt varlığında HuR'ın ARE sekanslarınabağlanmasının RNA immün çöktürme ile incelenmesi

NaBt varlığında HuR'un hedef ARE sekanslarına bağlanmasındaki azalışı daha iyi incelemek için, RNA immün çöktürme (RIP) deneyi yapılmıştır. Amaç, HuR'ın hedef 3'UTR sekanslarına bağlanması incelenmesidir. Öncelikle, HuR'ın güçlü bir şekilde bağlandığı bilinen eIF4E mRNA'sının 3'UTR'sine HuR bağlanması araştırılmıştır (Topisirovic vd., 2009). İzotip kontrol IgG'ye göre HuR'ın eIF4E mRNA'sının 3'UTR'sine istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde bağlandığını görülmüştür (**Şekil 28**). Bu sonuç kullanılan antikorun RNA bağlı HuR'a başarılı şekilde bağlanıp çöktürüldüğünü göstermektedir.

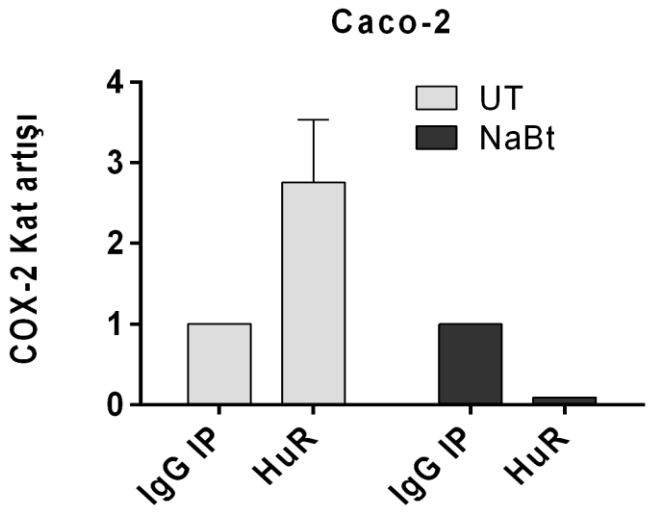


Şekil 28. HuR'un eIF4E 3'UTR'ına bağlanmasının RNA immün çöktürme ile belirlenmesi.

HuR'un eIF4E 3'UTR'ına bağlanması Caco-2 hücrelerinde incelenmiştir. HuR antikoru ile izotipe özgü IgG antikoruna göre önemli ölçüde daha fazla 3'UTR sekansı çöktürülmüştür.

Daha sonra HuR'nin COX-2 3'UTR'sine bağlanıp bağlanmadığını araştırılmıştır. İzotipe özgü IgG bağlanmasına göre HuR'nin COX-2 3'UTR'sine bağlanmasının yaklaşık 3 kat daha fazla olduğunu görülmüştür (**Şekil 29**). NaBt varlığında, bu bağlanma neredeyse sıfıra düşerken izotipe özgü IgG bağlanması değişmemiştir. HuR'nin IgG'ye göre COX-2 3'UTR'ye üç kat daha fazla bağlanmasının nedenini daha iyi açıklayabilmek için insan transkriptomundaki HuR bağlanma sekanslarını tanımlayan halka açık foto aktive edilebilen ribonukleosit çapraz bağlama ve immün çöktürme (Photoactivatable

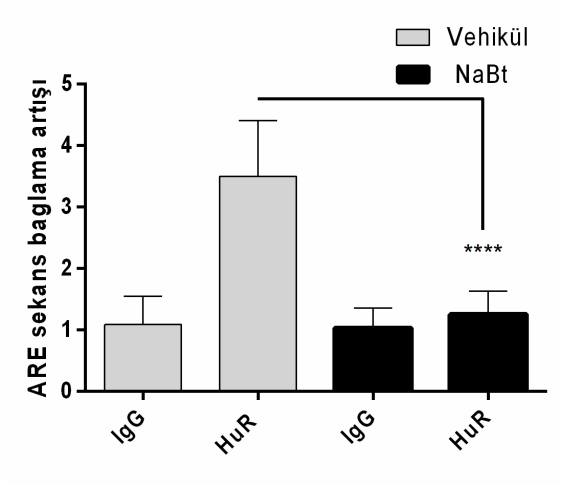
ribonucleoside enhanced cross-linking and immunoprecipitation: PAR-CLIP) verilerini (GSE29780) inceledik (Mukherjee vd., 2011). Araştırma, HuR'ın 3'UTR'larına bağlandığı mRNA'lar ile sınırlanmıştır. Analiz sonuçları COX-2 3'UTR'sine HuR'un bağlanmasının IgG kontrole göre önemli ölçüde artmadığını göstermiştir. Bu, COX-2 3'UTR'sinde gözlediğimiz önemli ölçüde olmamakla birlikte artışın nedeni olabilir. Yine de, NaBt varlığında bağlanmada önemli ölçüde azalma gözlenebilir.



Şekil 29. NaBt varlığında COX-2 3'UTR'sine HuR bağlanmasında azalmanın RNA immün çöktürme ile gösterilmesi.

Caco-2 hücreleri NaBt ile 48 sa. muamele edilmiş ve HuR antikoru veya kontrol olarak izotipe özgü IgG antikoru kullanılarak RIP deneyi yapılmıştır.

ARE sekanslarına HuR bağlanmasını daha iyi gösterebilmek için, HCT-116 kolon kanseri hücrelerini HuR bağlanma sekansı içeren GWIZ RPS30M raportör vektörü ile 6 sa. transfekte edilmiş, takiben 48 sa. boyunca NaBt ile muamele yapılmıştır. Bu deneyde HCT-116 hücreleri daha kolay transfekte edildikleri ve dolayısıyla endojen HuR proteinin bağlanması için raportör vektördeki ARE sekansını çokça sağlayabildikleri için kullanılmıştır. RIP deney sonuçları HuR ARE sekansına HuR bağlanmasının NaBt muamelesi ile önemli ölçüde azaldığını göstermektedir **(Şekil 30)**.



Şekil 30. Bir HuR bağlanan ARE sekansına, NaBt varlığında HuR bağlanmasındaki azalmanın RNA immün çöktürme ile gösterilmesi.

HCT116 hücreleri HuR bağlanan sekansın klonlandığı GWIZ RPS30M raportör vektörü ile 6sa. transfekte edilmiş ve ardından NaBt ile 48 sa. muamele edilmiştir. Hücreler toplanmış ve HuR antikoru veya kontrol olarak izotipe özgü IgG antikoru kullanılarak RIP yapılmıştır. İstatiksel farklılıklar one way ANOVA ve Tukey çoklu karşılaştırma testi ile analiz edilmiştir (****$p<0.0001$).

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Sodyum bütirat (NaBt), bağırsak florası tarafından üretilen ve kolon epitel hücreleri tarafından temel besin kaynağı olarak kullanılan kısa zincirli bir yağ asitidir. NaBt'ın histon deasetilasyonunu inhibe etme (HDACi etkisi), hücresel farklılaşmayı hızlandırma ve inflamasyonu baskılama gibi çeşitli mekanizmalarda görev aldığı bilinmektedir (Davie, 2003; Yin vd., 2001). Bu projede NaBt'ın, AU nükleotidlerince zengin bölgelere (AU-rich element-ARE) bağlanan proteinlerin (AREBPs) aktivitesini değiştirerek ve/veya bu proteinlerin mRNA'ların 3'UTR bağlanma dinamiklerini etkileyerek inflamasyon ile ilişkili mRNA'ların kararlılığını düzenleyebileceği hipotezi araştırılmıştır.

Proje önerisinde sunulmuş olan öncül çalışmalarda, iki farklı kolon kanseri hücre hattı olan Caco-2 ve HT-29'da NaBt muamelesinin, pro-inflamatuar bir protein olan COX-2'nin mRNA ifadesinde birbirinden farklı etkilere neden olduğu görülmüştü. NaBt ile muamele edilen Caco-2 hücrelerinde COX-2 mRNA ifadesinde artış, HT-29 hücre hattında ise azalma söz konusuydu. Tekrar edilen deneyler ise, NaBt ile muamele edilmiş olan HT-29 hücrelerinde COX-2 ifadesindeki azalmayı doğrularken, Caco-2 hücrelerinde COX-2 ifadesindeki azalma, sadece 48 saatlik inkübasyon sonunda değil, 6, 12 ve 24 saat'lik muamelelerde de gözlenmiştir **(Şekil 2).** NaBt ile muamele edilen Caco-2 hücrelerinde COX-2'nin enzimatik aktivitesinde ve protein ifadesinde düşüş de gözlenmiştir (**Şekil 4 ve 5**). Bu veriler **iş paketi 3**'ün başarılı bir şekilde tamamlandığını da göstermektedir. Caco-2, ileri düzeyde heterojen bir hücre hattı olup (Walter ve Kissel, 1995) kontakt inhibisyona bağlı farklılaşma özelliğine sahiptir. Caco-2 hücre hattı kullanılarak yapılan hücre kültüründe, hücreler bireysel ve dağınık yerleşimli büyüme yerine, koloniler oluşturarak büyümektedir. Plaka içerisindeki hücre konfluensi oranının 60-70% olarak korunduğu durumlarda dahi, hücreler kontakt inhibisyona bağlı olarak hızlıca kendiliğinden farklılaşmaya gidebilir; böylelikle farklılaşmış ve farklılaşmamış hücrelerden oluşan, birbirinden ayrı karaktere sahip karma populasyonlar oluşabilir. Buna karşılık, HT-29 hücreleri hücre kültüründe ayrı ayrı büyür, ayrıca enterositlere farklılaşabilmek için glikozdan yoksun besi yerine ihtiyaç duyarlar (Rognoni vd., 1998). Bu verilere dayanarak, Caco-2 hücrelerindeki COX-2 mRNA kararlılığının hücre kültürü koşullarına bağlı olduğunu ve bu koşulların mRNA kararlılığında artma ya da azalmaya neden olabilecek

proteinlerin COX-2 mRNA'sının 3'UTR bölgesi ile olan dinamik ilişkilerini etkileyebileceği savını öne sürmekteyiz.

Bahsedilen hücre kültürü koşullarının COX-2 mRNA üzerindeki etkisinin anlaşılması amacıyla spontan farklılaşma modeli kullanılmıştır. Bu modelde Caco-2 hücreleri 100% hücre konfluensiye ulaşmalarının ardından 10-20 gün süresince kültürde tutulur. Yaptığımız çalışmalar spontan farklılaşan Caco-2 hücrelerinde COX-2 ifadesinin mRNA ve protein düzeylerinde tamamen kaybolacak düzeyde azaldığını **(Bkz. Rapor 1, Şekil 14)** ve araşidonik asitin COX-2 tarafından oksijenizasyonunun enzimatik bir ürünü olan PGE_2'deki azalışın da COX-2 ifadesindeki azalmayla uyumlu olduğu görülmüştür **(Bkz. Rapor 1, Şekil 15)**. Bununla birlikte, farklılaşmış ve farklılaşmamış Caco-2 hücreleri arasında COX-2 3'UTR aktivitesi açısından bir fark görülmemiştir **(Bkz. Rapor 1, Şekil 18)**. Bu yeni veri, kendiliğinden farklılaşmış Caco-2 hücrelerindeki COX-2 düzenlemesinin transkripsiyonel seviyede olduğunu göstermektedir. Ayrıca bu sonuç, kendiliğinden farklılaşmış Caco-2 hücrelerinde, COX-2 ifadesini arttıran bir transkripsiyon faktörü olarak NF-κB aktivitesinin, farklılaşmamış hücrelere göre anlamlı düzeyde azaldığını gösteren bir diğer çalışmamızı da doğrular niteliktedir (Astarci vd., 2012). Bütün bu veriler dikkate alındığında, NaBt ile muamele edilmiş Caco-2 hücrelerindeki COX-2 mRNA ifadesindeki değişkenliğin, bu hücrelerin heterojen yapısından kaynaklandığı söylenebilir.

NaBt bir pan HDAC inhibitörüdür (Tong vd., 2004). COX-2 mRNA ifadesinin NaBt'ın HDACi etkisi ile bağlantılı olup olmadığını anlamak için, Caco-2 ve HT-29 hücreleri diğer bir pan HDACi olan SAHA (Marks, 2007) ile muamele edilmiş ve mRNA kararlılığının düzenlenmesi sırasında birçok AREBP'lerin aktivasyonu için gerekli olan sinyal mekanizması, sıklıkla p38 MAP Kinaz proteininin fosforile olarak aktifleşmesini takiben, alt yolakta bulunan MK2 proteininin aktivasyonu ile başlamaktadır (Bachelor vd., 2002; Han vd., 1996; Ming vd., 2001; Raingeaud vd., 1996). NaBt ile muamele edilen Caco-2 ve HT-29 hücrelerinde MK2 fosforilasyonunda anlamlı bir azalma gözlenirken **(Şekil 22)**, SAHA ile muamele edilen Caco-2 ve HT-29 hücrelerinde MK2 aktivasyonunda önemli bir değişim görülmemiştir. Bu veri, COX-2 mRNA kararlılığında rol oynayan sinyal mekanizmasının NaBt'a özgü olduğunun önemli bir göstergesidir. Bu sonuç, COX-2

mRNA kararlılığını belirleyen mekanizmanın NaBt'ın HDACi aktivitesinden büyük oranda bağımsız olabileceğini öne sürmesi anlamında bir ilktir; fakat, yakın zamanda yapılan bir çalışma translasyonel inhibitör TIA1'nın dovnregülasyonu yoluyla SAHA varlığında, normal akciğer fibroblastlarında TGF-β aracılı COX-2 ifade azalmasının kurtarılabildiğini göstermiştir (Pasini vd., 2018). Ama TIA-1'in dovnregülasyonuna sebep olan sinyal mekanizması bu çalışmada incelenmemiştir. Bu veri, NaBt'ın COX-2 mRNA ifadesi üzerindeki etkisinin HDACi aracılı farklılaşmadan bağımsız olabileceğini düşündürmüştür ve proje önerisinde belirtilen **iş paketi 1 ve 2**'nin başarılı bir şekilde tamamlandığını göstermektedir.

Çalışmada, NaBt'nin COX-2 ifadesindeki rolünün hücresel farklılaşmadaki etkisinden veya histon deasetilazları inhibe etmesinden bağımsız olduğunu gösterildikten sonra, NaBt'nin COX-2 transkripsiyonunu etkileyip etkilemediğini belirlenmiştir. Birçok çalışma, bütiratın NF-κB'yi inhibe ederek anti-inflamatuar aktivitesi olduğunu göstermesine rağmen, bütirata bağlı MAP Kinaz yolağının aktivasyonunun bildirildiği çalışmalar da mevcuttur (Gill vd., 2018). Bununla birlikte, bütirat ile muamele edilmiş kolon epitel hücrelerinde IL-8,IL-17,IL-1b,IL-6,IL12 ve TNF-α gibi birçok sitokinin ifadesinde azalma da raporlanmıştır (Kim vd., 2013; Segain vd., 2000). Her ne kadar bu çalışmada NF-κB transkripsiyonel aktivitesinde veya bütirat ile muamele edilmiş Caco-2 hücrelerinde çekirdeğe yer değiştirmede belirgin bir değişiklik görülmemiş olsa da, olası birçok başka transkripsiyon faktörü ya da düzenleyicisi, bütirat ile muamele edilmiş Caco-2 ve HT-29 hücrelerinde azalan COX-2 ifadesinden sorumlu olabilir (Hashemi Goradel vd., 2019)

Daha önce COX-2 ve TNFα 3'UTR'lerinin bütirat ile muamele edilmiş hücrelerde sırasıyla TTP (ZPF36) ve TIS11B (ZPF36L1) mRNA destabilize eden proteinlerinin ifade ve aktivitesindeki artıştan dolayı destabilize olduğu gösterilmiştir (Sobolewski vd., 2015; Fukae vd., 2005). Bu çalışmada bütirat varlığında çoğu RBP'nin ifadesinin azaldığı hem in silico analizlerle hem de deneylerle gösterilmesine rağmen (Bkz. Bölüm 4.5), bütirat ile muamele edilen kolon epitel hücrelerinde çok erken zamanlarda TTP (Zpf36) ifadesinin arttığı gözlenmiştir (**Şekil 15**). Bu, kolon epitel hücrelerinde COX-2'nin bütirat tarafından

hem transkripsiyonel hem de post transkripsiyonel düzeyde düzenlenebileceğini düşündürmüştür.

NaBt varlığında mRNA'ların post-transkripsiyonel düzenlenmesi, COX-2 3'UTR'sinin RBP bağlanan bölgesinin yanı sıra, çeşitli RBP'lerin bağlandığı yapay ARE sekansı ve sadece HuR'un bağlanabildiği yapay ARE sekansının kullanıldığı deneyler ve NaBt varlığında azalan lusiferaz sinyalinin söz konusu olduğu lusiferaz raportör deneyleri ile kanıtlanmıştır. Ek olarak, NaBt ile muamele edilen Caco-2 ve HT-29 hücrelerinde AUF1, CUGBP2, TIA, TIAR ve HuR gibi RBP'lerden birçoğunun sitoplazmaya yer değiştirmesi ve ifadesinde azalma olduğunu göstermektedir. NaBt ile muamele edilmiş, fare kolon epitel hücrelerinde çeşitli RBP'lerin ifadesi için halka açık mikrodizi verileri için (GSE4410, (Tabuchi vd., 2006)) bilgisayar ortamında yaptığımız analiz de deney sonuçlarını destekler niteliktedir: çoğu RBP'nin ifadesinde (TTP'nin, Zpf36, de dahil olduğu bir kaç RBP dışında NaBt ile muamele sonucu azalma belirlenmiştir. Bu deneyler **iş paketi 5**'in başarılı bir şekilde tamamlandığını göstermektedir.

NaBt ile muamele edilen hücrelerde COX-2 ifadesi azaldığı için, stabilize edici bir RBP olan HuR'nin sitoplazmik yer değiştirmesindeki ve/veya aktivasyonundaki azalmanın COX-2 mRNA'sının aşırı bozunmasına katkıda bulunduğunu varsayılmıştır. HuR'nin sitoplazmik yer değiştirmesi genel olarak başlıca iki yolak yoluyla sıkı şekilde düzenlenir:

1. Stres bağlantılı kinaz p38 ve onun alt yolağındaki protein MK2'nin fosforlanması inflamatuar mRNA'ların kararlılığını arttırabilmektedir (Winzen vd., 1999). Ayrıca, p38 MAP Kinaz aktivasyonunun HuR'nin T118'den fosforlanmasına ve sitoplazmik yer değiştirmesine neden olduğu tespit edilmiştir (Abdelmohsen ve Gorospe 2010). Sonuçlarımız, hem Caco-2 hem de HT-29 hücrelerinde, p38 ve alt yolağındaki aktivatör MK2'nin fosforlanmasının bütirat ile muamele edilmiş hücrelerde azaldığını göstermektedir. Bu deneyler ile **iş paketi 4** başarılı bir şekilde tamamlanmıştır.

2. G2/M fazı HuR'nin sitoplazmik seviyesinin en yüksek olduğu hücre döngüsü fazıdır; bu durum, HuR'nin hücre döngüsünün G2/M fazında ifadelenen genlerin mRNA kararlılığını

potensiyel olarak düzenleyebileceğine işaret etmektedir (Kim ve Gorospe 2008). HuR'nin S242'den fosforlanmasının HuR'nin çekirdekte tutulmasını arttırmaktadır ve bu fosforlanmanın stres bağlantılı kinaz Chk2 tarafından yapıldığı gösterilmiştir (Abdelmohsen vd., 2007). Bütirat varlığında, senkronize HT-29 hücrelerinin S/G2'de hücre döngüsü arestine maruz kaldığını (**Şekil 23**) ve bunun Chk2 fosforlanmasında belirgin bir artışla takip edilerek HuR'un sitoplazmik seviyesinde azalmayı bereberinde getirdiğini gözlenmiştir (**Şekil 25**). İlginç olarak, Caco-2 hücrelerinde Chk2 fosforlanmasında bir artış gözlemememiz bu hücrelerde yolağın bu kısmının aktif olmamasını belirtmektedir.

Bütirat varlığında COX-2 kararlılığının düzenlenmesinde HuR'un rolünü daha iyi açıklayabilmek için Caco-2 hücrelerinde HuR'nin aşırı ifadesi gerçekleştirilmiştir. Proje önerisinde belirttiğimiz RBP susturma deneylerinin aksine (**iş paketi 4**), HT-29 hücrelerinde HuR'un sitoplazmik seviyelerinde azalma gözlediğimiz için HuR'un aşırı ifadelenmesi deneyleri yapılmıştır. Bütirat ile muamele edilen Caco-2 hücrelerinde HuR'nin sitoplazmik düzeyinde azalma gözlenmemesine rağmen, diğer birçok deney bu hücre hattında HuR aktivitesinin baskılandığını göstermektedir. Bu sebeple, aşırı ifadeleme deneylerine bütirata düşük seviyede yanıt veren RPS30M promotörünün bulunduğu vektör sistemini kullanarak devam edilmiştir. HuR aşırı ifadelendiği halde, bütiratın 3'UTR aktivitesinde baskılayıcı işlevinin korunduğunu gözlenmiştir. Ek olarak, RNA immün çöktürme yaparak, Caco-2 hücrelerinde COX-2 3'UTR'sine bağlanan ve HCT116 hücrelerinde transfekte edilen yapay ARE taşıyan vektörün ARE bölgesine bağlanan HuR'da 48 sa NaBt muamele sonrası azalma görülmüştür (**Şekil 29 ve Şekil 30**). Bu deneyler **iş paketi 6**'nın başarılı şekilde tamamlandığını göstermektedir. Özetlenecek olursa deney sonuçlarımız, NaBt muamelesinin HuR'ın sitoplazmik seviyesinde azalmaya bağlı olarak COX-2 mRNA kararlılığında azalmaya neden olduğunu göstermiştir.

İnflamasyon konak organizmaları enfeksiyon ve diğer hasarlardan korumak içi gereklidir. Kendi-düzenleme (self-regulation) anti-inflamatuar sitokinlerin salgılanması, pro-inflamatuar sinyal yolaklarının engellenmesi, inflamatuar aracıların reseptörlerinin

uzaklaştırılması ve düzenleyici hücrelerin aktivasyonu gibi birçok süreci kapsamaktadır (Bach vd., 2018). Kendi-düzenleme dışında, inflamasyonun önlenmesinde kendi kısıtlama ve hızlı çözüm gibi mekanizmalar da yer almaktadır (Bach vd., 2018). Bol lif içeren diyet ile beslenen hayvanlarla yapılan iki çalışma, bağırsaklarda bütirat üretiminde artışı ve gaytada yüksek bütirat seviyelerini göstermiştir. Her iki çalışmada da inflamatuar sinyallerde azalma gösterilmiştir (Hijová vd., 2013; Rodríguez-Cabezas vd., 2018). Yüksek lif içeren diyet yoluyla takviye olarak bütirat alınmasının faydalarının bağırsak dokularında sistemik dolaşıma göre daha belirgin olduğunu belirtilmektedir. Bu da bütiratın bağırsak epiteli için tedavisel faydalarını göstermektedir. Verilerimiz, bütiratın NF-κB aktivitesini ve pro-inflamatuar sitokinlerin transkripsiyonunu azaltması olmak üzere iyi bilinen etkilerine ek olarak, RNA'ya bağlanan proteinlerin ifadesini ve hücre içi lokalizasyonunu etkilediğini göstermekte olup; bütirat bu yolla inflamatuar mRNA'ların kararlılığını post-transkripsiyonel seviyede düzenleyebilmektedir.

6. KAYNAKÇA

Abbeele, P., Belzer C., Goossens, M., Kleerebezem, M., De Vos, W., Thas, O., De Weirdt, R., Kerckhof, F.; Wiele, T. 2013. “Butyrate-Producing Clostridium Cluster XIVa Species Specifically Colonize Mucins in an in Vitro Gut Model”, The ISME Journal, 7, 949–61.

Abdelmohsen, K., Pullmann, R., Lal, A., Ho Kim, H., Galban, S., Yang, X., Blethrow, J. 2007. “Phosphorylation of HuR by Chk2 Regulates SIRT1 Expression”, Molecular Cell, 25, 543-557.

Abdelmohsen, K., Gorospe, M. 2010. “Posttranscriptional Regulation of Cancer Traits by HuR”, Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA, 1, 214-229.

Astarci, E., Sade, A., Çimen, İ., Savaş, B., Banerjee, S. 2012. “The NF-KB Target Genes ICAM-1 and VCAM-1 Are Differentially Regulated during Spontaneous Differentiation of Caco-2 Cells”, The FEBS Journal, 279, 2966–86.

Bach Knudsen, K. E., Lærke, H. N., Hedemann, M. S., Nielsen, T. S., Ingerslev, A. K., Søvsø, D., Nielsen, G., Theil, PK., Purup, S., Hald, S., Schioldan, A. G., Marco, M.L., Gregersen, S., Hermansen, K. 2018. “Impact of Diet-Modulated Butyrate Production on Intestinal Barrier Function and Inflammation”, Nutrients, 10, E1499.

Bachelor, M. A., Silvers, A., Bowden, G.T. 2002. “The Role of P38 in UVA-Induced Cyclooxygenase-2 Expression in the Human Keratinocyte Cell Line, HaCaT”, Oncogene, 21, 7092–99.

Bakheet, T. 2001. “ARED: Human AU-Rich Element-Containing MRNA Database Reveals an Unexpectedly Diverse Functional Repertoire of Encoded Proteins”, Nucleic Acids Research, 29, 246–54.

Brennan, C.M., Steitz, J.A. 2001. “HuR and mRNA stability”, Cellular & Molecular Life Science, 58, 266-77.

Bryan, N., Ahswin, H., Smart, N., Bayon, Y., Wohlert, S., Hunt, J.A. 2012. “Reactive Oxygen Species (ROS)--a Family of Fate Deciding Molecules Pivotal in Constructive Inflammation and Wound Healing”, European Cells & Materials, 24, 249–65.

Chen, C. Y. A., Shyu, A. B. 1995. “AU-Rich Elements: Characterization and Importance in MRNA Degradation”, Trends in Biochemical Sciences, 20, 465-470.

Cok, S. J., Acton, S. J., Morrison, A. R. 2003. “The Proximal Region of the 3′-Untranslated Region of Cyclooxygenase-2 Is Recognized by a Multimeric Protein Complex Containing HuR, TIA-1, TIAR, and the Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein U”, The Journal of Biological Chemistry, 278, 36157–62.

Cook, K. B., Kazan, H., Zuberi, K., Morris, Q., Hughes, T. R. 2011. “RBPDB: A Database of RNA-Binding Specificities”, Nucleic Acids Research, 39, 301-308.

Dasgupta, T., Ladd, A. N. 2012. “The Importance of CELF Control: Molecular and Biological Roles of the CUG-BP, Elav-like Family of RNA-Binding Proteins”, Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA, 3, 104-121.

David, G.P.S., Taylor, M.A., Port, J.D. 2010 “Intracellular localization and interaction of mRNA binding proteins as detected by FRET”, BMC Cell Biology 11, 69.

Davie, J. R. 2003. “Inhibition of Histone Deacetylase Activity by Butyrate”, The Journal of Nutrition, 133 (7 Suppl), 2485S-2493S.

Dixon, D. A., Kaplan, C. D., McIntyre, T. M., Zimmerman, G. A.; Prescott, S. M. 2000. “Post-Transcriptional Control of Cyclooxygenase-2 Gene Expression. The Role of the 3’-Untranslated Region”, The Journal of Biological Chemistry, 275, 11750–11757.

Doller, A., Pfeilschifter, J., Eberhardt, W. 2008. “Signalling Pathways Regulating Nucleo-Cytoplasmic Shuttling of the mRNA-Binding Protein HuR”, Cellular Signalling, 20, 2165-2173.

Eberhart, C. E., Coffey, R. J., Radhika, A., Giardiello, F. M., Ferrenbach, S., DuBois, R. N. 1994. “Up-Regulation of Cyclooxygenase 2 Gene Expression in Human Colorectal Adenomas and Adenocarcinomas”, Gastroenterology, 107, 1183–88.

Eisenberg, E., Levanon E. Y. 2013. “Human Housekeeping Genes, Revisited”, Trends in Genetics, 29, 569-574.

Fukae, J., Amasaki, Y., Yamashita, Y., Bohgaki, T., Yasuda, S., Jodo, S., Atsumi, T., Koike, T. 2005. “Butyrate Suppresses Tumor Necrosis Factor α Production by Regulating Specific Messenger RNA Degradation Mediated through a Cis-Acting AU-Rich Element”, Arthritis and Rheumatism, 52, 2697–2707.

Gill, P. A., van Zelm, M. C., Muir, J. G., Gibson, P. R. 2018. “Short Chain Fatty Acids as Potential Therapeutic Agents in Human Gastrointestinal and Inflammatory

Disorders", Alimentary Pharmacology and Therapeutics, 48, 15-34.

Greenhough, A., Smartt, H. J., Moore, A. E., Roberts, H. R., Williams, A. C., Paraskeva, C., Kaidi, A. 2009. "The COX-2/PGE2 Pathway: Key Roles in the Hallmarks of Cancer and Adaptation to the Tumour Microenvironment", Carcinogenesis, 30, 377-386.

Grivennikov, S. I., Greten, F. R., Karin, M. 2010. "Immunity, Inflammation, and Cancer", Cell, 140, 883–899.

Gueydan, C., Droogmans, L., Chalon, P., Huez, G., Caput, D., Kruys, V. 1999. "Identification of TIAR as a Protein Binding to the Translational Regulatory AU-Rich Element of Tumor Necrosis Factor α mRNA", The Journal of Biological Chemistry, 274, 2322-2326.

Gurgis, F. M. S., Yeung, Y. T., Tang, M. X. M., Heng, B., Buckland, M., Ammit, A. J., Haapasalo, J., Haapasalo, H., Guillemin, G. J., Grewal, T., Munoz, L. 2014. "The P38-MK2-HuR Pathway Potentiates EGFRvIII–IL-1β-Driven IL-6 Secretion in Glioblastoma Cells", Oncogene, 34, 2934-2942.

Hagland, H. R., Søreide, K. 2015. "Cellular Metabolism in Colorectal Carcinogenesis: Influence of Lifestyle, Gut Microbiome and Metabolic Pathways", Cancer Letters, 356, 273–280.

Hamer, H. M., Jonkers, D., Venema, K., Vanhoutvin, S., Troost, F. J., Brummer, R. J. 2008. "The Role of Butyrate on Colonic Function", Alimentary Pharmacology & Therapeutics, 27, 104–119.

Han, J., Lee, J. D., Jiang, Y., Li, Z., Feng, L., Ulevitch, R. J. 1996. "Characterization of the Structure and Function of a Novel MAP Kinase Kinase (MKK6)", The Journal of Biological Chemistry, 271, 2886–2891.

Harper, K. A., Tyson-Capper, A. J. 2008. "Complexity of COX - 2 Gene Regulation", Biochemical Society Transactions, 36, 543–545.

Hashemi Goradel, N., Najafi, M., Salehi, E., Farhood, B., Mortezaee, K. 2019. "Cyclooxygenase-2 in Cancer: A Review", Journal of Cellular Physiology, 234, 5683–5699.

Helfer, S., Schott, J., Stoecklin, G., Förstemann, K. 2012. "AU-Rich Element-Mediated MRNA Decay Can Occur Independently of the miRNA Machinery in Mouse

Embryonic Fibroblasts and Drosophila S2-Cells", PLoS One, 7, e28907.

Hijová, E., Szabadosova, V., Štofilová, J., Hrčková, G. 2013. "Chemopreventive and Metabolic Effects of Inulin on Colon Cancer Development", Journal of Veterinary Science, 14, 387-393.

Hitti, E., Al- Yahya, S., Al- Saif, M., Mohideen, P., Mahmoud L., Polya, S.J., Khabar, K. S. 2010. "A Versatile Ribosomal Protein Promoter-Based Reporter System for Selective Assessment of RNA Stability and Post-Transcriptional Control", RNA, 16, 1245- 1255.

Huang, N., Katz, J. P., Martin, D. R., Wu, G. D. 1997. "Inhibition of IL-8 Gene Expression in Caco-2 Cells by Compounds Which Induce Histone Hyperacetylation", Cytokine, 9, 27–36.

Jensen, L. J., Kuhn, M., Stark, M., Chaffron, S., Creevey, C., Muller, J., Doerks, T., Julien, P., Roth, A., Simonovic, M., Bork, P., von Mering, C. 2009. "STRING 8 - A Global View on Proteins and Their Functional Interactions in 630 Organisms", Nucleic Acids Research, (Database issue) 37, D412-6.

Kafasla, P., Skliris, A., Kontoyiannis, D. L. 2014. "Post-Transcriptional Coordination of Immunological Responses by RNA-Binding Proteins", Nature Immunology, 15, 492-502.

Khabar, K. S. 2010. "Post-Transcriptional Control during Chronic Inflammation and Cancer: A Focus on AU-Rich Elements", Cellular and Molecular Life Sciences, 67, 2937- 2955.

Kim, H. H., Abdelmohsen, K., Lal, A., Pullmann, R., Yang, X., Galban, S., Srikantan, S., Martindale, J. L., Blethrow, J., Shokat, K. M., Gorospe M. 2008. "Nuclear HuR Accumulation through Phosphorylation by Cdk1", Genes and Development, 22, 1804–15.

Kim, H.H., Abdelmohsen, K., Gorospe, M. 2010. "Regulation of HuR by DNA Damage Response Kinases", Journal of Nucleic Acids, 981487.

Kim, H.H., Gorospe, M. 2008. "Phosphorylated HuR Shuttles in Cycles", Cell Cycle, 20 (7), 3124- 3126

Kim, M. H., Seung, G. K., Jeong, H. P., Yanagisawa, M., Kim, C. H. 2013. "Short-Chain Fatty Acids Activate GPR41 and GPR43 on Intestinal Epithelial Cells to Promote

Inflammatory Responses in Mice", Gastroenterology, 145, 396-406.

Lebedeva, S., Jens, M., Theil, K., Schwanhäusser, B., Selbach, M., Landthaler, M., Rajewsky, N. 2011. "Transcriptome-Wide Analysis of Regulatory Interactions of the RNA-Binding Protein HuR", Molecular Cell, 43, 340-352.

Marks, PA. 2007. "Discovery and Development of SAHA as an Anticancer Agent", Oncogene, 26, 1351–56.

Masuda, K., Kuwano, Y., Nishida, K., Rokutan, R. 2012. "General RBP Expression in Human Tissues as a Function of Age", Ageing Research Reviews, 11, 423- 431.

Masuda, K., Kuwano, Y. 2019. "Diverse Roles of RNA-Binding Proteins in Cancer Traits and Their Implications in Gastrointestinal Cancers", Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA 1, 10, e1520.

McNabney, S. M., Henagan, T. M. 2017. "Short Chain Fatty Acids in the Colon and Peripheral Tissues: A Focus on Butyrate, Colon Cancer, Obesity and Insulin Resistance", Nutrients, 9, 1348.

Ming, X. F., Moroni, C., Stoecklin, G., Looser, R., Lu, M. 2001." Parallel and Independent Regulation of Interleukin-3 MRNA Turnover by Phosphatidylinositol 3-Kinase and p38 Mitogen-Activated Protein Kinase", Molecular and Cellular Biology, 21, 5778–89.

Mino, T. Takeuchi, O. 2018. "Post-Transcriptional Regulation of Immune Responses by RNA Binding Proteins", Proceedings of the Japan Academy, Series B, 94, 248-258.

Mogal A., Abdulkadir S. A. 2006. "Effects of Histone Deacetylase Inhibitor (HDACi); Trichostatin-A (TSA) on the Expression of Housekeeping Genes", Molecular and Cellular Probes, 20, 81-86.

Monteleone, F., Rosa, R., Vitale, M., D'Ambrosio, C., Succoio, M., Formisano, L., Nappi, L., Romano, M. F., Scaloni, A., Tortora, G., Bianco, R., Zambrano, N. 2013. "Increased Anaerobic Metabolism Is a Distinctive Signature in a Colorectal Cancer Cellular Model of Resistance to Antiepidermal Growth Factor Receptor Antibody", Proteomics, 13, 866-877.

Mukherjee, N., Corcoran, D. L., Nusbaum, J. D., Reid, D. W., Georgiev, S., Hafner, M., Ascano, M., Tuschl, T., Ohler, U., Keene, J. D. 2011. "Integrative Regulatory Mapping Indicates That the RNA-Binding Protein HuR Couples Pre-MRNA

Processing and mRNA Stability", Molecular Cell, 43, 327-339.

Pacheco, R. G., Esposito, C. C., Müller, L. C., Castelo-Branco, M. T., Quintella, L. P., Chagas, V. L. A., de Souza, H. S. P., Schanaider, A. 2012. "Use of Butyrate or Glutamine in Enema Solution Reduces Inflammation and Fibrosis in Experimental Diversion Colitis", World Journal of Gastroenterology, 18, 4278-4287.

Park, J. Y., Pillinger, M. H., Abramson, S. B. 2006. "Prostaglandin E2 Synthesis and Secretion: The Role of PGE2 Synthases", Clinical Immunology, 119, 229-240.

Pasini, A., Brand, O. J., Jenkins, G., Knox, A. J., Pang, L. 2018. "Suberanilohydroxamic Acid Prevents TGF-B1-Induced COX-2 Repression in Human Lung Fibroblasts Post-Transcriptionally by TIA-1 Downregulation", Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms, 1861, 463-472.

Peritz, T., Zeng, F., Kannanayakal, T.J., Kilk, K., Eiríksdóttir, E., Langel, U., Eberwine, J. 2006. "Immunoprecipitation of mRNA-protein complexes", Nature Protocols, 1, 577-580.

Raingeaud, J., Whitmarsh, A. J., Barrett, T., Dérijard, B., Davis, R. J. 1996. "MKK3- and MKK6-Regulated Gene Expression Is Mediated by the P38 Mitogen-Activated Protein Kinase Signal Transduction Pathway", Molecular and Cellular Biology, 16, 1247-1255.

Rodríguez-Cabezas, M. L., Gálvez, J., Lorente, M. D., Concha, A., Camuesco, D., Azzouz, S., Osuna, A., Redondo, L., Zarzuelo, A. 2018. "Dietary Fiber Down-Regulates Colonic Tumor Necrosis Factor α and Nitric Oxide Production in Trinitrobenzenesulfonic Acid-Induced Colitic Rats", The Journal of Nutrition, 132, 3263-3271.

Roelofs, H. M., Te Morsche, R.H., van Heumen, B. W., Nagengast, F. M., Peters, W. H. 2014. "Over-Expression of COX-2 mRNA in Colorectal Cancer", BMC Gastroenterology, 14, 9005.

Rognoni, J. B., Pichard, V., Honore, S., Rigot, V., Lehmann, M., Roccabianca, M., Carles, G., Luis, J., Marvaldi, J., Briand, C. 1998. "Convergent Effects of Growth Factors, Hormones, and Fibronectin Are Necessary for the Enterocyte Differentiation of a Colon Adenocarcinoma Cell Line (HT29-D4)", Differentiation, 63, 305-317.

Sakai, K., Kitagawa, Y., Hirose, G. 1999. “Binding of Neuronal ELAV-like Proteins to the Uridine-Rich Sequence in the 3’-Untranslated Region of Tumor Necrosis Factor-α Messenger RNA”, FEBS Letters, 446, 157-162.

Segain, J. P., Raingeard de la Blétière, D., Bourreille, A., Leray, V., Gervois, N., Rosales, C., Ferrier, L., Bonnet, C., Blottière, H. M., Galmiche, J. P. 2000. “Butyrate Inhibits Inflammatory Responses through NFκB Inhibition: Implications for Crohn’s Disease”, Gut, 47, 397-403.

Shannon, P., Markiel, A., Ozier, O., Baliga, N.S., Wang, J.T., Ramage, D., Amin, N., Schwikowski, B., Ideker, T. 2003. “Cytoscape: A Software Environment for Integrated Models of Biomolecular Interaction Networks”, Genome Research, 13, 2498–2504

Siegel, R., Naishadham, D., Jemal, A. 2012. “Cancer Statistics, 2012”, CA: A Cancer Journal for Clinicians, 62, 10-29.

Sobell, H.M. 1985. “Actinomycin and DNA Transcription”, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 82, 5328–5331.

Sobolewski, C., Sanduja, S., Blanco, F.F., Hu, L., Dixon, D.A. 2015. “Histone Deacetylase Inhibitors Activate Tristetraprolin Expression through Induction of Early Growth Response Protein 1 (EGR1) in Colorectal Cancer Cells”, Biomolecules, 5, 2035-2055.

Tabuchi, Y., Takasaki, I., Doi, T., Ishii, Y., Sakai, H., Kondo, T. 2006. “Genetic Networks Responsive to Sodium Butyrate in Colonic Epithelial Cells”, FEBS Letters, 580, 3035–3041.

Tong, X., Yin, L., Giardina, C. 2004. “Butyrate Suppresses COX-2 Activation in Colon Cancer Cells through HDAC Inhibition”, Biochemical and Biophysical Research Communications, 317, 463–471.

Topisirovic, I., Siddiqui, N., Orolicki, S., Skrabanek, L.A., Tremblay, M., Hoang, T., Borden, KL. 2009. “Stability of Eukaryotic Translation Initiation Factor 4E MRNA Is Regulated by HuR, and This Activity Is Dysregulated in Cancer”, Molecular and Cellular Biology, 29, 1152-1162.

Topping, DL., Clifton, PM. 2001. “Short-Chain Fatty Acids and Human Colonic Function: Roles of Resistant Starch and Nonstarch Polysaccharides”, Physiological Reviews,

81, 1031–1064.

Tuncer, S., Banerjee, S. 2015. “Eicosanoid Pathways in Colorectal Cancer: Recent Updates”, World Journal of Gastroenterology, 21, 11748–11766.

Wagner, B.J., DeMaria C.T., Sun, Y., Wilson, G.M., Brewer, G. 1998. “Structure and Genomic Organization of the Human AUF1 Gene: Alternative Pre-MRNA Splicing Generates Four Protein Isoforms”, Genomics, 48, 195–202.

Walter, E., Kissel, T. 1995. “Heterogeneity in the Human Intestinal Cell Line Caco-2 Leads to Differences in Transepithelial Transport”, European Journal of Pharmaceutical Sciences, 3, 215–30.

White, EJ., Brewer, G., Wilson, G.M. 2013. “Post-Transcriptional Control of Gene Expression by AUF1: Mechanisms, Physiological Targets, and Regulation”, Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms, 1829, 680-688.

Williams, C.S., Mann, M., DuBois, R.N. 1999. “The Role of Cyclooxygenases in Inflammation, Cancer, and Development”, Oncogene, 18, 7908–7916.

Winzen, R., Kracht, M., Ritter, B., Wilhelm, A., Chen, C.Y., Shyu, A.B., Müller, M., Gaestel, M., Resch, K., Holtmann, H. 1999. “The p38 MAP Kinase Pathway Signals for Cytokine-Induced mRNA Stabilization via MAP Kinase-Activated Protein Kinase 2 and an AU-Rich Region-Targeted Mechanism”, EMBO Journal, 18, 4969-4980.

Wong, J.M., de Souza, R., Kendall, C.W., Emam, A., Jenkins, D.J. (2006). “Colonic Health: Fermentation and Short Chain Fatty Acids”, Journal of Clinical Gastroenterology, 40, 235–243.

Yao, Q., Gu, A., Wang, Z., Xue, Y. 2018. “MicroRNA-144 Functions as a Tumor Suppressor in Gastric Cancer by Targeting Cyclooxygenase-2”, Experimental and Therapeutic Medicine, 15, 3088-3095.

Yin, Y., Laevsky, G., Giardina, C. 2001. “Butyrate Suppression of Colonocyte NF-KB Activation and Cellular Proteasome Activity”, The Journal of Biological Chemistry, 276, 44641–44646.

Zheng, X.T., Xiao, X.Q., Dai, J.J. 2015. “Sodium Butyrate Down-Regulates Tristetraprolin-Mediated Cyclin B1 Expression Independent of the Formation of Processing Bodies”, International Journal of Biochemistry and Cell Biology, 69, 241–248.

TÜBİTAK
PROJE ÖZET BİLGİ FORMU

Proje Yürütücüsü:	Prof. Dr. SREEPARNA BANERJEE
Proje No:	215Z107
Proje Başlığı:	Kolorektal Kanser Hücrelerinde Siklooksijenaz -2 (COX-2)'nin Sodyum Bütirat Aracılı Transkripsiyon Sonrası Regülasyonu
Proje Türü:	1001 - Araştırma
Proje Süresi:	36
Araştırmacılar:	SİNEM TUNÇER GURBANOV
Danışmanlar:	
Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi:	ORTA DOĞU TEKNİK Ü.
Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri:	01/04/2016 - 01/04/2019
Onaylanan Bütçe:	572343.0
Harcanan Bütçe:	521943.86
Öz:	Kısa zincirli yağ asitleri bağırsakta komensal bakteriler tarafından üretilmektedir ve bunların inflamasyonu azalttıkları bilinmektedir. Saptanan mekanizmalar içerisinde, siklooksigenaz-2 (COX-2) gibi inflamatuvar proteinlerin ve sitokinlerin ifadesinde transkripsiyonel inhibasyon bulunmaktadır. Birkaç çalışma bütiratın inflamatuvar genlerin mRNA kararlılığını değiştirebileceğini belirtmektedir; fakat mekanizmalar açıklanmamıştır. Bu projede, kolon kanseri hücre hatlarının sodyum bütirat ile muamele edilmesinin, birçok inflamatuar mRNA?nın kararlılığını arttırdığı bilinen bir RNA?ya bağlanan protein olan HuR?nin sitoplazmadaki düzeyinde azalmaya neden olduğunu tespit edilmiştir. Mekanistik olarak, sitoplazmik HuR miktarındaki azalmanın, HuR?un fosforlanmasını ve çekirdekte tutulmasını düzenleyen protein Chk2?nin fosforlanmasındaki artma ve p38 ile MK2 proteinlerinin fosforlanmasındaki azalma aracılığıyla olduğunu gösterilmiştir. Raportör analiz deneyleri ise HuR?nin azalan sitoplazmik seviyesinin COX-2 mRNA düzeyinde ve HuR bağlanan sekansların 3?UTR aktivitesinde azalmaya neden olduğunu ortaya koymuştur. Ek olarak yapılan RNA immün çöktürme deneyleri bütirat muamelesinin HuR?nin COX-2 3?UTR?sine bağlanmasında önemli ölçüde azalmaya neden olduğunu göstermiştir. Bu çalışmadan elde edilen veriler şöyle özetlenebilir: bütirat sadece transkripsiyonel düzenleme ile değil aynı zamanda mRNA de-stabilizasyonu ile post-transkripsiyonel olarak da inflamatuvar genlerin ifadesini azaltabilmektedir.
Anahtar Kelimeler:	COX-2, RNA?ya bağlanan protein, bütirat, kolon
Fikri Ürün Bildirim Formu Sunuldu Mu?:	Hayır
Projeden Yapılan Yayınlar:	1- Role of Butyrate in Post-Transcriptional Regulation of Inflammatory Genes by Regulating RNA Binding Proteins (Bildiri - Uluslararası Bildiri - Poster Sunum), 2- NaBt can regulate the expression of COX-2 post-transcriptionally in the presence of chemically induced stress in colon epithelial cells. (Bildiri - Uluslararası Bildiri - Poster Sunum),

TÜBİTAK