

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



**ADAMTS14 PROMOTORUNUN KLONLANMASI VE
KARAKTERİZASYONU**

GHUFRAN HAQI ISMAEL ALBAZI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Jüri Üyeleri : **Dr. Öğr. Üy. Nelin HACIOĞLU** (Tez Danışmanı)
Prof. Dr. Feray KÖÇKAR (Eş Danışman)
Dr. Öğr. Üy. Selma ÇELEN YÜCETÜRK
Dr. Öğr. Üy. Meltem ALPER

BALIKESİR, TEMMUZ - 2023

ETİK BEYAN

Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak tarafımda hazırlanan “**ADAMTS14 Promotorunun Klonlanması ve Karakterizasyonu**” başlıklı tezde;

- Tüm bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
 - Kullanılan veriler ve sonuçlarda herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
 - Tüm bilgi ve sonuçları bilimsel araştırma ve etik ilkelere uygun şekilde sunduğumu,
 - Yararlandığım eserlere atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- beyan eder, aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul ederim.

GHUFRAN HAQI ISMAEL ALBAZI
(imza)

Bu tez çalışması Balıkesir Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından (2019/108) nolu proje ile desteklenmiştir.

ÖZET

**ADAMTS14 PROMOTORUNUN KLONLANMASI VE KARAKTER ZASYONU
YÜKSEK LİSANS TEZİ
GHUFRAN HAQI ISMAEL ALBAZİ
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI**

**(TEZ DANIŞMANI: DR. ÖĞR. ÜY. NELİN HACIOĞLU)
(EŞ DANIŞMAN: PROF. DR. FERAY KÖÇKAR)
BALIKESİR, TEMMUZ - 2023**

ADAMTS genlerinin, tümörlerin ortaya çıkması, gelişmesi ve metastazında önemli bir rol oynadığı ortaya konmuştur. Bu gen ailesinin üyelerinden biri olan ADAMTS14 geni kollajen içerikli ADAMTS grubunu oluşturmaktadır. ADAMTS14, 2002 yılında insan kromozomu 10q22.1'de bulunan ve ECM'nin birleştirilmesi ve bozulmasında önemli bir rol oynayan bir proteinazı kodlayan bir gen olarak keşfedilmiştir. ADAMTS14'ün anormal ekspresyonunun, hücre proliferasyonu ve metastazı dahil olmak üzere tümör hücresi davranışlarını etkilediğine dair çalışmalar bulunmaktadır.

Bu yüksek lisans tezi kapsamında ADAMTS14'ün farklı hücre hatlarındaki ekspresyon ifadesi incelenmiştir. Ayrıca ADAMTS14 geninin promotor bölgesinden oluşturulan 5' delesyon mutantlarının klonlanması ve doğrulanması gerçekleştirilmiştir. Doğrulanması için SW480 kolon kanser hücre hattında kalsiyum fosfat presipitasyonu ile geçici transfeksiyonu gerçekleştirilmiştir. ADAMTS14 gen ifadesi ile IL-6 arasındaki ilişkiyi incelemek için IL-6 sitokin hücrelere farklı miktarlarda uygulanmış olup (20 ve 40ng), etkileri mRNA düzeyinde Real-Time PCR metoduyla belirlenmiştir. Bu sayede ADAMTS14 geni ve kolon kanseri üzerinde literatüre yeni bilgiler eklenmiştir.

ANAHTAR KELİMELEER: ADAMTS14, kolon kanseri, SW480, IL-6

Bilim Kod / Kodları : 20610, 20606

Sayfa Sayısı : 81

ABSTRACT

CLONING AND CHARACTERIZATION OF THE ADAMTS14 PROMOTOR MSC THESIS

**GHUFRAN HAQI ISMAEL ALBAZI
BALIKESIR UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE
MOLECULAR BIOLOGY AND GENETICS**

(SUPERVISOR: ASST. PROF. DR. NELİN HACIOĞLU)

(CO-SUPERVISOR: PROF. DR. FERAY KÖÇKAR)

BALIKESİR, JULY - 2023

ADAMTS genes have been shown to play an important role in the emergence, development and metastasis of tumors. ADAMTS14, one of the members of this gene family, forms collagen ADAMTS and is involved in collagen processing. ADAMTS14 was discovered in 2002 as a gene encoding a proteinase located on human chromosome 10q22. There are studies that aberrant expression of ADAMTS14 affects tumor cell behaviors, including cell proliferation and metastasis. With in the scope of this master thesis, the expression of ADAMTS14 in different cell lines was investigated. In addition, cloning and validation of 5' deletion mutants created from the promoter region of the ADAMTS14 gene were performed. For confirmation, transient transfection with calcium phosphate precipitation was performed in the SW480 colon cancer cell line. In order to examine the relationship between ADAMTS14 gene expression and IL-6, IL-6 cytokine was applied to the cells in different amounts (20 and 40ng), and its effects were determined at the mRNA level by Real-Time PCR method

KEYWORDS: ADAMTS14, colon cancer, SW480, IL-6

Science Code / Codes : 20610, 20606

Page Number : 81

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
ŞEKİL LİSTESİ	v
TABLO LİSTESİ	vii
SEMBOL LİSTESİ	viii
ÖNSÖZ	ix
1 GİRİŞ	1
1.1 Kanser	1
1.2 Hücre dışı matriks (Ekstraselüler matriks).....	2
1.3 ADAMTS Gen Ailesi	3
1.4 ADAMTS14 geni	5
1.5 ADAMTS14 ve Kanser	6
1.6 Sitokinler	8
1.6.1 IL-6 Sitokini ve Kanser	9
1.7 Çalışmanın Amacı	11
2 MATERYAL-METOD	13
2.1 Kullanılan Malzemeler	13
2.2 Klonlama Çalışmaları	16
2.2.1 ADAMTS14 Klonlama Primerlerinin Dizaynı	17
2.2.2 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)	17
2.2.3 Agaroz Jel Elektroforezi	19
2.2.4 DNA'yı jelden geri kazanma	20
2.2.5 Ligasyon	20
2.2.6 JM109 Kompetant Hücre Alıcı Hale Getirilmesi	23
2.2.7 Gliserol Stok Hazırlanması	23
2.2.8 Transformasyon	23
2.2.9 Restriksiyon Kesim işlemi	24
2.2.10 Plazmit İzolasyonu (küçük hacimli).....	24
2.2.11 Plazmit DNA İzolasyonu (Maxiprep)	24
2.3 Hücre Kültürü Teknikleri	25
2.3.1 Hücre Kültürü Ön Hazırlığı	25
2.3.2 Kullanılacak Hücre Soyları.....	25
2.3.3 Hücre Hattı Başlatması ve Büyütülmesi	25
2.3.4 Hücrelerin Pasajlanması	26
2.3.5 Hücre Sayımı ve Canlı Hücre Hesaplaması.....	26
2.3.6 - 80°C'de Hücrelerin Saklanması	27
2.3.7 Geçici Transfeksiyon Deneyleri	27
2.3.8 Lusiferaz ve Seap Aktivitesinin Belirlenmesi	27

2.4 RNA ile ilgili teknikler	28
2.4.1 RNA izolasyonu.....	28
2.4.2 RNA Miktarının Spektrofotometrik Tayini	28
2.4.3 cDNA Eldesi (RT-PZR)	29
2.4.4 Real Time PZR	29
3 BULGULAR.....	31
3.1 İnsan ADAMTS14 Promotoru Primerlerinin Tasarlanması	31
3.1.1 ADAMTS14 Geninin Promotorunun Klonlanması	31
3.1.1.1 ADAMTS14 Geninin Çoğaltılması	31
3.1.1.2 pGEMT-Easy Vektör Sistemine Klonlama.....	32
3.1.1.3 İnsan ADAMTS14 Promotor Parçalarının pMetLuc Haberci Vektörüne Alt Klonlama çalışmaları	34
3.1.1.4 Dizi Analizi	38
3.1.1.5 Bazal Promotor Aktivitesinin Belirlenmesi	44
3.2 Hücre Kültürü Çalışmaları.....	47
3.2.1 Farklı hücre hatlarında ADAMTS14 ifadesinin belirlenmesi.....	47
3.2.2 Sitokin Uygulanması	48
3.2.2.1 SW408 Hücre Modelinde IL-6 Sitokininin Etkilerinin mRNA Seviyesinde Gösterilmesi	48
4 TARTIŞMA.....	51
5 KAYNAKLAR (APA).....	57
EKLER.....	66
ÖZGEÇMİŞ.....	81

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1.1: ADAMTS ailesinin tüm elemanlarını gösteren şekil.....	4
Şekil 0.2: Tez kapsamında yapılan çalışma basamaklarını özetleyen diyagram.....	12
Şekil 2.1: pGEMT Easy vektörünün şematik gösterimi.....	22
Şekil 2.2: pMetLuc Lusiferaz reporter vektörünün şematik gösterimi.....	22
Şekil 2.3 : pMetLuc Lusiferaz kontrol vektörünün şematik gösterimi.....	22
Şekil 2.4 : Hemositometre.....	26
Şekil 3.1: 470 ve 390 bç promotor parçalarının amplifikasyonu.....	31
Şekil 3.2: 720 bç promotor parçalarının pGEM-T Easy vektör sistemine rekombinant olduğunun gösterimi.....	33
Şekil 3.3 : 470 bç promotor parçasının pGEM-T Easy vektör sistemine rekombinant olduğunun gösterimi.....	33
Şekil 3.4: 390 bç promotor parçasının pGEM-T Easy vektör sistemine rekombinant olduğu gösterimi.....	34
Şekil 3.5: pMetLuc vektör kesimi.....	35
Şekil 3.6: : pMetLuc haberci vektörü içerisine klonlanarak oluşturulan 5'delesyon insan ADAMTS14 promotor parçalarının şematik gösterimi.....	36
Şekil 3.7 : 720 bç promotor parçasının pMetLuc vektör sisteminde rekombinant olduğunun Gösterimi.....	36
Şekil 3.8 : 470bç promotor parçasının pMetLuc vektör sisteminde rekombinant olduğunun Gösterimi.....	37
Şekil 3.9: 390 bç promotor parçasının pMetLuc vektör sistemine rekombinant olduğunun Gösterimi.....	37
Şekil 3.10: 720 ,470, 390 bç promotor parçasının pMetLuc vektör sistemine rekombinant olduğunun gösterimi.....	38
Şekil 3.11: ADAMTS14 promotor bölgesi için blast analizi.....	39
Şekil 3.12: İnsan ve fare için ADAMTS14 promotorların karşılaştırması.....	40
Şekil 3.13 : İnsan ADAMTS14 promotor bölgesinin % guanin sitozin içeriğinin gösterilmesi	41
Şekil 3.14 : İnsan ADAMTS14 promotor bölgesine bağlanan muhtemel transkripsiyon faktörü şematik gösterimi.....	42
Şekil 3.15 : ADAMTS14 Promotorunun 720 bp primerinin saç tokası yapısı.....	43
Şekil 3.16: ADAMTS14 Promotoöruünün 470 bp primerinin saç tokası yapısı.....	43
Şekil 3.17: ADAMTS14 Promotorunun 390 bp primerinin saç tokası yapısı.....	44
Şekil 3.18 : pMetLuc kontrol vektörünün 48 saat lusiferaz sonuçları.....	45
Şekil 3. 19 : Promotor parçalarının 48 saat bazal aktivitelerinin istatistiksel analizi.....	45
Şekil 3.20: pMetLuc kontrol vektörünün 72 saat lusiferaz sonuçları.....	46
Şekil 3.21: Promotor parçalarının 72 saat bazal aktivitelerinin istatistiksel analizi.....	47
Şekil 3.22 : ADAMTS14 farklı hücre hatında ifadesinin real time PZR ile gösterilmesi...47	
Şekil 3.23: SW480 hücre hattında 40ng IL-6 uygulanan kontrol PZR.....	48
Şekil 3. 24: SW480 hücre hatında 20ng IL-6 uygulanan kontrol PZR.....	49

Şekil 3.25 : SW480 hücre hattında 20ng IL-6 uygulanan qRT-PZR.....	49
Şekil 3. 26 : SW480 hücre hattında 40ng IL-6 uygulanan qRT PZR.....	50

TABLO LİSTESİ

	<u>Sayfa</u>
Tablo 2.1: Kullanılan cihazlar.....	14
Tablo 2.2: Klonlama sırasında kullanılan kitler ve kimyasallar.....	15
Tablo 2.3: Vektörler ve tedarik edildiği firma adları.....	16
Tablo 2.4: Hücre Kültürü Esnasında Faydalanılan Kimyasallar ve Malzemeler.....	16
Tablo 2.5: RNA çalışmaları sırasında kullanılan malzemeler ve firması.....	16
Tablo 2.6: ADAMTS-14 promotürün klonlama primerleri.....	17
Tablo 2.7: Kullanılan dNTP karışımının hazırlanması.....	17
Tablo 2.8: PZR planı.....	18
Tablo 2.9 : PZR koşulları.....	19
Tablo 2.10: Agaroz jeli kullanımı için hazırlanan solüsyonlar.....	20
Tablo 2.11: pGEM-T Easy vektör ligasyon bileşenleri ve Miktarı.....	21
Tablo 2.12: Alt klonlama(pMetluc) ligasyon şartları.....	21
Tablo 2.13: Transfeksiyon basamağında kullanılan çözeltiler ve kimyasallar.....	27
Tablo 2.14: RT-PZR bileşenleri ve Miktarı.....	29
Tablo 2.15: Real Time PZR bileşenleri ve Miktar.....	30
Tablo 2.16: Real Time PZR koşulları.....	30
Tablo 3.1: ADAMTS14 Klonlama Primerleri ve Dizileri.....	31

SEMBOL LİSTESİ

ADAMTS	:	Trombospondin motifli bir disintegrin ve metalloproteinaz
ADAMTS14	:	Tip 14 trombospondin motifli bir disintegrin ve metalloproteinaz
C	:	Selsius Derecesi
cDNA	:	Tamamlayıcı DNA
COCl₂	:	Kobalt klorür
DEPC	:	Di-etilpirokarbonat
DMSO	:	Dimetli sülfoksit
DNAaz	:	Deoksiribonükleik Asit Proteaz
E.coli	:	Escherichia coli
EDTA	:	Etilendiamintetraasetik Asit
ESM	:	Ekstrasellüler Matris
FA	:	Formaldehit Agaroz
FCS	:	Fetal Sığır Serumumu
H₂SO₄	:	Sülfürik Asit
HCl	:	Hidrojen Klorür
LB	:	Luria Broth
µg	:	Mikrogram
µl	:	Mikrolitre
MgCl₂	:	Magnezyum Klorür
mRNA	:	Mesajcı Ribonükleik Asit
Nterminal	:	Amino Uç
NaCl	:	Sodyum Klorür
pH	:	Asitlik Derecesini Belirten Ölçü Birimi
pNP	:	Propeptid N- proteaz
PZR	:	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
rpm	:	Dakikadaki Dönüş Sayısı
RT-PZR	:	Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu
TBEçözeltisi	:	Tris-Borik Asit-EDTA
TSPI	:	Trombospondin Motif Tip I
UV	:	Ultra Viyole

ÖNSÖZ

Yüksek lisans, hayatımın planında çok önemli bir yere sahipti. Buralara kadar gelebilmem için bana bu şansı tanıyan ve bu süre zarfında beni destekleyen annem gibi gördüğüm, o güzel kalbinden öpmek istediğim canım Prof. Dr. Feray KÖÇKAR hocama emekleri için teşekkür etmeyi borç bilirim. Bana bu yolda size eşlik etme lutfunu tanıdığınız için size minnettarım hocam.

Bu yolculukta bana destek olmaya çalışan, danışmanım Dr. Öğr. Üye. Nelin Hacıoğlu hocama çok çok teşekkür etmek istiyorum. Tüm saygı ve sevgimle benim üzerimdeki emeklerinden dolayı teşekkürlerimi sunmak istiyorum. Bu yolun zorluklarına göğüs germemde bana çok yardım ettiniz hakkınız ödenmez hocam var olun.

Doç. Dr. Esra Tokay Hocama da buradan tüm saygı ve sevgimle benim üzerimdeki emeklerinden dolayı teşekkürlerimi sunmak istiyorum. Beni yalnız bırakmayan hem laboratuvarında hem de laboratuvarın dışında bana yol gösterici oldunuz, bu emeklerinizi unutmuyacağım.

Doç. Dr. Sümeye Aydoğan Türkoğlu'na özel teşekkür etmek istedim. Bu yolda beni yalnız bırakmadıkları için onlara olan minnettarlığımı da dile getirmek istiyorum.

Bu yolculukta çok insan tanıdım ve bu insanlar hayatıma çok güzel dokunuşlar bıraktı. Özellikle laboratuvarında deneysel çalışmalardan öte bir bağ kurduk. Yeri geldi hep beraber güldük yeri geldi hep beraber ağladık. Bu güzel duyguları bana yaşatan Feyza Nur Say, Yasemin Keleş, Rümeyza Alaçam, Şevin Avşar, Aylin Türkoğlu, Merve Demir, Hanife Aktaş, Aysu Bozkurt arkadaşlarıma ve sınıf arkadaşlarım Hasan Çapraz, Bedir Afifi ve Canberk Toprak'a da teşekkürü borç bilirim. İyi ki bu yolda siz vardınız ve iyi ki yolum sizler gibi muhteşem insanlarla kesişti.

Bu yolda beni ailem gibi destekleyen Acu ailesine ve Aysel halaya yürek dolu sevgilerimi iletiyorum. Varlığınız benim için her şeydi ve hep öyle kalacak.

Bu yolda çok yordüğüm anneanneme teyzelerime ve dayılarıma özür borçluyum. Benim için yaptıkları her şey için teşekkür ediyorum. Canım kardeşlerim Tebarek Roa ve Mariya bu yolda bana engel olan taşları kaldırmayı kendilerine görev edindiler. Onlara, bu hayattaki herşeyim olduklarını söylemek istiyorum. Hayatımda muhteşem ve mükemmel olan, hiçbir sözcüğün tarif edemeyeceği bunca şeyi yapma sebebim, canım annem ve babama bu tezimi armağan etmek istiyorum. Çünkü 22 yıllık eğitim öğretim hayatımda bana ne maddi ne de manevi anlamda eksiklik hissettirmediler. Kelimeler, onların bendeki değerini anlatmakta yetersiz kalacaktır o yüzden şunu belirtmekle yetineceğim; bir daha dünyaya gelme şansım olursa yine onların benim ebeveynim olmasını ve bütün iyiliklerin onları bulmasını temenni ederdim. Tüm benliğimle bana göstermiş oldukları her şey için sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Bu tez çalışması en yakın arkadaşım Buşra Wesam teyzeme ithaf edilmiştir.

BALIKESİR, 2023

GHUFRAN HAQI ISMAEL ALBAZI

1 GİRİŞ

1.1 Kanser

Kanser, hücre seviyesinde genetik bir bozukluktur. Dünyanın ilk sıralarda yer alan bir ölüm nedeni olarak karşımıza çıkmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) 2019 yılındaki verilerine göre, kanser 112 ülkede 70 yaş altındaki ölümlerde ilk sıralarda yer almaktadır. Kanserinde önde gelen ölüm nedeni olarak artan önemi, kısmen, birçok ülkede kansere göre inme ve koroner kalp hastalığı ölüm oranlarındaki belirgin düşüşleri yansıtmaktadır. Kanser görülme sıklığı ve ölüm oranı dünya çapında her geçen gün artış göstermektedir. İstatistikler, kadın meme kanserinin yaklaşık 2,3 milyon yeni vaka (%11,7) ile en çok teşhisi yapılan kanser olarak akciğer kanserini geride bıraktığını, sonrasında ise sırayla %11,4 ile akciğer, %10 ile kolorektal, %7,3 ile prostat ve %5,6 ile mide kanserleri gelmektedir. Akciğer kanseri, tahminen 1,8 milyon ölümlerle (%18) kanser ölümlerinde önde gelen nedeni olmaya devam etti, bunu kolorektal (%9,4), karaciğer (%8,3), mide (%7,7) ve kadın meme (%6,9) kanserleri izledi. İstatistikler erkeklerde en sık görülen kanserin yaklaşık %15,4 ile akciğer kanseri, %15,1 ile prostat kanseri ve %11,4 ile rektum kanseri olduğunu gösteriyor (Sung vd., 2021).

DNA düzeyinde kanser oluşumu tek bir nükleotid değişikliği veya kromozom kayıp ya da kazanımı, viral bir genomun hücrenin genomuna ilave olması, kromozomların yeniden modellenmesi gibi genomik değişikliklerden; RNA seviyesinde transkripsiyonal regülasyonun bozulması, mRNA'nın işlenmesi hasarı sonucu mRNA yarı ömrünün değişmesi; protein düzeyinde ise DNA ve mRNA'da meydana gelen değişimler neticesi protein yapısının bozulması ya da proteinlerin inaktivasyonu gibi çok çeşitli faktörlerden meydana gelir. Kanser sürecinde görevli olan pek çok gen olduğu bilinmektedir. Bu genler gruplara ayrılırsa; (i) onkogenler, (ii) hücre döngüsünü kontrol eden genler, (iii) apoptozis ilişkili genler ve tümör baskılayıcı genler, (iv) hücre hareketinde ve adezyonu ilişkili genler, (v) anjiogenik faktörler ve son olarak (vi) ekstraselüler matriksi bozan enzimler olarak ifade edilir (Hanahan vd., 2011).

Bu genlerde meydana gelen mutasyonlar kontrolsüz hücre bölünmesine neden olurlar. Kanser hücreleri normal hücrelerden morfolojik olarak oldukça farklıdır. Çok fazla mitoz geçirmelerinden dolayı büyük ve hiperkromatik nükleusları bulunmaktadır. Kanser

hücreleri bir dokudan başka bir dokuya lenf veya kan yoluyla yayılabilirler. Farklı vücut bölgelerine metastaz yapan bu kanser sürecine ise metastaz denir (Hanahan vd, 2011; Yıldırım, 2009).

Protoonkogenler normal hücrelerde hücre döngüsü regülasyonunu büyüme faktörü, büyüme faktörleri reseptörleri, DNA sentezini düzenleyiciler ve transkripsiyon düzenleyici proteinler olarak sağlarlar (Whiteside, 2008). Protoonkogenler mutasyonlar ile onkogenlere dönüşerek kontrolsüz hücre bölünmesini uyarırlar. Protoonkogenler mutasyona uğrayarak sürekli çalışır hale gelirse hücre durmadan bölünmeye uyarılır. Kanser hücreleri bu özelliklerini kaybettikten sonra, kontrolsüz bir şekilde çoğaltmaya başlar. Normal hücrelerde mutasyonlar, nesil başına, hücre başına, nükleotid başına 10^{-10} mutasyon oranında meydana gelen nadir olaylardır (Jackson ve Loeb., 2001).

1.2 Hücre dışı matriks (Ekstraselüler matriks)

Hücre dışı matriks, yara iyileşmesi, hücre göçü, embriyogenez ve apoptoz gibi fizyolojik süreçlerde ve hücrelerin mekanik desteğinde çok önemli bir rol oynar. Hücrelerin dış ortamla etkileşimini de sağlar. Ekstraselüler matriks hem patolojik hem de fizyolojik olaylarda oldukça önemli rollere sahiptir (Crotti vd., 2017).

Embriyonik gelişimde olduğu gibi ekstraselüler matriks, ana protein bileşenlerinin üretimi, bozulması ve yeniden modellenmesi ile kontrol edilir. Bu kontrolün bozulması ekstraselüler matriksi düzensiz hale getirerek anormal hücre davranışını, tümörle ilişkili anjiyogenezi ve enflamasyonu teşvik eder ve son olarak kanser mikro çevresinin oluşmasına ve ilerlemesine yol açar (Nam vd., 2021).

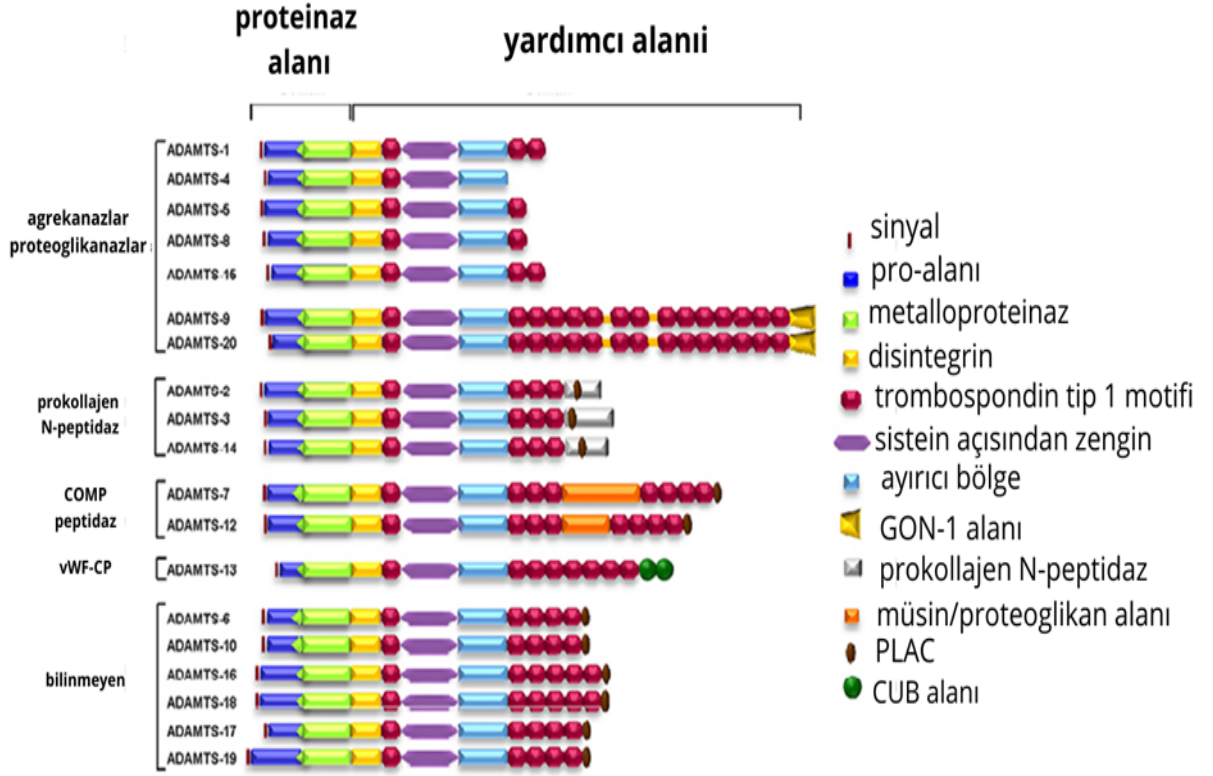
İlk ortaya konduğu zamanlarda ekstraselüler matriks yalnızca doldurucu ve âtil bir substrat olarak kabul edilirdi, ancak sonraki çalışmalar ile karsinogenezdeki aktif rolü açıklanmıştır (Colige vd., 2002; Al Nakouzi vd., 2012; Marano vd., 2015). Ekstraselüler matriks, hücrenin yüzeyi ile yakın ilişkili olan çeşitli proteinler ve polisakkaritlerden oluşur (Whiteside, 2008; Colige vd., 2002).

Ekstrasellüler matriks çok sayıda proteaz aktivitesine sahip molekül içerir. Bu moleküller protein ailesi olarak domain yapılarına göre gruplandırılmaktadır. Doku plazminojen aktivatörü, trombin, plazmin ve ürokinaz, serin proteazların birinci grubunun üyeleridir. İkinci kategori ise, matris metalloproteinazlar (MMP) olarak bilinen yüksek oranda korunmuş çinkoya bağlı endopeptidazlardan oluşur. Bu iki proteaz grubu, hücre dışı matriksi parçalamak ve maligniteyi yaymak için birlikte çalışır. Kemik farklılaşma proteini 1/tolloid ailesi de metaloproteinazların üçüncü grubunu oluşturur. ADAM olarak bilinen ve hücre-hücre adezyonu ve proteolizinde yer alan transmembran glikoproteinler, dördüncü ve son kategoriyi oluşturur (Tlsty vd., 2001; Tauro vd., 2013).

Bu çinkoya bağımlı metalloproteinazların birçok alanı vardır ve hücre zarında bulunurlar (Nickel ve Rabouille, 2009; Tauro vd., 2013). ADAM protein ailesinde şimdiye kadar yaklaşık 30 protein tanımlanmıştır. İlk olarak ADAM ailesi proteinleri tanımlanmış olup, sonrasında 1997 yılında ADAM-ilişkili yeni bir protein ailesi literatüre kazandırılmıştır. Kolon kanseri hücre hattı ile yapılan bir çalışmada bu yeni üye ADAMTS (trombospondin motifli bir disintegrin ve metalloproteinaz) olarak adlandırılmıştır. Bu yeni protein ailesi kendine ait TSP1 motiflerine sahip olduğundan ADAM ailesi olarak kabul edilmemiş ve yeni bir aile olarak tanımlanmıştır (Kuno vd.,1997).

1.3 ADAMTS Gen Ailesi

ADAMTS proteaz ailesi, 19 çeşit salgılanan metaloproteaz içerir (Rose vd., 2021). Proteinazlar veya peptidazlar olarak da adlandırılan proteazlar, proteolitik enzimlerdir. Moleküler bıçaklar olarak işlev gören proteazlar, uzun amino asit dizilerini parçalara ayırır; bu, tüm proteinlerin sentezi için gerekli olan, boyutlarını, bileşimlerini, şekillerini, dönüşümlerini ve nihai yıkımlarını kontrol eden bir işlemdir (Barrett vd., 1986 ; Puente vd., 2003; Shen vd., 2009). Proteazlar, insan genomunun yaklaşık %2'sini ve enfeksiyöz organizmaların genomlarının %1 ila %5'ini oluşturur (Rawlings vd., 2009; Shen vd., 2009). Günümüzde 50'den fazla insan proteazındaki tek amino asit mutasyonlarının genetik hastalıklara yol açtığı bilinmektedir (Puente vd., 2003; Shen vd., 2009).



Şekil 1.1: ADAMTS ailesinin tüm elemanlarını gösteren şekil (Fontanil vd., 2019)

ADAMTS proteazlarının nasıl çalıştığını tam olarak anlamak için doku gelişimi ve olgunlaşması sırasında ADAMTS proteaz aktivitesinin düzenlendiği mekanizmaları aydınlatmak önemlidir (Rypdal vd., 2021). ADAMTS proteazları, hücre dışı matris oluşumunu, yeniden şekillenmesini ve homeostatik adaptasyonu düzenleyerek organ gelişimi ve doku homeostazında önemli roller oynar (Dubail vd ., 2015).

ADAMTS proteaz aktivitesinin kendisini düzenleyerek, tüm ECM substrat gruplarının durumunu aynı anda değiştirilebilir ve bu nedenle, bu proteazlar, düzenleyici bir mekanizmadaki bozukluklarda hedeflenebilecek noktalar olarak görülebilir. Transkripsiyonel düzenleme, transkripsiyon sonrası ve posttranslasyonel modifikasyonlar veya furin işleme yoluyla ADAMTS aktivasyonu seviyesinde değişimler olmaktadır. ADAMTS proteaz aktivitesini düzenleyen mekanizmalar vardır, bu mekanizmalar, özellikle ADAMTS aracılı substrat bölünmesini modüle etmek için kullanılabilir (Rose vd., 2021).

ADAMTS gen ekspresyonunun, transkripsiyonel ve epigenetik mekanizmalar yoluyla düzenlenmesi karmaşıktır ve muhtemelen doku ve hücre tipine özgüdür. ADAMTS proteazları, başlangıçta aktif olmayan zimojenler olarak sentezlenir ve daha sonra proteazı aktive eden pro-peptitin çıkarılmasıyla sonuçlanan bir furin/proproteïn dönüştürücü aracılı bölünme olayı gerektirir (Wong vd., 2015). ADAMTS aracılı substrat bölünmesi, yalnızca ADAMTS proteazları ve ilgili substratları birbirine yakın olduğunda meydana gelebilir. Bu nedenle, ADAMTS proteaz aktivitesinin farklı hücresel veya hücre altı bölmelerle sınırlandırılması veya ADAMTS proteazlarının sinyalleme kaynaklı yer değiştirmesi, erişilebilirliklerini farklı substrat gruplarına kaydırabilir, ADAMTS ailesinin üyelerinin yapmış olduğu etkilere bakıldığı zaman ADAMTS4 ve ADAMTS5'in agreganı bozduğu ve eklem kıkırdağının erozyonuna ve eklem dejenerasyonuna katkıda bulunduğu artritte olmak üzere, kazanılmış ve konjenital bağ dokusu bozukluklarının patogeneğinde de yer alır (Dagoneau vd., 2004).

ADAMTS10, ADAMTS17 proteazlarındaki mutasyonların neden olduğu ve muhtemelen ECM'deki proteaz aktivitesini azaltan kalıtsal bağ dokusu bozukluklarına örnek olarak Weill-Marchesani sendromu, ADAMTS2 için dermatosparaksis Ehlers Danlos sendromu, ADAMTS19 için izole kalp kapağı hastalığı, ADAMTS13 için ise konjenital trombotik trombositopenik purpura hastalığı verilebilir (Wünnemann vd., 2020).

1.4 ADAMTS14 geni

ADAMTS14, 10q22.1'de perforin-1 geni (sentromerik) ve sfingosin fosfat liyaz geni (telomerik) arasında bulunur. ADAMTS14, 80 kb'yi aşan 22 kodlama ekzonu (5P çevrilmemiş bölgede (UTR) kodlamayan bir ekson) içerir (Bolz vd., 2001). ADAMTS-14, keşfedilecek prokollajen N-proteinazların üçüncüsü (Yang vd., 2017).

ADAMTS14 geni ve ADAMTS3 geni (%63) homolog olduğundan, ADAMTS14 ve ADAMTS3'ün, kollajen monomerinin N-terminal ön peptidini kırabilen, tip II kollajen monomerinin tip II kollajen lifine agregasyonunu teşvik eden ve kıkırdak hasarından sonra onarım sürecine katılabilen benzer işlevlere sahip olduğu tahmin edilmektedir (Fernandes vd., 2001; Ma., 2018).

ADAMTS14 geni tarafından kodlanan protein, sinyal peptidi, yeniden yapılandırma alanı, proteaz yapısal alanı, poli yapısal alan, dört trombine duyarlı protein yapısal alanı ve karboksil terminali yapısal alanından oluşan 1223 amino asitten oluşur (Ma., 2018).

1.5 ADAMTS14 ve Kanser

ADAMTS14 ve kanserler ile olan ilişkisinin araştırılması sonucunda yapılan literatür bilgileri özetlenmiştir. Oral skuamöz hücreli karsinom (OSCC) hücreleri ile yapılan bir immünohistokimya analizinde 250 OSCC doku örneğini analiz ettikten sonra, sonuçlar ADAMTS14 proteinlerinin OSCC dokularında eksprese edildiğini ortaya çıkarmıştır. Spesifik olarak, ADAMTS14 proteinlerinin sitoplazmik ekspresyonunun OSCC dokularında normal oral mukoza kontrol dokularına göre önemli ölçüde daha düşük olduğunu bulmuşlardır. Bu bulgular ayrıca ADAMTS14'ün OSCC'nin gelişimi ve ilerlemesinde rol oynadığını, ayrıca ADAMTS14'ün negatif sitoplazmik ekspresyonunun lenf düğümü metastazı ile önemli ölçüde ilişkili olduğunu ortaya koyduğunu gösterir (Zhou vd. 2014; Lin vd. 2020). ADAMTS14 gen polimorfizmi ile çevresel mutajenler arasındaki etkileşimler, OSCC tümör oluşumu için bir risk faktörüdür.

Hepatoselüler kanserde ADAMTS14 ekspresyonu, agresif kanserler ve klinik sonuçlarla ilişkilendirilmiştir. Öte yandan Ming-Jen Sheu ve arkadaşları, ADAMTS14 genetik polimorfizminin ve sigara içiminin hepatoselüler karsinomun klinikopatolojik gelişimi üzerindeki etkilerini araştırmışlardır (Sheu vd., 2017). Tümör patobiyolojisindeki rolleri anlamak için (Bruni vd., 2011; Sheu vd., 2017), ADAMTS14 geninin dört tek nükleotid polimorfizmi (nsSNP) (rs10823607, rs12774070, rs4747096 ve rs61537157), 680 kontrol ve HCC'li 340 hastadan incelenmiştir. Bulgular, rs12774070 varyantının, TSR alanını etkileyebilen ve ADAMTS14'ün hücre yüzeyi ilişkisini ve sıralı işleme mekanizmalarını değiştirebilen glikosilasyon sahasına yakın TSR alanındaki rolüne işaret etmektedir. Bu sonuçlar, ADAMTS14 yardımcı alanlarındaki ADAMTS14 polimorfik varyantlarının, sigara içen hastalarda HCC oluşumuna ve duyarlılığına katkıda bulunduğunu göstermektedir. ADAMTS14 polimorfizminin TSR alanı ve PRR alanındaki ortak etkisi, HCC gelişimini önemli ölçüde kolaylaştırdığı gösterilmiştir (Sheu vd., 2017).

Kodlamayan RNA'ların, karaciğer kanseri gibi birkaç yaygın kanserin karsinogenezinde ve metastazında yer aldığı gösterilmiştir. Dairesel RNA'lar (circRNA'lar), son zamanlarda ökaryotik transkriptomda yüksek oranda temsil edilen kodlamayan RNA ailesinin bir üyesi olarak tanımlanmıştır ve circRNA'ların tümörlerin gelişimi ve metastazında önemli roller üstlenebileceğini öne sürmüştür. ADAMTS14 geni, circADAMTS14, microRNA-572'ye bağlanabilir ve MikroRNA'lar (miRNA'lar), miRNA yanıt elemanları aracılığıyla transkripsiyon sonrası seviyelerde RNA hedeflerini negatif olarak düzenleme yetenekleri nedeniyle en çok çalışılan kodlamayan RNA'lar haline gelmiştir. Son zamanlarda, circRNA'ların, gen ekspresyonunu düzenlemek için miRNA süngerleri olarak hareket etmek üzere circRNA-miRNA eksenini oluşturduğu gösterilmiştir (Cheng vd., 2015).

ADAMTS14 proteazlarındaki tek nükleotit polimorfizmlerinin (nsSNP'ler) osteoartrit fenotipleri ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Bruni vd., 2011; Sheu vd., 2017). 10q22.1 kromozomunda bulunan ADAMTS14'ün yakın zamanda yeni bir osteoartrit aday geni olduğu bildirilmiştir. ADAMTS14'ün 21. eksonunda (rs4747096) olası zararlı etkiye sahip tek nükleotid polimorfizminin (nsSNP) diz osteoartriti ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Rodriguez vd., 2009). ADAMTS14'ün *in vitro* olarak pNPI aktivitesine sahip olduğu gösterilmiştir ve Ehlers-Danlos sendromu tip VIIC hastalarının kemik, tendon, kıkırdak, deri ve diğer dokularında gözlemlenebilen kalıntı PNPI aktivitesinin olası bir kaynağı olduğu öne sürülmüştür (Goff vd., 2006).

Renal hücreli kanser (RCC; BHK), renal parankim kaynaklı kemoterapiye dayanıklı bir kanser grubunu (berrak hücreli RCC, papiller RCC, kromofob RCC ve renal onkositoma dahil) temsil eder. Tahminlere göre, her yıl yaklaşık 400.000 yeni renal hücreli karsinom vakası teşhis edilmekte ve yıllık BHK ile ilişkili ölüm oranı yılda 175.000 ölüme ulaşmaktadır (Luciani vd., 2000). RCC tümörjenezini, genetik değişikliklerin veya obezite, sigara içme, stres ve diğerleri gibi alışkanlıkların varlığı ile ilişkilidir (Brozka vd., 2023). Renal hücreli kanser ile ADAMTS 14 arasındaki ilişkiyi biyobelirteç gibi çeşitli testler ve immünoterapinin bağışıklık tepkilerini tahmin etmek için ADAMTS14 kullanarak değerlendirmek için çeşitli çalışmalar yapılmıştır. ADAMTS14 ile ilgili sinyal yollarını ve biyolojik işlevi tanımlamak için gen seti zenginleştirme analizi (GSEA) yapıldı. Potansiyel mekanizmaları açısından, lncRNA/RNA bağlayıcı protein (RBP)/ADAMTS14 mRNA

ağları çalışması, ADAMTS14'ün RCC tümör dokularında bitişik normal doku örneklerine kıyasla daha yüksek ekspresyon gösterdiğini gösterdi. Ayrıca ADAMTS14 mRNA ekspresyonunun önemli ölçüde ilişkili olduğu da ortaya çıktı. Sonuç olarak, ADAMTS14'ün RCC için bağımsız bir prognostik faktör olabileceği kaydedilmiştir.

Ayrıca ADAMTS14 ekspresyonunun, immün hücreler, immün kontrol noktası molekülleri ve tümör immün mikroçevresi ile önemli ölçüde ilişkili olduğu gözlemlendi. Böbrek kanseri hastalarında, ADAMTS14 ekspresyonunun, tümör immün mikroçevresi, immün hücreleri ve immün kontrol noktası molekülleri ile önemli ölçüde ilişkili olduğunu gösterdi (Chen vd., 2022).

1.6 Sitokinler

Sitokinler, hücre sinyalleşmesinde önemli roller oynayan küçük proteinlerdir. Ya onları üreten hücreye (otokrin) ya da çevredeki hücelere (parakrin) etki eden çeşitli hücresel kaynaklar tarafından salgılanırlar. Proteinler ve bazen peptidler olarak sınıflandırılırlar ve ayrıca glikosile edilebilirler. Sitokinler genellikle çok küçük miktarlarda dolaşırlar ve gerektiğinde konsantrasyonları 1000 katına kadar çıkabilir. Sitokinler başlangıçta bağışıklık sistemi bağlamında tanımlanmıştır; ancak çeşitli bağışıklık dışı hücreler tarafından üretildiği ve davranışlarını etkilediği gösterilmiştir. Sitokinler, hayatta kalma, apoptoz, farklılaşma ve fonksiyonel aktivasyondaki (immün tepkiye katkı) geniş bir rol yelpazesine rağmen, en yaygın etkilerinden biri olan hücre proliferasyonunun indüklenmesi ile ilişkilendirilerek genellikle "büyüme faktörleri" olarak adlandırılır. Yıllar geçtikçe, sitokinler çeşitli sınıflara, ailelere veya süper ailelere ayrılmıştır. Ya sayısal keşif sıraları (özellikle interlökin ailesinde, şu anda IL-38'e kadar) ya da belirli bir fonksiyonel aktivite (örneğin, daha büyük tümör nekroz faktörü ailesi) kullanılarak yapılmıştır. Antikor tepkilerini destekleyen sitokinler (Tip 2) ile hücresel bağışıklık tepkilerini artıran sitokinler (Tip 1) arasında bölünürler. Bu alt sınıflandırma, işlevleri (erken veya geç, doğuştan gelen veya uyarlanabilir, pro- veya anti-inflamatuar, mitojenik, düzenleyici, hayatta kalma işlevleri) veya bazen birincil savunma hücreleri (monokin, lenfokin) kullanılarak gerçekleştirilir. Yine de, sekans homolojisini paylaşımlarına ve reseptör sistemleri arasında biraz karışıklığa rağmen, sitokinler işlevlerinde özgülük ve hatta aynı ailenin üyeleri içinde karşıt işlevler gösterirler. Sitokinler,

fizyolojik etkilerini üretmek için çoklu hücre içi sinyal yollarını aktive eder. En çok çalışılan yollardan biri, reseptörle ilişkili janus kinazları (JAK) ve gizli sitoplazmik transkripsiyon faktörlerini, sinyal transdüserlerini ve transkripsiyon aktivatörlerini (STAT) içeren yoldur (Churchman vd., 2012).

1.6.1 IL-6 Sitokini ve Kanser

IL-6, çeşitli tümör tiplerinin tümör mikroçevresinde bolca bulunan bir sitokin olarak tanımlanmıştır. IL-6, tümör oluşumunun seyri ile ilgili olmasının yanı sıra, ikincil bir tümörün, bir metastazın oluşumu için bir ön koşul olarak meydana gelmesi gereken olaylar dizisini de kolaylaştırır. Bireysel dokularda ve kanser türlerinde kanserin ilerlemesine katkıda bulunan izole edilmiş mekanizmaların araştırılması son derece değerlidir. Bununla birlikte, neredeyse tüm katı tümör türleri arasında en yüksek ölüm oranını da açıklayan birleştirici bir özellik, metastatik yayılma sürecidir (Chang vd., 2013.) Metastaz oluşumu, (i) çevreleyen hücre dışı matrisin lokalize göçü ve istilası, (ii) yakındaki damarlara damar içi, (iii) kan dolaşımı veya lenfatik damarlarda aşırı koşullarda hayatta kalma, (iv) doku parankimine ekstrasvazyon ve son olarak (v) yeni bir ortamda gelişmelerine izin vermek için tümör hücrelerinin aktivitesinin modifikasyonu şeklinde gerçekleşir. Metastaz oluşumu, çeşitli kanser türlerinde meydana gelen yaygın bir süreç olduğu gibi, anormal IL-6 sinyali, tümör büyümesini ve metastazı destekleyen başka bir birleştirici motif sağlar. Bu nedenle, IL-6'ya umut verici bir terapötik hedef konumu sağlar (Hanahan vd., 2011).

IL-6 sinyali, klasik veya trans-sinyal yolunu izleyebilir. Klasik yol, akut faz bağışıklık tepkisi, rejenerasyon ve hematopoezde hayati öneme sahipken, trans yol, IL-6 reseptörünü (IL-6R) ifade etmeyen hücrelerin bu sinyale yanıt vermesini ve IL-6'nın aşağı akış sinyalini başlatmasını sağlar. Klasik IL-6 sinyal yolu, IL-6'nın zara bağlı spesifik bir reseptör olan IL-6R'ye bağlanmasıyla başlatılır. Ligand/reseptör kompleksi daha sonra zara yayılan gp130 ile birleşerek trimerik bir kompleksin oluşmasına neden olur. Sonuç olarak, daha fazla dimerizasyonla, bir hetero hekzamerik sinyal ileten reseptör kompleksi ortaya çıkar (Hirano vd., 1986; Scheller vd., 2011; Novick vd., 1999). IL-6R'nin ekspresyonu nötrofiller, hepatositler, monositler/makrofajlar ve bazı lenfositlerle sınırlıyken, gp130 çoğu hücre tipinde her yerde bulunur (Brábek vd., 2020; Scheller vd., 2011; Lacina vd., 2019). Bununla birlikte, tek başına gp130 ifade eden hücreler, IL-6'yı bağlayamaz ve bu nedenle etkilerine

yanıt vermez. Bu, alternatif trans yolunun önemini vurgulamaktadır (Novick vd., 1999). Trans-sinyal yolu, insan serumu ve idrar örneklerinde çözünür IL-6R'nin (sIL 6R) saptanmasının bir sonucu olarak keşfedilmiştir. Trans yolu, kanser bağlamında kritiktir, çünkü IL-6R'yi ifade etmeyen tümörü ve çevredeki stromal hücreleri etkiler, böylece aktiviteyi ve hücrelerin tümör mikroçevresine alınmasını değiştirir (Scheller vd., 2011).

IL-6/IL-6R/gp130 yolu, Janus kinazları (JAK'lar) aktive eder. JAK'lar, sırayla, JAK/sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivatörü (STAT), PI3K/AKT veya RAS/RAF/MEK/MAPK yollarını kullanır (Johnson., 2018; Lacina vd., 2019). Reseptör kompleksi oluşumunun ardından, kinazlar JAK1, JAK2 ve tirozin kinaz 2 (TYK2), gp130 ile birleşir. Bu kinazlar, karşılıklı transfosforilasyon yoluyla aktivasyona uğrar, böylece gp130'un sitoplazmik bölgesindeki tirozin rezidülerinin fosforilasyonuna izin verir. Fosforlanmış gp130 artık STAT3 ile etkileşime girebilecek duruma gelir. STAT3'ün aktive edilmiş JAK'lara yakınlığı nedeniyle, STAT3 ayrıca fosforilasyon yoluyla aktive edilir. Aktif STAT3, bir homodimer oluşturur ve bir transkripsiyon faktörü olarak işlev görür (Johnson., 2018; Scheller vd., 2011; Manore vd., 2022; Yu vd., 2009).

Artan STAT3 sinyali ve yukarı regüle edilmiş siklin-D1 ve cMYC seviyeleri, hücre döngüsü boyunca ilerlemeyi hızlandırırken, hayatta kalma yanlısı faktörler de kanser hücrelerinde apoptozu baskılar. Ayrıca, IL-6 aşağı akış etkileri, nötrofillerin, doğal öldürücü hücrelerin veya T hücrelerinin aktivitesini modüle ederek, bu bağışıklık hücrelerini lezyona götürür. Ancak yine de neoplazmaya karşı azalmış bir bağışıklık tepkisi ile sonuçlanır. Bu mekanizma, bir immün toleransın gelişmesine izin verir (Johnson vd.,2018). IL-6 aynı anda T düzenleyici hücreleri ve miyeloid türevli baskılayıcı hücreleri yukarı doğru düzenler. Aktivasyonları, ayrıca, ciddi şekilde bozulmuş bir anti-tümör bağışıklık tepkisi ile sonuçlanan, önemli derecede bağışıklık bastırılmış tümör mikroçevresine katkıda bulunur (Rašková vd., 2022).

IL-6'nın ve bunun sinyal yollarının inhibisyonu, kanser tedavisinde yoğun olarak incelenen bir terapötik yaklaşımdır. Stratejiler, STAT3, NF- κ B ve HIF-1 α gibi akış aşağı sinyale proteinleri dahil olmak üzere IL-6 sinyale ekseninin (IL-6/IL-6R/gp130) genel inhibisyonunu araştırmaktadır. Gen ekspresyonu seviyesinde başka bir terapötik fırsat IL-6

kaskadı ile aktive edilmiş STAT3 dır. STAT3 bir transkripsiyon faktörü olarak hareket etmektedir. STAT3'ün DNA bağlama kabiliyetini inhibe ederek, bir transkripsiyon faktörü olarak hareket etme kapasitesi ortadan kaldırılacaktır (Handle vd., 2018; Hellsten vd., 2008).

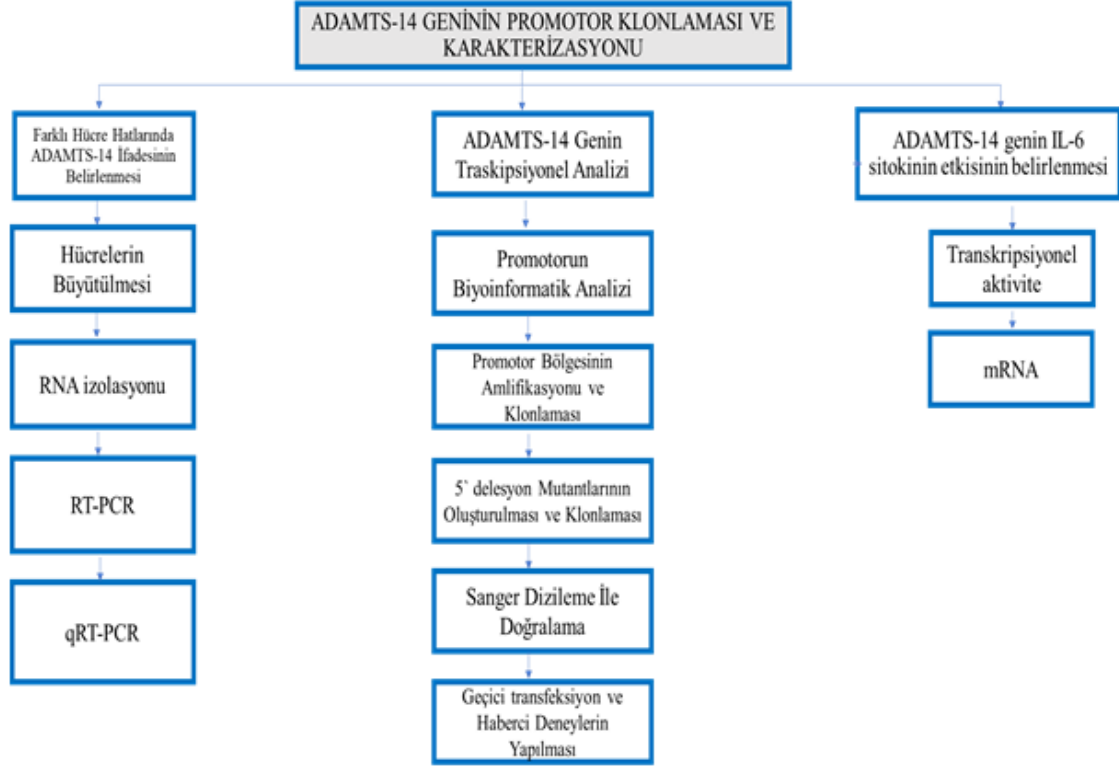
1.7 Çalışmanın Amacı

ADAMTS14 geni ile ilgili literatür taramasında, hücreler kanserleşme mekanizmasında önemli rolleri olduğu ortaya konmuştur. Bu nedenle bu çalışma kapsamında ADAMTS14 geninin promotor bölgesinin klonlanması ve transkripsiyonel aktivitenin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bunun için 3 aşamada deneyler gerçekleştirilmiştir.

I. İnsan ADAMTS14 promotor bölgesinin genomik DNA ile amplifiye edilerek çoğaltması gerçekleştirilmiştir. ADAMTS14 promotorunun 5' delesyon mutantlarının pGEMT-Easy vektör sistemine T:A klonlaması yapılmış, ardından ise ökaryotik bir ekspresyon vektörü olan pMetLuc vektörüne klonlanması gerçekleştirilmiştir. Klonlamanın doğrulanması DNA dizi analizi hizmet alımı ile sağlanmıştır. Daha sonra ekspresyon çalışmaları sonucunda model olarak seçilen SW480 hücre hattına, ADAMTS14 promotor parçalarının kalsiyum fosfat yöntemiyle geçici olarak transfekte edilmesi sağlanmıştır. Oluşan ifadenin belirlenmesi ve promotor parçalarının etkinliklerinin gösterilmesi için, bazal aktivite belirleme çalışmalarında için Lusiferaz ve SEAP aktivite metodu kullanılmıştır.

II. ADAMTS14 ifadesinin hangi hücre hatlarında daha fazla olduğunun belirlenmesi için Saos-2, Hep3B, LnCAP, HUVEC, Panc-2 Hücre hatları ile Real Time PCR çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bu çalışma sonucunda deneysel model olarak kullanılacak olan hücre hattı belirlenmiştir.

III. IL-6 sitokini ile ADAMTS14 geni arasındaki ilişkinin belirlenmesi için hücre kültüründe öncelikle SW480 hücrelerine farklı dozlarda (20 ve 40ng/ μ L) IL-6 sitokini farklı saat aralıklarında uygulanmıştır. Bu sayede hem doz hem zamana bağlı olan değişimleri değerlendirilmiştir.



Şekil 1.2: Tez kapsamında yapılan çalışma basamaklarını özetleyen diyagram

2 MATERYAL-METOD

Çalışma ortamı ve materyaller %70'lik etil alkol kullanılarak sterilize edildi. Bakteri tabanlı, RNA ve DNA bazlı araştırmalarda kullanılan bütün ısıya dayanıklı malzemeler, cam malzemeler, eppendorflar, pipet uçları ve kutuları ve çözeltiler (1,02 ATM basınçla) 121°C'de 20 dakika süresince otoklavda steril edildi.

Hücre kültürü incelemelerinin temizliği için ise hücre kültürü laboratuvarı ve laminer akış UV lambası etkinleştirilerek dezenfekte edilmiştir. Steril edilmeye elverişli olmayan solüsyonların sterilizesi için ise 0,22 mikron filtrelerden yararlanıldı. CO₂'li inkübatör ve Laminar air flow %70'lik etil alkol ve çamaşır suyu ile steril edildi. İnkübatör ortamının nemini koruması için belli aralıklarda su tablasına otoklavlanmış su eklendi. Kültürdeki solüsyonlar, uç kutuları ve pipet uçları ve eppendorflar 121°C'de 20 dakika otoklavlanıp temizlendi.

2.1 Kullanılan Malzemeler

Tez çalışması sırasında kullanılan araç-gereçler ve markaları Tablo 2.1'de gösterildiği gibidir.

Tablo 2.1: Kullanılan cihazlar

Cihazın Adı	Markası
Mikro Santrifüj	Thermo
Isıtmalı Çalkalayıcı	Polyscience
Elektronik Hassas Tartı	Sartorius
Isıtıcılı Manyetik Karıştırıcı	Heidolph
Thermal Cyclor	Scientific
Elektroforez Tankı	Sartorius
Elektroforez Güç Kaynağı	Thermo scin
Buz Makinesi	Hoshizaki,japonya
Buz Dolabı	Arçelik,türkiye
Santrifüj	Thermo
Luminometre	Hettich Zentrifügen
Etüv	Memmert
Vortex	Velp,scientfica

Tablo 2.1: Kullanılan cihazlar (devamı)

Mikroskop	Elektromag/Türkiye
-80 Derin Dondurucu	Glacier
Soğutmalı Santrifüj	Sigma
Jel Görüntüleme Sistemi	Vilber Lourmat
CO ₂ 'li Inkübatör	Nuair
Otoklav	HMC,HIRAMAYA
Spektrofotometre	Thermo Fisher
Masa Tipi pH metre	Hanna
Ultra Saf Su Cihazı	Apelex, İngiltere

Tablo 2.2: Klonlama sırasında kullanılan malzemeler

Malzemen	Firması
Ligaz enzimi (T4 DNA)	Neb,Fermentas
Agar	Pronadisa
Kanamisin Antibiyotiği	Sigma
Ampisilin Antibiyotiği	Sigma
10 mm Petri Plakaları	İsolab
LB Broth	Pronadisa
15 Ve 50mL Falkon Tüpleri	Isolab
Restriksiyon Endonükleazlar (XhoI, HindIII)	Neb,Fermentas
Ligaz Buffer	Neb,Fermentas
Miniprep DNA İzolasyon Kiti	Fermentas
Maxiprep DNA İzolasyon Kiti	Fermentas
Jel Pürifikasyon Kiti	Fermentas
Sodyum Klorür	Sigma
Amonyum Asetat	Sigma
EDTA	Sigma
Tris Base	Sigma
Etidyum Bromür	Sigma
Agaroz	Fluka
MgCl ₂ (25µM)	Fermentas
Kuvartz 96 well Plate	Sigma
Betain	Sigma
dATP,dTTP,dGTP,dCTP	Fermentas
7-Deaza GTP	Invitrogen
DMSO	Sigma
Gliserol	Merk
KalsiyumKlorür	Merk
Taq Polimeraz	Fermentas
Taq + KCl Tamponu	Fermentas
6X Yükleme Boyası	Fermentas

Tablo 2.3: Vektörler ve tedarik edildiği firma adları

Vektör	Firması
pGEMT®easy	Promega
pMetLuc control	Clontech laboratories
pMetLuc Reporter	Clontech laboratories
Seap-2 kontrol	Clontech laboratories

Tablo 2.4: Hücre kültürü esnasında faydalanılan kimyasallar ve malzemeler

Malzeme	Firması
DMEM medyum	Gibco
Sığır Serum Albümini	Sigma
Fosfat Tampon Solüsyonu	Sigma
Tripan mavisi	Sigma
L-Glutamin	Sigma
FCS (Fetal Sığır Serum)	Sigma
0,22 - 0,45 mikron filter	Sartorius
10-25 mL serolojik pipetler	Corning
75 ve 25cm ² 'lik flasklar	Corning

Tablo 2.5: RNA çalışmaları sırasında kullanılan malzemeler ve firması

Malzeme	Firması
RNA izolasyon kiti	Fermentas
Oligo(dT)	Fermentas
DEPC	Sigma
Formaldehit	Sigma
Reaksiyon tamponu	Fermentas
Ribolock inhibitörü	Fermentas

2.2 Klonlama Çalışmaları

2.2.1 ADAMTS14 Klonlama Primerlerinin Dizaynı

Genel olarak primer dizaynı için “NCBI” gen bankasındaki kayıtlar kullanılarak insan ADAMTS14 geninin varyant 1 için olası gen bölgesi tayin edilmiştir. Ardından promotör bölgesinin analizi yapılmıştır. Primerler dizayn edilirken %GC değerleri, olası saç tokası yapıları, Tm derecesi çözümlenmesi yapılmıştır.

Tablo 2.6: ADAMTS14 promotörünün klonlama primerleri

ADAMTS14 Primerleri	Primer Dizleri
ADAMTS14 720 bç ileri	5' GAGGGAGTCTCCCTCTA '3
ADAMTS14 470 bç ileri	5' GATCCCCGGCCGCAGGC '3
ADAMTS14 390 bç ileri	5' TGCCCACCCCCGGCCCGT '3
ADAMTS14 geri	5' AGCCATGTGGCCGCGCTGG '3

2.2.2 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

Çoğaltılması istenen bölgeye spesifik olarak tasarlanan ve 100 ng/μL sulandırılmış olan primerlerden ara sulandırma yapıldı. Bu stok 50ng/μL olup, 1 μL olacak şekilde kullanıldı. 1 ve 2 mM olarak MgCl₂ konstrasyonları denendi. Son hacmi olarak 50 μL :10 X Taq + KCL tamponundan 5 μL, 5 U/ μL Taq polimeraz enziminden 0,5 μL, 10 mM dNTP stoğundan Tablo 2.7’de gösterildiği üzere, 1 μL koyduktan sonra karışım hazırlandı. Promotör bölgesi oldukça GC zengin olduğundan dolayı bu materyallere ek olarak çeşitli PCR güçlendiricileri kullanılmaktadır. 7-deaza GTP 0,5 μL (50 μM), betain 13 μL, DMSO 2.5 μL(%5) eklendi. Son hacim dH₂O ile tamamlanmıştır. PZR döngü koşulları Tablo 2.9’ de verildiği gibi yapıldı.

Tablo 2.7: Kullanılan dNTP karışımının hazırlanması.

Malzeme	Hazırlanması
dNTP karışımı	Nükleotid’in her birinden 10 μL(dATP, dTTP,dCTP,dCTP) alınıp steril H ₂ O eklenerek 100 μL’ye tamamlandı.

Son hacim için 50 µL olarak Polimeraz Zincir Tepkimesi güçlendiriciler (Betain, 7-Deaza GTP, DMSO) ve diğer bileşenler Tablo 2.8 kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu PZR sonuçları agaroz jel elektroforezi ile yürütülüp, sonuçlar kaydedilmiştir.

Tablo 2.8: PZR planı

Malzeme	720 bç için	470bç için	390bç için
Genomik DNA (ng)	1 µL	1 µL	1 µL
100 ng/µl ileri primer	1 µL	1 µL	1 µL
100 ng/µl geri primer	1 µL	1 µL	1 µL
10 mM dNTP karışımı	1 µL	1 µL	1 µL
2 mM MgCl ₂	2 µL	2 µL	2 µL
10X Taq +KCl tampon	5 µL	5 µL	5 µL
%5 DMSO	2,5 µL	2,5 µL	2,5 µL
Betain	10 µL	10 µL	10 µL
50 µM 7-deaze GTP	0,5 µL	0,5 µL	0,5 µL
1 U/µl Taq DNA polimeraz	0,5 µL	0,5 µL	0,5 µL
dH ₂ O	µL	µL	µL
Son hacim	50 µL	50 µL	50 µL

Tablo 2.9 : PZR koşulları

Döngü sayısı	Segment	Sıcaklık	Süre
1	Başlangıç Denatürasyonu	95°C	5dk
35	Denatürasyon	95°C	45dk
	Bağlanma Sıcaklığı	55°C	45dk
	Uzama	72°C	45dk
1	Final Uzama	72°C	10dk

2.2.3 Agaroz Jel Elektrofözezi

Agaroz jel elektrofözezi yardımıyla PZR sonucu meydana gelen DNA bantları görüntülenmiştir. Yatay jeller, DNA elektrofözezi için hazırlandıktan sonra jelle örnekler yüklenir ve 40 dakika boyunca 0,5 X/L TBE agaroz jel elektrofözezi tamponu üzerinde 90V akımda yürütülmüştür. Plazmit DNA çalışmalarımda % 2'lik, ekspresyon deneylerinde ise %1 konsantrasyonda hazırlanan agaroz jel kullanıldı.

Agaroz jel hazırlanırken 0,5 X TBE içinde agaroz kaynatılıp donmadan önce jelle 2,5 µL etidyum bromür eklenmiştir. Jel katı halini aldıktan sonra DNA örnekleri ile yükleme tamponu (6X yükleme boyası bromofenol mavi) jelin kuyularına eklenip yürütme işlemi yerine getirildi. Elektrofözezi ile ayrılan DNA parçalarının büyüklüğünün tespiti için 100 bp DNA marker kullanıldı. DNA büyüklüklerinin kıyası, kullanılan marker ile gerçekleştirildi. UV transillüminatöründe elektrofözezi sonuçları görüntülenip DNA görüntüleri alınıp kaydedilmektedir.

Tablo 2.10: Agaroz jeli kullanımını için hazırlanan tamponlar

Solüsyonlar	Hazırlanışı
0,5 M EDTA (pH: 8)	186,1 g disodyum etilendiaminat etraasetat tartılır. Steril edilmiş su katılır. Bu işlemin tamamlanmasından sonra pH değeri 8'e ayarlanır. Solüsyon hacmine 1L'ye denk gelecek şekilde steril saf su eklenip otoklavlama yapılır.
0,5 X/L TBE tamponu (pH: 8)	900 mL saf suyu 100 mL 5 X TBE'ye katıp karıştırılarak hazır hale getirilir.
5 X/L TBE tamponu (pH: 8)	54 g Tris Base, 27,5 g Borik asit, 20 mL 0,5 M'lık EDTA tartıldıktan sonra üzerine saf su eklenerek karıştırılır. pH 8'e ayarlanır. Solüsyonun hacmi 1 L'ye tamamlanır ve otoklavlanır.
% 2'lik agaroz jel	2 g agaroz tartılır ve 100 mL tampon solüsyonunda çözüldükten sonra 40-45°C'ye ulaşmasıyla Et-Br eklenerek tank içine boşaltılır.
DNA marker	100 µL DNA marker (1 kb), 200 µL yükleme boyası, 200 µL steril suda çözülür.

2.2.4 DNA'yı jelden geri kazanma

Bu aşamada kullanılan jelden geri purifikasyon kiti ile PCR sonucunda elde edilen ve jel elektroforezinde görüntülenmiş olan DNA, UV ışığına fazla maruz bırakmadan kesilip ağırlığı belli olan 2 mL ependorf tüplere alındı. Jelin tamamen erimesi için kitin içeriğinde bulunan bağlama tamponu kullanıldı. Bağlama tamponu içerisinde 50-65 °C arasında inkübe edildi. Eridikten sonra solüsyonun 700 µL'si kolona yüklenir. 1dk 13.500rpm'de santrifüj yapılır. Bu aşamada solüsyon bitene kadar tekrarlanır. Kolonun altındaki süzüntü atılır ve ondan sonra kolona 500 µL yıkama tamponu koyulur ve 1 dk 13.500 rpm'de santrifüj yaptıktan sonra süzüntü atılır. Bu işlem bir kere tekrar edilir. Etanolu uzaklaştırmak için kolon boş şekilde 1 dk 13.500 rpm'de santrifüj edilir. Kolon yeni bir ependorfa alınır. Ilık 50 µL dH₂O elüent alındıktan sonra saflaştırıldığımız DNA'nın jelden kazanımının denetimi için DNA'dan 5 µL agaroz jel ile görüntülenerek doğrulandı. DNA miktarı ve saflığının kontrolü için 260 /280 nm dalga uzunluğundaki absorbanslar ölçüldü.

2.2.5 Ligasyon

Jelden geri kazandığımız promotor parçalarının 3' ucunda Taq polimeraz enziminin eklediğinden dolayı poli A kuyruğu bulunmaktadır. Bu yüzden linear ve 3'ucunda poli T

kuyruğu içeren bir klonlama vektörüne (T:A Stratejisi) ile klonlanma işlemi yapılacaktır. Bunun için de ligasyon gerçekleştirilmektedir. Bu ligasyon koşulları vektörün uygun gördüğü protokole göre gerçekleştirilmiştir.

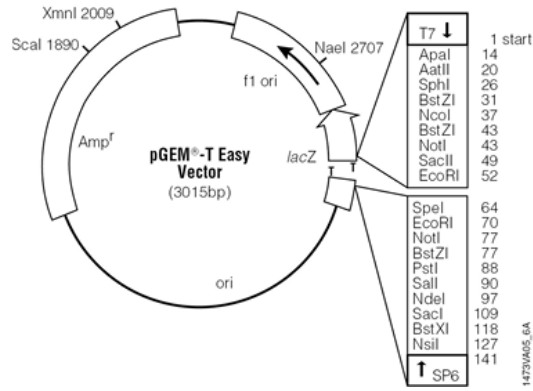
Tablo 2.11: pGEM-T Easy vektör ligasyon bileşenleri ve miktarı

Malzemeler	Miktarı
İnsert	15 µL
50 ng/µL'lik pGEM-T Easy vektör	2 µL
3U/µL'lik T4 DNA ligaz	1 µL
T4 ligaz buffer	2 µL
Son hacim	20 µL
16 °C de 16 saat inkübasyon	

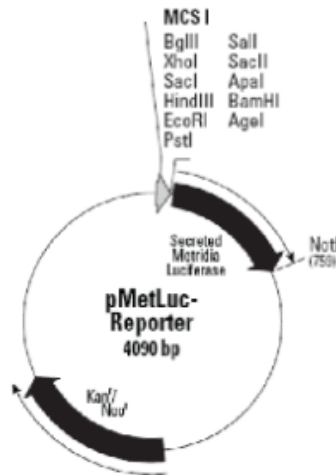
Alt klonlama çalışmaları için ise çalışmalarda pMetluc vektörü kullanılmıştır. Vektör hazırlanırken restriksiyon enzimleri olarak tasarım sırasında seçilen ve geni içeren kesmediği bilinen XhoI ve HindIII enzimleriyle kesilerek hazırlanmıştır. Kesimin ardından vektör önce jelde yürütüp, ardından jelden geri saflaştırılmıştır. Hazır hale gelen pMetluc vektörü ile ligasyon kurulmuştur. Bu ligasyon Tablo 2.12'de gösterildiği gibi gerçekleştirildi.

Tablo 2.12: Alt klonlama(pMetluc) ligasyon şartları.

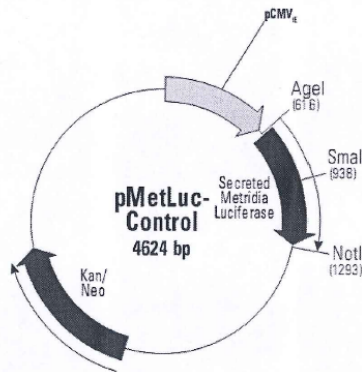
Malzemeler	Miktarı
İnsert (Jelden geri kazanılan DNA)	12 µL
pMetluc vektörü	5 µL
3U/µL'lik T4 DNA ligaz	1 µL
T4 ligaz tamponu	2 µL
Son hacim	20 µL
16 °C de 16 saat inkübasyon	



Şekil 2.1: pGEMT Easy vektörünün şematik gösterimi



Şekil 2.2 : pMetLuc Lusiferaz repoter vektörünün şematik gösterimi



Şekil 2.3 : pMetLuc Lusiferaz kontrol vektörünün şematik gösterimi

2.2.6 JM109 Kompetant Hücre Alıcı Hale Getirilmesi

JM109 kompetant hücre alıcı hale getirilmesi için JM109 hücreleri bir gece 10 mL sıvı LB besiyerine seyreltme ekimi işlemiyle 37°C'de 16 saat boyunca inkübasyona bırakıldı. Ardından bu önkültürden 5 mL'lik kısmı hazırlanan 100 mL sıvı besiyeri içerisine inokülasyonu sağlandı.

OD₆₀₀=0.5-0.6 değer seviyesine ulaştığında bakteri süspansiyonu 3000 rpm'de 5 dk santrifüj yapıp süpernatant uzaklaştırıldı. 0,1 M CaCl₂ solüyonundan bakteri süspansiyonu ile eşit hacimde eklendi. Mikropipetle dikkatli bir şekilde karıştırıp pelet çözüldü. 35 dk buza alındıkta sonra 3000 rpm'de 4°C'de 5dk santrifüjlenip süpernatant uzaklaştırıldı. Hücre peleti ilk baştaki hacminin 1/10'i kadar hacimde 0,1M CaCl₂ ilavesiyle yeniden çözülür. Yaklaşık 2-4 saat boyunca buzda beklemeye bıraktıktan sonra %40'luk gliserolden eşit hacim eklenerek dikkatli bir şekilde karıştırıldı. Buz üzerinde beklettiğimiz boş ependorflara paylaştırılarak -80°C'de dondurucuda saklandı.

2.2.7 Gliserol Stok Hazırlanması

Önkültür hazırlamak için LB medyuma 30 µg/mL kanamisin eklendikten sonra tek koloni seçip ekim yapıldı. Alevin yanında %40'luk steril gliserol ve önkültür ile eşit hacimde ependorflara eklenerek -80°C'de saklandı.

2.2.8 Transformasyon

Ligasyon ürünü bir gece boyunca cihazda bırakıldıktan sonra hücre soyu *E.coli* olan JM109 kompetant hücreler kullanılarak transformasyonu gerçekleştirildi. Transformasyon yapmak için LB agar petriyerler hazırlandı. Kompetant hücreler -80°C'de çıkarıp buza kondu ve yaklaşık 5dk çözünmesi için bekletildi. 200 µL'lik kompetant hücrelerine 10 µL ligasyon ürünüden eklendi. İnkübasyon için 40 dk buzda bekletildi. Ardından önceden 42 °C'ye ayarlı su banyosunda, hücreler 2 dk boyunca ısı şokuna bırakıldı ve sonrasında 2 dakika süresince buza alındı. Çalkalamalı inkübatör içerisinde önceden 37°C'ye ılıtılmış olan LB medyumdan 800 µL eklenerek 2 saat 37°C'de bekletildi.

Mavi-beyaz koloni tekniği kullanılarak transformasyon ürünleri seçildi. Bu seçimi yapmak için LB agar besiyerlerine önce ampisilin eklenerek hazırlandı. Ardından üzerine 40 µL X-

Gal çözeltisi (stok 50 mg/mL) ve 40 µL IPTG çözeltisi (100 mM stok) yaydırıldı. İnkübasyon süresinin bitiminden sonra 2mL'lik eppendorfa alıp 5.000 rpm'de 5dk santrifüjlenip 100 µL LB medyumda çözüldü. Çözülen transformasyon kültürü petrilere yayıldı. 15-20 dk petrilere emmesi için bekletildi. Ardından petrilere ters çevirip 37°C'de 16 saat (bir gece) inkübatörde inkübasyona bırakıldı. Kolonilerin rekombinant olup olmadığını kontrol etmek için koloniler izole edildi. İzole edilen kolonilerin rekombinant olma durumu XhoI ve HindIII enzimleri kullanarak yapılan restriksiyon kesimi ile belirlendi.

2.2.9 Restriksiyon Kesim işlemi

Thermo Scientific'ten temin edilmiş olan 10 U/µl XhoI enziminden 1 µl ve 10 U/µl HindIII enziminden 1µl, 10X Yeşil Tampon'dan 5 µL eklendi. dH₂O ilave edilerek reaksiyon hacmi 50 µL 'ye tamamlanarak 37 °C'de 16 saat boyunca bırakıldı.

2.2.10 Plazmit İzolasyonu (küçük hacimli)

Plazmit izolasyonu yapmak için öncelikle önkültürün inkübasyonu yapıldı. Çalkalayıcı etüvde bir gece 37°C'de 200 rpm'de inkübe edildi. Gliserol stoklar yapıldıktan sonra, kültür 5000 rpm'de 10 dk santrifüjlenip bakteri pelletleri elde edildi. Plazmit DNA izolasyonu için 250 µL resüspansiyon tamponundan eklenerek Thermo Scientific-GeneJET Plasmid Miniprep™ kitinin öğrendiği gibi çözüldü. Lizis tamponundan 250 µL eklenerek yapışkan ve sümüksü bir yapı oluşturuldu. Ardından 350 µL nötralizasyon tamponu eklenip hiç beklemeden 5 dk 13.500 rpm'de santrifüjlendi. Süpernatant bitene kadar bu aşama tekrarlandı. 500 µL yıkama tamponundan kolona yüklendi. 1 dk santrifüj yapıp yıkama tekrarlandı. Etanolden kurtulmak için bir kez boş santrifüj yapıldı. Sonrasında yeni bir eppendorfa alıp 50 µL dH₂O ile elüsyon alındı. Plazmitlerin miktar ve saflığı spektrofotometrik ölçümler ile tayin edildi.

2.2.11 Plazmit DNA İzolasyonu (Maxiprep)

İzolasyon basamaklarının başlangıcında tüm materyaller ve besiyerine otoklavlanma işlemi uygulandı. Kan⁺ ihtiva eden 20 mL medyuma (LB besiyeri) seyreltme ekimi uygulandı ve gece boyu çalkalamalı etüvde 37 °C 200 rpm'de inkübe edildi. İnkübasyonun sonra Kan⁺ içeren LB medyumda seyreltilti. Yüksek kopya sayılı plazmitlere 200 mL LB besiyeri

kullanılırken düşük kopyalı olanlar için ise 250 mL LB medyum kullanıldı. İnkübe işleminin 37°C 'de gece boyu 2000 rpm'de bakterilerin çoğalması sağlandı. Bakterilerin kâfi miktarda yoğunluğa ulaşmasının ardından 15 dakika +4°C'de 6000 g'de santrifüjlendi. Elde edilen pelletlerin plazmit izolasyonu için ticari plazmit izolasyon kitinden (Thermo Scientific-GeneJET) yararlanıldı ve kitin ön gördüğü protokole göre yüksek saflık ve miktarda plazmitlere ulaşıldı. Plazmitlerin miktarını ve saflıklarını belirlemek için spektrofotometrik ölçüm nanodrop ile yapıldı.

2.3 Hücre Kültürü Teknikleri

2.3.1 Hücre Kültürü Ön Hazırlığı

DMEM (Dulbecco's Modified Eagles Medium) hücre kültürü merdyumuna L-Glutamine 0,2 mM son konsantrasyon olarak eklenip FCS %10 son konsantrasyon olarak ilave edilmektedir. Bileşenlerin steril olması için 0,22µM steril filtreden süzme yapılmaktadır. Stok FCS (Fetal Calf Serum) ilk kullandığımızdan önce inaktive etmek amacıyla bir saat, 56°C ısı ile gerçekleştirildi. Steril etmek için 0,22µM bir filtreden geçirildi ve -20°C'de saklandı.

2.3.2 Kullanılacak Hücre Soyları

Çalışmada ana hücre hattı olarak ATCC'den temin edilmiş olan İnsan Kolon hücre hattı olan SW480 kullanılmıştır. Ayrıca ADAMTS14 geninin ekspresyonunu belirlemek için Saos-2, Hep3B, LnCAP, HUVEC, Panc-2 Hücre hatları kullanılmıştır.

2.3.3 Hücre Hattı Başlatması ve Büyütülmesi

Hücre hatlarının büyütülmesi amacıyla -80°C'de saklanan hücre hatları çıkarılır. Hızlı bir şekilde çözünmesi için 37°C sıcaklığındaki su banyosuna alınmıştır. Çözöldükten sonra %10'luk FCS içeren medyuma alınmıştır. Ardından 1000 rpm'de 5 dakika santrifüjlendi. Süpernatant uzaklaştırıldı. Pelleti çözmek için medyum ile muamele edilir. Ondan sonra flasklara ekim yapılır. Etiket yapıp 37°C, %5 CO₂'li inkübatöre bırakılmıştır. Her hafta hücreler 75 cm² 'lik flasklarda totalde 15 mL medyumda (%10 FCS içeren) rutin pasaj yaparak üretilmeye devam edilmiştir.

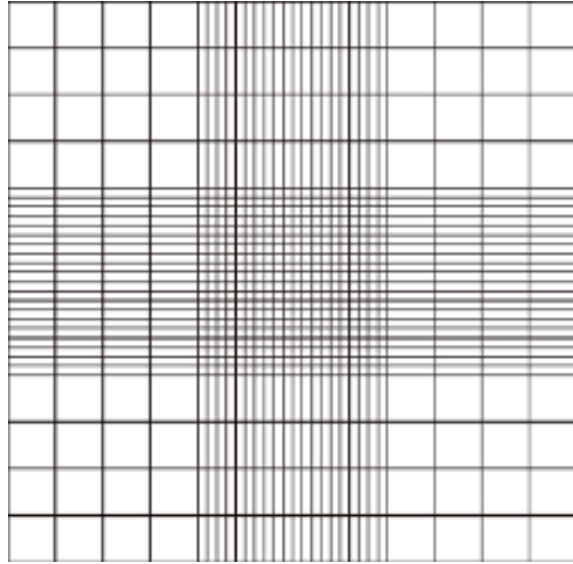
2.3.4 Hücreslerin Pasajlanması

Hücresler yüzeylerinin %80-90'ını kapladığında hücreler pasajlandı. Bunun için öncelikle içindeki medyum uzaklaştırılır. Artıkların uzaklaşması için iki kere PBS ile yıkanır. 3 mL Tripsün-EDTA ile hücreler tripsinizasyon yapılmıştı. Falkona aktararak 1000 rpm'de 5 dk santrifüjlendi. Süpernatant uzaklaştırdıktan sonra taze medyum ile pelleti çözüldü. Eşit ölçüde flasklara paylaştırılmıştır. Etiket yaptıktan sonra 37°C, %5 CO₂ içeren inkübatöre bırakılmıştı.

2.3.5 Hücre Sayımı ve Canlı Hücre Hesaplaması

Toplam hücre süspansiyonun millilitresindeki hücre miktarını hesap etmek için, üzeri 25 küçük kareye ayrılmış, 1 mm² alan 0,1 mm derinliği olan ve toplam hacminin hesaplanabildiği hemositometre (Şekil 2.4) lamı kullanılmaktadır. Canlı - ölü hücreleri ayırtmak için 10 mirolitre hücre karışımı ve eşit hacimde tripan mavi 5 dk beklenir. Burada canlı hücreler boyanmaz sadece ölü boyanır. Süspansiyonun millilitresindeki toplam hücre miktarının tespiti aşağıdaki formül ile yapılır.

$$\text{Toplam canlı hücre m/mL} = \text{Sayılan hücre} \times 2 \times 10^4$$



Şekil 2.4: Hemositometre

2.3.6 - 80°C'de Hücrelerin Saklanması

Buldukları yüzeyi %80-90 seviyesinde kaplaması durumunda hücrelerin medyumunu uzaklaştırılır. Hücreler 2 defa PBS ile yıkanır ve 75 cm² flaslar için 2 mL Tripsin – EDTA ile tripsinizasyona uğrattılır. Hücreler yüzeyden kalkınca hızlıca medyum ilave edilir ve 1000 rpm'de 5 dk boyunca santrifüjlenerek hücreler çöktürülür. Sıvı kısım uzaklaştırılır, ardından pellet çözülür ve soğuğa dayanıklı tüplere yerleştirilip etiketlenerek -80°C'de saklanır.

2.3.7 Geçici Transfeksiyon Deneyleri

12'li plakalarda ve 25 cm² flasklarda uygulanmıştır. 12li plakalarda transfeksiyon işleminden. 1 gün önce hücreler 250.000 hücre/kuyu olacak şekilde yayılmıştır. Transfekte edilecek DNA ve 2 M CaCl₂ ayrı bir tüp içinde hazırlanmıştır. 2X Hepes üzerine eklenip 60 dk geçtikten sonra oda sıcaklığında presipitasyon için bekletilmiştir. Çökeltme oluştuktan sonra damlalar halinde karışım kuyucuklara eklenmiştir. Karışımın dağılması için plaka yavaşça sallanmıştır. 48 ve 72 saat sonra hücre medyumunu alınarak lusiferaz aktivitesi belirlenmiştir.

Tablo 2.13: Transfeksiyon basamağında kullanılan çözeltiler ve kimyasallar

Adı	İçerik
2X HEPES (pH:7,05-7,12)	1,6g NaCl , 0,04 g Na ₂ HPO ₄ 1,3 g HEPES tartılır.100 mL'ye dH ₂ O ile tamamlandı. Sonra otoklav yapılır, filtre edilir ve -20°C de saklandı.
2 mM CaCl ₂	14,7 g tartıldı, 50 mL'ye distile H ₂ O ile tamamlanıp otoklav yapıp filtre edilmiştir. +4°C'de saklanmaktadır.

2.3.8 Lusiferaz ve Seap Aktivitesinin Belirlenmesi

İnsan ADAMTS14 gen ailesine ait 5' ucu delesyonu ile oluşturulmuş promotor parçalarının bazal aktivitesi için Lusiferaz Reporter Assay kiti TM (Clontech) içerisinde bulunan 10 X substrat tamponu bir seri sulandırılarak kullanılmıştır. Ondan sonra 96'li plakalara transfeksiyon medyumundan 50 µl alındı ve 5µl 1X substrat/reaksiyon tamponundan

eklendikten sonra sonuçlar luminometre kullanarak okunmuştur. Seap aktivitesi için ise öncelikle 20 µl hücre kültürü medyumu, 96 kuyucuklu plaklara eklenmiştir. 5X dilüsyon tamponu 1X 'e dH₂O ile dilüe edilir ve 75µl 1X dilüsyon tampon örneklerle eklenir ve plaka alüminyum folyoya sarılarak 65°C 30 dk bekletilir. Devamında 2-3 dk buza alınır sonra yeniden oda sıcaklığına getirilir. SEAP solüsyonundan 100µl eklenir ve oda sıcaklığında 30 dk bekletilir. Ondan sonra plaka luminometre kullanarak okutulmuştur. Elde edilen veriler Microsoft excel programı ile değerlendirilmesi yapılmıştır.

2.4 RNA ile İlgili Teknikler

2.4.1 RNA İzolasyonu

RNA izolasyon kitinin Thermo tavsiye edildiği gibi RNA izolasyonu yapılmıştır. İlk önce -80'de bekletilen SW480 hücrelerinin pelleti 1 mL PBS ile çözüldü. 1000 rpm de 5 dk santrifüj yapılmıştır. 400 µl lizis tamponu eklenir ve 2 dk bekletilir. Ardından hücreleri çözmek için pipetaj yapıldı. Daha sonra 3 dk bekletildi. Tüplerin içerisindeki tüm miktarı D kolonuna alındı. Daha sonra 11000 g'de 2 dk santrifüj yapıldıktan sonra R kolonuna alınmıştır. Tekrar 11000 g'de 2 dk santrifüj yapılmıştır. R kolonu yeni bir ependorfa alındıktan sonra 500 µL yıkama tamponu eklenip 11000 g'de 1 dk santrifüj yapılmıştır. Daha sonra R kolonu yeni tüpe alınıp 700 µL yıkama tamponu (LS tamponu) eklenip 11000 g'de 1 dk santrifüj yapılmıştır. R kolonuna 700 µL (%80) etanol eklenerek, tekrar 11000 g'de 1 dk santrifüj yapılmıştır. Kalan etanolden kurtulmak amacıyla R kolonu yeni bir ependorfa alınıp 11000 g'de 1 dk santrifüj yapılmıştır. Santrifüj bittikten sonra yeni bir ependorfa alınıp 35-40 µL dH₂O eklenerek 5 dk inkübasyona bırakılmıştır. 11500 g'de 1 dk santrifüjlenmiştir. RNA'lar elüsyon alındıktan hemen sonra buza alınmıştır. -80°C'de muhafaza edilmiştir.

2.4.2 RNA Miktarının Spektrofotometrik Tayini

RNA izole edildikten sonra 50 µL dH₂O ile elüsyon alındı. A₂₆₀ dalga boyunda spektrofotometre ile 2 µL elüsyon alınan dH₂O ve 2 µL RNA örneğinden kuyulara koyularak elde edilen RNA örneklerinin absorbansları Thermo MultiScanGo cihazında nanodrop ile ölçüldü.

Ölçüm sonrası örneklerin miktarları (Örnek-Kör) × 40 × 20,408 formülü ile hesaplanarak belirlendi.

2.4.3 cDNA Eldesi (RT-PZR)

RNA numunelerinden miktarları tayin edilip, elde edilen kalıp RNA ile cDNA sentezi gerçekleştirildi. RT-PZR için Tablo2.14 ile verilen protokol uygulandı.

Tablo 2.14: RT-PZR bileşenleri ve Miktarı

RT-PZR bileşenleri	Miktarı
RNA kalıp	1 µL
Oligo dt	1 µL
dH ₂ O	10 µL
65°C'de 5dk	
5X reaksiyon tamponu	4 µL
Ribolok Rnaz inhibitör	1 µL
dNTP karışımı	2 µL
Revers transkriptaz	1 µL
Son hacim	20 µL
Yavaşça karıştır ve santrifüj uygula	
42°C'de 60 dk	
70 °C'de 5 dk	
4°C ∞	

2.4.4 Real Time PZR

Real time PZR kiti (Amplikon) kullanılarak elde edilen tüm cDNAlar için Tablo2.15 ile belirtilen koşullarda Real zamanlı reaksiyonları yapıldı. Bunun için karışımlar hazırlandı ve uygun döngüler Tablo2.16 ile gösterildiği hali ile Roche480 cihazı kullanılarak çalıştırıldı. Analiz kısmında normalizatör gen olarak kullanılan Human-β-mikroglobülin-2 geninin Ct değerleri ile ADAMTS14 gen değerlerinin hesaplaması yapıldı. Bulunan Ct değerlerinden ΔΔct metoduna göre analizler gerçekleştirildi. Hesaplanan değerler ile Graphpad Prism programı ile grafiklendirildi.

Tablo 2.15: Real Time PZR bileşenleri ve Miktar

Real Time PZR bileşenleri	Miktar
Syber Green	6,25 µL
dH ₂ O	4,25 µL
10 pmol F-Primer	0,5 µL
10 pmol R-Primer	0,5 µL
cDNA	1 µL
Son hacim	12,5 µL

Tablo 2.16: Real Time PZR koşulları

Sıcaklık	Süre	Döngü
94 °C	3 dk	1
94 °C	30 sn	35
58 °C	30 sn	
72 °C	30 sn	
72 °C	10 dk	1

3 BULGULAR

3.1 İnsan ADAMTS14 Promotoru Primerlerinin Tasarlanması

ADAMTS14 promotoru primerleri için “www.ncbi.nlm.nih.gov” adresi kullanıldı. Tasarlanan primerlerin bazı kriterleri sağlaması gerekmektedir. İleri ve geri primerlerin Tm sıcaklıkları hesaplandı. Ardından saç tokası yapısı oluşumları analiz edildi. Primerlerin içerdiği % GC oranları belirlendi. Bu primerler data banklardaki DNA dizileri ile “www.ncbi.blast” adresinde karşılaştırıldı ve ADAMTS14 promotoru ile en yüksek uyuma sahip olanlar seçildi. ADAMTS14 promotoruna ait primerler Tablo 3.1’te gösterilmiştir.

Tablo 3.1: ADAMTS14 Klonlama Primerleri ve Dizileri

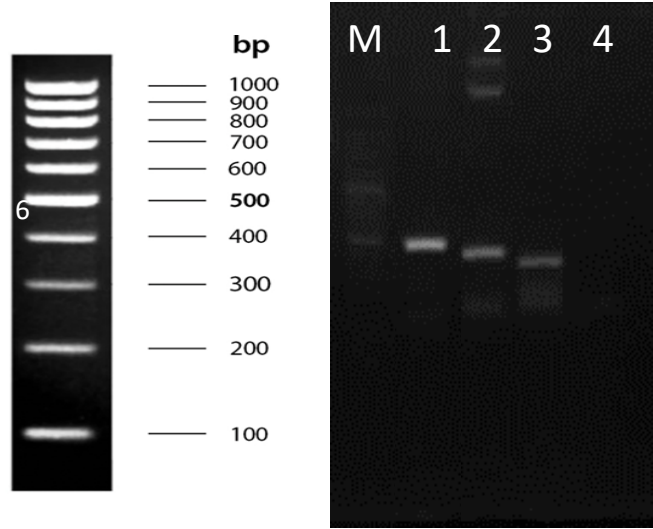
ADAMTS14 Primerleri	Primer Dizleri
ADAMTS14 720 bç ileri	5’ GAGGGAGTCTCCCTCTA ’3
ADAMTS14 470 bç ileri	5’ GATCCCCGGCCGCAGGC ’3
ADAMTS14 390 bç ileri	5’ TGCCCACCCCCGGCCCGT ’3
ADAMTS14 geri	5’ AGCCATGTGGCCGCGCTGG ’3

3.1.1 ADAMTS14 Geninin Promotorunun Klonlanması

3.1.1.1 ADAMTS14 Geninin Çoğaltılması

İnsan ADAMTS14 promotoru aile üyelerinin diğerlerinde olduğu fazlaca bir %GC oranı içerdiğinden çoğaltmalar için pek çok PZR denemeleri gerçekleştirilmiş ancak sonuç alınamamıştır. Bu yüzden çoğaltma için bazı kuvvetlendiriciler kullanmıştır.

Tablo 2.8 ve 2.9’de gösterilen miktar ve döngü koşulları kullanılarak reaksiyonlar gerçekleştirildi. Elde edilen ürünler Bölüm 2.2.2’de anlatıldığına uygun hazırlanan agaroz jele yüklenerek görüntüleme sistemi ile sonuçlar alındı. 720, 470 ve 390 baz çifti (bç) büyüklüğündeki ADAMTS14 promoturu çoğaltılması başarılı.



Şekil 3.1: 470 ve 390 bç promotor parçalarının amplifikasyonu

M:100 bç marker, 1: 470 bç promotor parçası, 2: 390 bç promotor parçası, 3: Pozitif kontrolü, 4: Negatif kontrolü

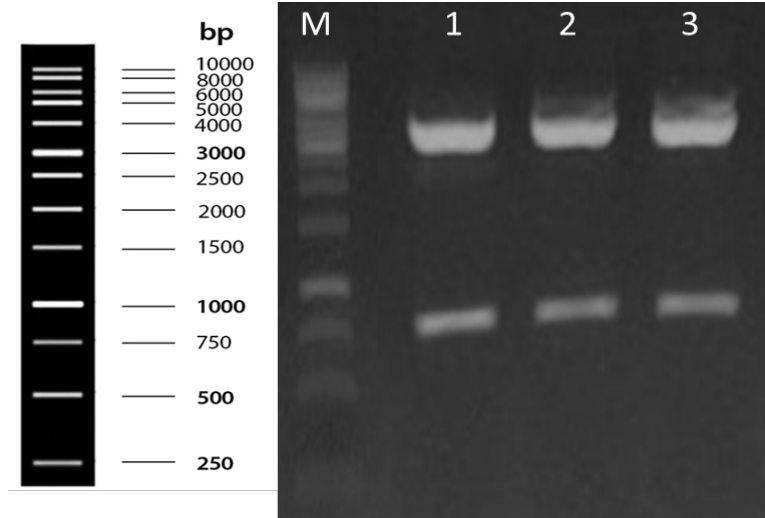
Şekil 3.1’de gösterildiği gibi 470 ve 390 bç promotor parçaları için uygun koşulların sağlandığı bir PZR gerçekleştirilmiştir. PZR ürünleri daha sonra jel elektroforezinde yürütülmüştür. UVP görüntüleme sistemi kullanarak sonuçlar görüntülenmiştir. Bu sayede gerekli olan amplifikasyonlar gerçekleştirilmiştir.

3.1.1.2 pGEMT-Easy Vektör Sistemine Klonlama

720, 470 ve 390 bç’lik insan ADAMTS14 promotor parçaları PZR yöntemi ile çoğaltıldığı agaroz jel elektroforez görüntülenmiştir. Daha sonra DNA parçaları Bölüm 2.2.4 anlatıldığı gibi jelden geri saflaştırılmıştır. DNA parçasından bir miktar yeniden jelde yürütülerek DNA geri kazanımının kontrolü yapılmıştır.

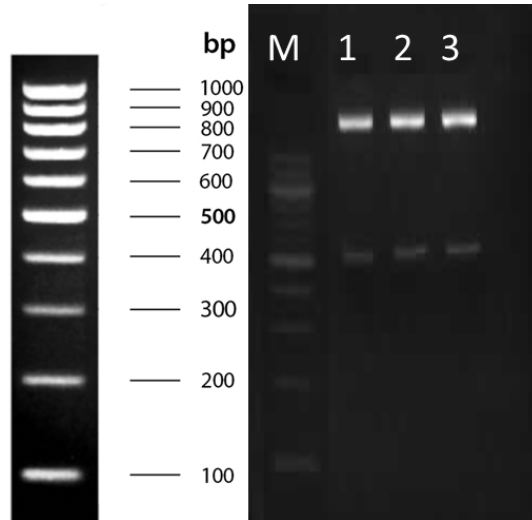
Daha sonra promotor parçalarının ligasyon çalışması Bölüm 2.2.5 ile anlatılana uygun olarak pGEMT-Easy vektörü içine T:A stratejisi ile klonlanmıştır. Bunun için Tablo 2.11 ile verilen koşullar uygulanmıştır. pGEMT-Easy vektörü içine ligasyon yapılan ligasyon ürünü hazırlanan JM109 alıcı hücreleri içine Bölüm 2.2.8 ile anlatılana uygun olarak transforme edilmiştir. Ampisilin antibiyotiği ile hazırlanan petrilere 40 µL X-Gal (stok 50 mg/mL) ve 40 µL IPTG (100 mM stok) eklenerek seleksiyonda mavi-beyaz koloni yöntemi

kullanılmıştır. Ertesi gün seçilen koloniler sıvı kùltüre ekildi ve plazmid izolasyonu Bölüm 2.2.10 da belirlediği gibi rekombinant kolonilerin tespiti amacıyla elde edilen plazmitler XhoI ve HindIII restriksiyon endonùkleaz enzimleri kullanılarak kesildi.



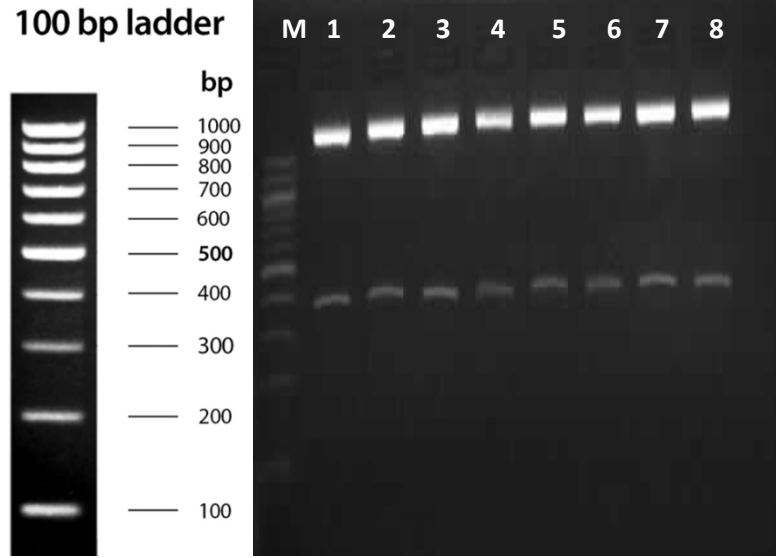
Şekil 3.2 : 720 bç promotor parçalarının pGEM-T Easy vektör sisteminde rekombinant görüntüsü

M : Marker 1Kb, 1-3 : 720 bç ADAMTS14 promotor parçasını içeren pGEM-T Easy vektörün restriksiyon enzimleri kullanılarak kesimi



Şekil 3.3 : 470 bç promotor parçasının pGEM-T Easy vektör sistemine rekombinant olduğunun gösterimi

M : Marker 100 bç, 1-3 : 470 bç ADAMTS14 promotor parçasını içeren pGEM-T Easy vektörün restriksiyon enzimleri kullanılarak kesimi

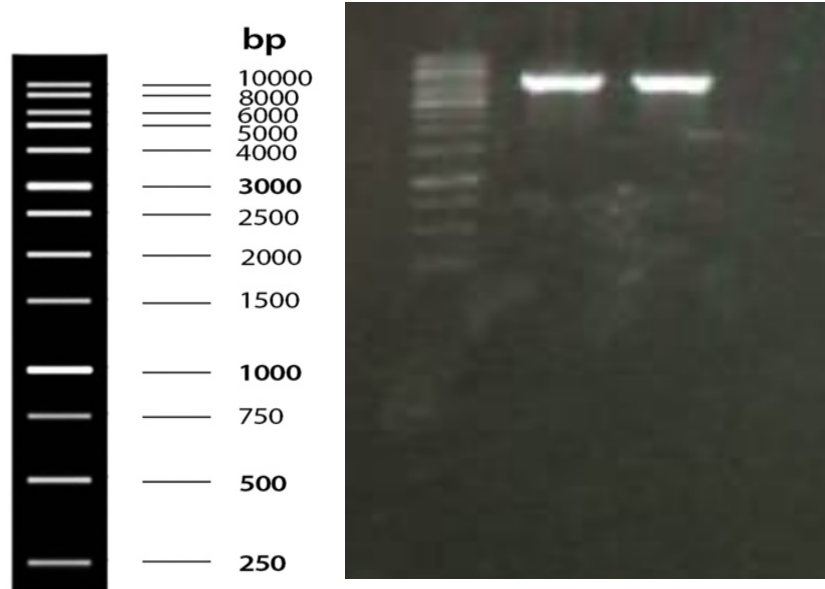


Şekil 3.4: 390 bç promotor parçasının pGEM-T Easy vektör sisteminde rekombinant olduğunun gösterimi

M : Marker 100 bç, **1-8 :** 390 bç ADAMTS14 promotor parçasını içeren pGEM-T Easy vektörün restriksiyon enzimleri kullanılarak kesimi

3.1.1.3 İnsan ADAMTS14 Promotor Parçalarının pMetLuc Haberci Vektörüne Alt Klonlama çalışmaları

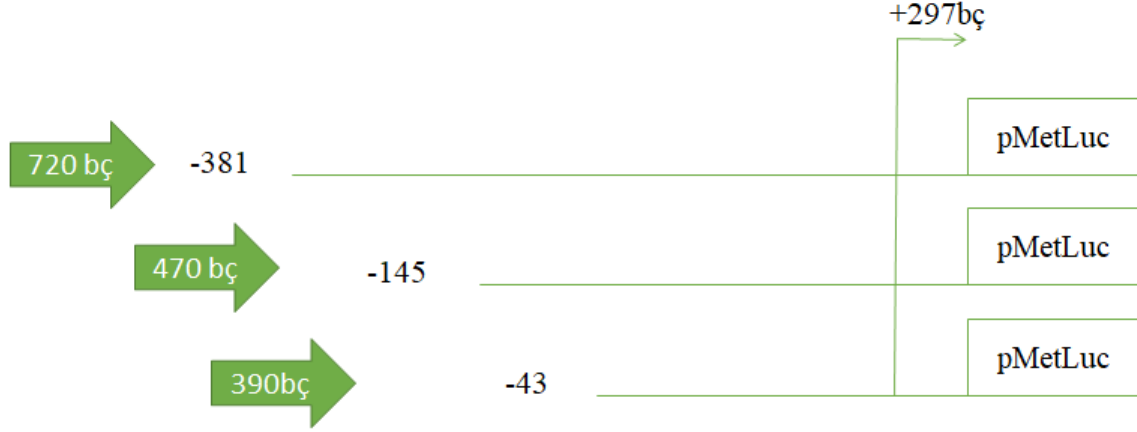
İnsan ADAMTS14 promotorunun transkripsiyonel aktivitesinin belirlenmesi için PCR ile klonlanan promotor parçalarının haberci vektör sistemine klonlanması aşamasına geçildi. Haberci vektör sistemi olarak pMetLuc vektör sistemi seçildi. Bu sistemin özelliği salınabilir lüsiferaz enzimi sentezleyebilmesidir (Haugwitz vd., 2008). pMetLuc vektörü, lüsiferaz enziminin lüminesan çıktısına dayalı olarak gen ifadesinin hassas ve kantitatif ölçümünü sağlar. Bu, canlı hücrelerde veya organizmalarda zaman içinde canlılıklarından veya işlevlerinden ödün vermeden uzunlamasına ve tekrarlanan gen ekspresyonu ölçümlerini mümkün kılar (Hall vd., 2012).



Şekil 3.5 pMetLuc vektör kesimi

PCR'a dayalı bir teknik kullanılarak pGEM-T Easy vektörüne klonlanan ADAMTS14 gen bölgesi XhoI/HindIII enzim çifti ile kesilmiştir. Ardından Bölüm 2.2.4'de açıklandığı şekilde jelden elde edilen ürünün geri kazanılması gerçekleştirilmiştir. Aynı zamanda XhoI/HindIII restriksiyon endonükleaz enzimleri kullanılarak pMetLuc haberci vektörü klonlama çalışması için doğrusal hale getirildi (Şekil 3.5). 5 µL pMetLuc haberci vektörü, 10X ligasyon tamponundan 2 µL (1X) ve 3 U/µL konsantrasyonda olan T4 DNA ligaz enziminden 2 µL ve insertten 12 µL eklenerek son hacmi 20 µL olan bir ligasyon reaksiyonu gerçekleştirildi. Bölüm 2.2.8 'da açıklandığı şekilde JM109 kompetan hücrelere transforme edildi ve ertesi gün seçilen koloniler sıvı kültüre ekildi. 16 saat sonra, plazmit izolasyonu Bölüm 2.2.10'de açıklandığı şekilde gerçekleştirildi. Rekombinant kolonilerin seçiminde XhoI/HindIII kesimi uygulanarak, Bölüm 2.2.9'de belirtilen koşullar kullanılmıştır.

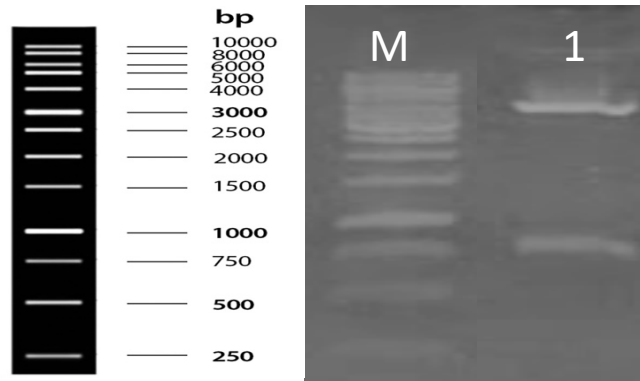
Bu işlemler sonucunda elde edilen ürünler agaroz jele yüklenip 90V 40dk süresince yürütülmüştür. Şekil 3.7, 3.8 ve 3.9 'de klonlanması istenen promotor parçalarının her birinin pMetLuc vektör sisteminde rekombinant olduğu gösterilmiştir.



Şekil 3.6: pMetLuc haberci vektörü içerisine klonlanarak oluşturulan 5'delesyon insan ADAMTS14 promotör parçalarının şematik gösterimi.

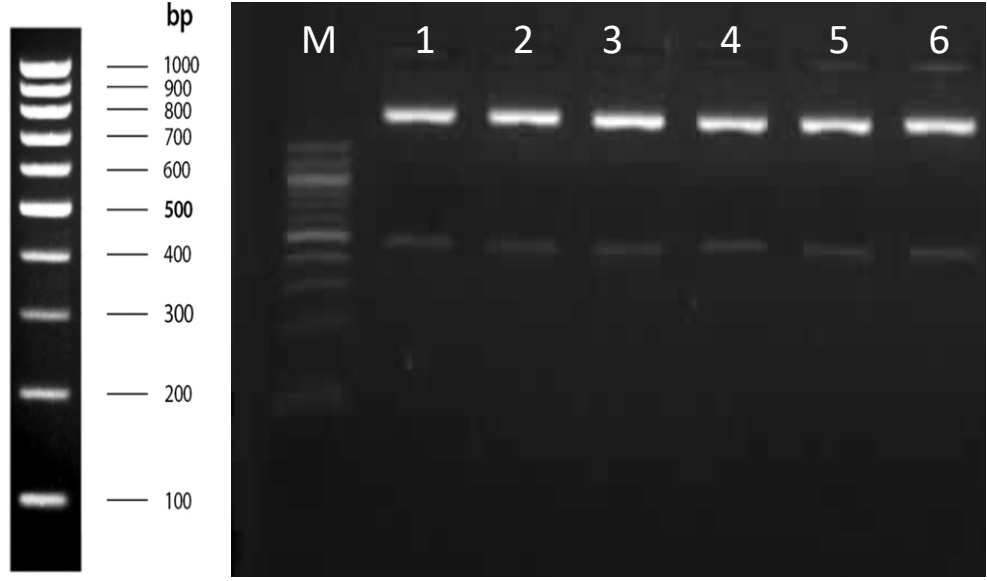
Bölüm 2.2.8 'da açıklandığı şekilde elde edilen klonlamalar öncelikle JM109 kompeten hücrelerine transforme edilmiştir. Ertesi gün seçilen kolonilerin sıvı kültüre ekimleri gerçekleştirilmiştir. 16 saat sonra plazmit izolasyonu Bölüm 2.2.10'de açıklandığı şekilde gerçekleştirilmiştir. Rekombinant kolonilerin seçiminde XhoI/HindIII enzimleri ile restriksiyon endonükleaz kesimi uygulanmış ve bunun için Bölüm 2.2.9'da belirtilen koşullar kullanılmıştır.

Restriksiyon kesiminin kontrolü için kesim ürünleri agaroz jele yüklenip yürütülmüştür. Şekil 3.7, 3.8 ve 3.9'da gösterildiği üzere promotör parçalarının pMetLuc vektör sisteminde rekombinant olduğu gösterilmiştir.



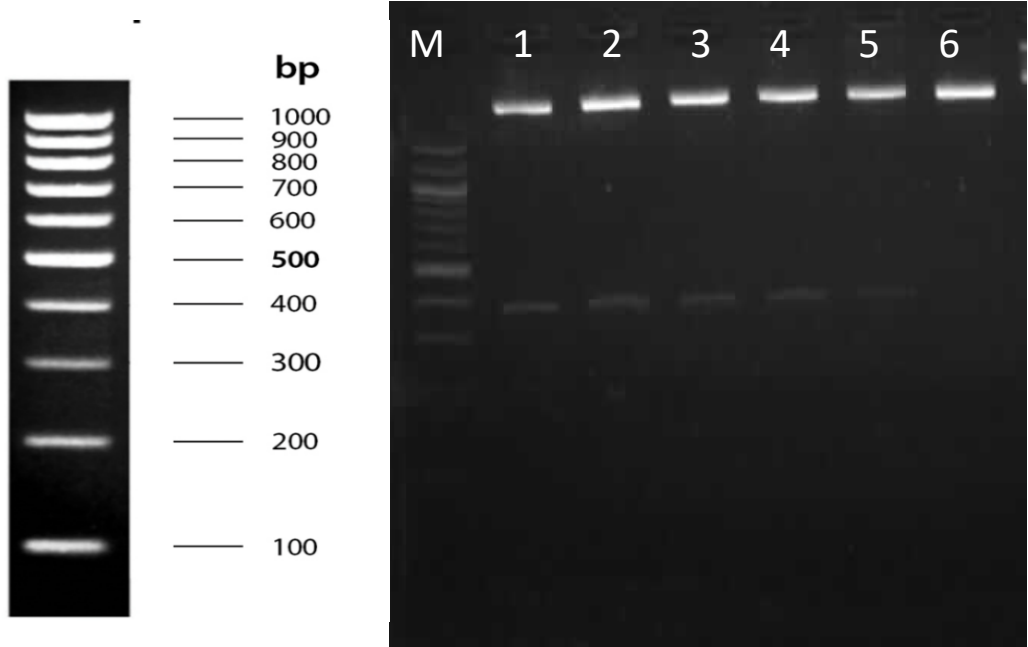
Şekil 3.7: 720 bç promotör parçasının pMetLuc vektör sisteminde rekombinant olduğunun gösterimi

M : Marker 1Kb, 1 : 720 bç ADAMTS14 promotör parçasını içeren pMetLuc vektörün restriksiyon enzimleri kullanılarak kesimi



Şekil 3.8 :470bç promotor parçasının pMetLuc vektör sisteminde rekombinant olduğunun gösterimi

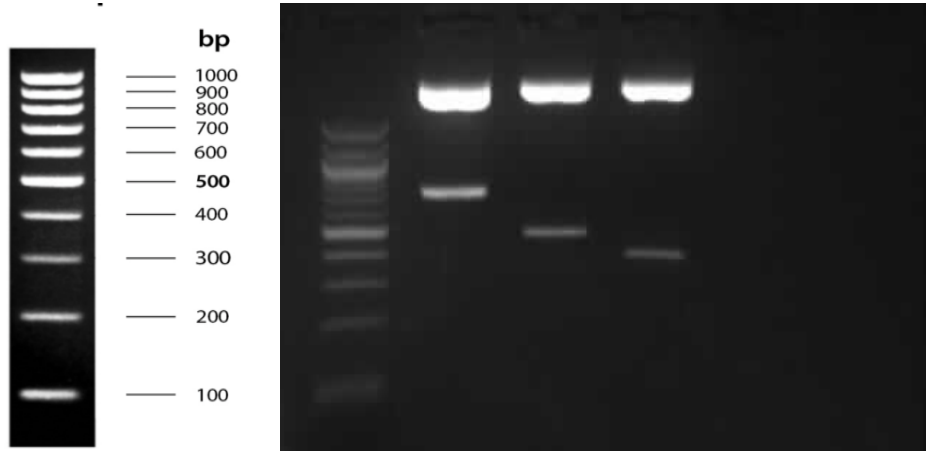
M : Marker 100 bç, 1-6 : 470 bç ADAMTS14 promotor parçasını içeren pMetLuc vektörün restriksiyon enzimleri kullanılarak kesimi



Şekil 3.9:390 bç promotor parçasının pMetLuc vektör sistemine recombinant olduğu göstermektedir.

M : Marker 100 bç, 1-6 : 390 bç ADAMTS14 promotor parçasını içeren pMetLuc vektörün restriksiyon enzimleri kullanılarak kesildi.

Rekombinant olduğu belirlenen her bir promotör konstrağı için transfeksiyon çalışmalarında kullanılmak üzere büyük ölçekli plazmit izolasyonları gerçekleştirilmiştir. Bunun için ilk olarak küçük ölçekli plazmit izolasyonları yapılmış olan her bir ADAMTS14 promotör parçasında ait gliserol stoklardan tek koloni ekimi gerçekleştirilmiştir. Büyümesi gerçekleşen bu kolonilerin (390bç, 470bç ve 720 bç promotör parçalarına ait) sıvı kültüre ekimleri gerçekleştirilmiştir. Büyük ölçekli plazmit DNA İzolasyonu Bölüm 2.2.11'de belirtildiği üzere yapılmıştır. Bu plazmit izolasyonunda oluşan son ürünleri kontrol etmek amacıyla klonlama stratejisinde kullanılan enzimler olan XhoI/HindIII ile restriksiyon kesimi Bölüm 2.2.9 'de anlatılana uygun olarak gerçekleştirilmiştir. Bu kesime ait olan agaroz jel görüntüsü Şekil 3.10 ile gösterilmiştir. Agaroz jel elektroforez sonucuna göre 390 bç, 470 bç ve 720 bç büyüklüğünde klonlanan üç parçanın da doğru şekilde bantlanmasının olduğu belirlenmiştir.



Şekil 3.10: 720 ,470, 390 bç promotör parçasının pMetLuc vektör sistemine recombinant olduğu göstermektedir.

M : Marker 100 bç, 1 : 720 bç, 2: 470 bç , 3: 390 bç ADAMTS14 promotör parçasını içeren pMetLuc vektörün restriksiyon enzimleri kullanılarak kesildi.

3.1.1.4 Dizi Analizi

ADAMTS14 genine ait promotör parçalarının doğru şekilde ifade olması için klonlama sırasında nükleotitlerin hata içermeyen klonlanmış olması hem de klonlanan vektörlere doğru yönde yerleşim yapması gerekmektedir. Aksi bir durumda ileri çalışmalarda mRNA düzeyi ve/veya protein düzeyi ifadelerinde hatalı sonuçlara neden olur. Bu nedenle klonlama çalışmalarında dizi analizi sonuçlarının doğrulanması ve kontrolü önemlidir. Bu tez

kapsamında çalışılan ADAMTS14 promotor parçalarının hem pGemT-Easy hem de pMetLuc klonlamaları sonrasında dizi analizine gönderim yapılmıştır.

```

ADAMTS14 4 GGGAGTCTCCCTCTACCGGAGGTTCACTGTCCACCACACTCCCAAATGCAGCCGGAC 63
|
|
|
NCBIseq 680 GGGAGTCTCCCTCTACCGGAGGTTCACTGTCCACCACACTCCCAAATGCAGCCGGAC 737

ADAMTS14 64 ACCCCTTGGGCTCCTGGCTCTGGAACAGAAACAGAGAGCAGGCCCTGCGCCAAGAAAGG 123
|
|
|
NCBIseq 738 ACCCCTTGGGCTCCTGGCTCTGGAACAGAAACAGAGAGCAGGCCCTGCGCCAAGAAAGG 797

ADAMTS14 124 GGGCGAGCAGCCATAGAAAGCGGCTTTGGGCCACCACTCCGGGGATCCAGCGCTCTGA 183
|
|
|
NCBIseq 798 GGGCGAGCAGCCATAGAAAGCGGCTTTGGGCCACCACTCCGGGGATCCAGCGCTCTGA 857

ADAMTS14 184 GGGGACAATCGGTCCGTGCGCCAGGAACCCCTGCTCTGTCTCCGCGTGGCACTTCCGATC 243
|
|
|
NCBIseq 858 GGGGACAATCGGTCCGTGCGCCAGGAACCCCTGCTCTGTCTCCGCGTGGCACTTCCGATC 917

ADAMTS14 244 CCCGGCCGAGGAGCTGCACTCCCAGCCGCGCGCCCGCCCGGGCGTCCGGCGCCC 303
|
|
|
NCBIseq 918 CCCGGCCGAGGAGCTGCACTCCCAGCCGCGCGCCCGCCCGGGCGTCCGGCGCCC 977

ADAMTS14 304 CAGCTCCGACCCGCGCCCGCCCGCCCGCCAGTGTGCCACCCCGCCCGTCCCGC 363
|
|
|
NCBIseq 978 CAGCTCCGACCCGCGCCCGCCCGCCCGCCAGTGTGCCACCCCGCCCGTCCCGC 1037

ADAMTS14 364 CGCCCGTCGCCCCGCTCCCGGAGTCCCGGAGCGTCACTGCGCGGGCGGGTGACCGA 423
|
|
|
NCBIseq 1038 CGCCCGTCGCCCCGCTCCCGGAGTCCCGGAGCGTCACTGCGCGGGCGGGTGACCGA 1097

ADAMTS14 424 CCAGCCGGCAGTTGGCACCGGGGCGCTGGCGCGTCAGTGGCCCGCTCTCCAGCCGGCA 483
|
|
|
NCBIseq 1098 CCAGCCGGCAGTTGGCACCGGGTGCCTGGCGCGTCAGTGGCCCGCTCTCCAGCCGGCA 1157

ADAMTS14 484 GCCTCGCGCGCCCGGAGCCAGCGGTCCAGGCGGGCGCGCCGCGAGGGGACCCGGAGCAG 543
|
|
|
NCBIseq 1158 GCCTCGCGCGCCCGGAGCCAGCGGTCCAGGCGGGCGCGCCGCGAGGGGACCCGGAGCAG 1217

ADAMTS14 544 GCGGAGGGAAGCAGCTAGGCGGGGAGGCGGCTGAGGCGGCAGCGGCGGCAGCCAGCCGG 603
|
|
|
NCBIseq 1218 GCGGAGGGAAGCAGCTAGGCGGGGAGGCGGCTGAGGCGGCAGCGGCGGCAGCCAGCCGG 1277

ADAMTS14 604 TGCTCCGACTGCCCGGGCGCACCTAGCCTCCAGCCCTCAGCCTGGGACTTGGGGATC 663
|
|
|
NCBIseq 1278 TGCTCCGACAGCCCGGGCGCACCTAGCCTCCAGCCCTCAGCCTGGGACTTGGGGATC 1337

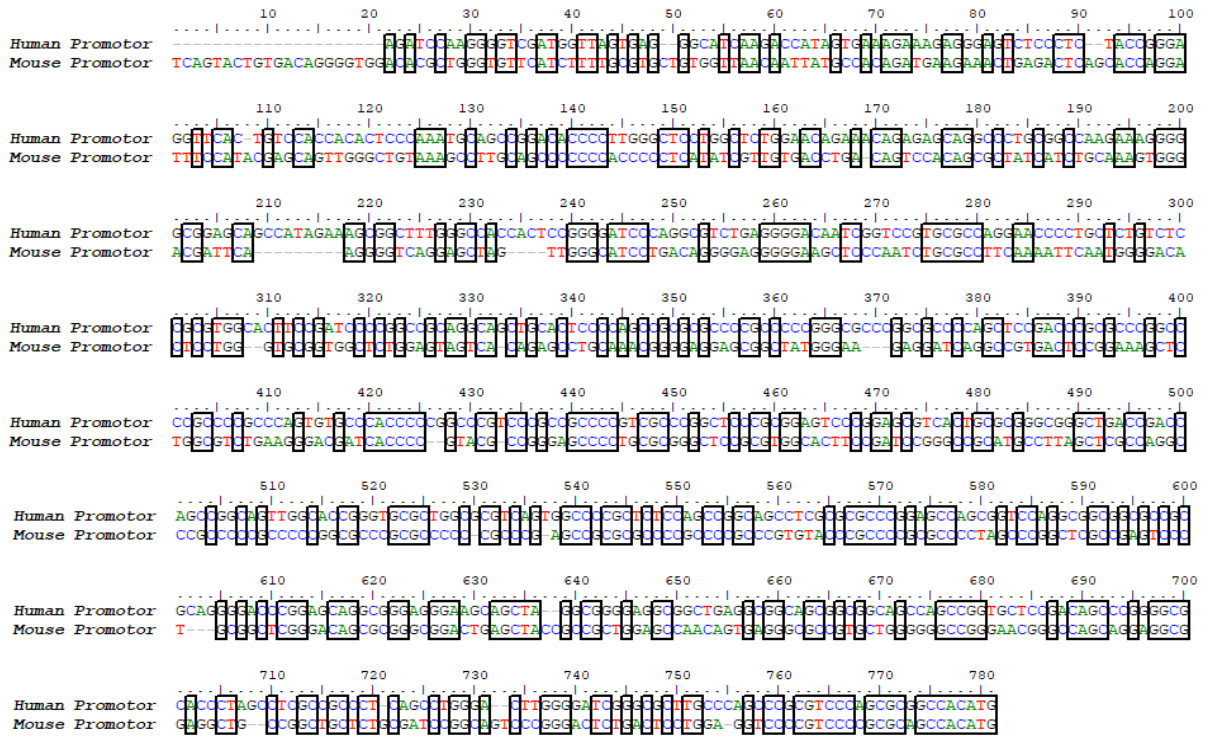
ADAMTS14 664 GGGTGTCTGCCAGCCG 681
|
|
|
NCBIseq 1338 GGGCGCTTGCCAGCCG 1355

```

Şekil 3.11: ADAMTS14 promotor bölgesi için blast analizi

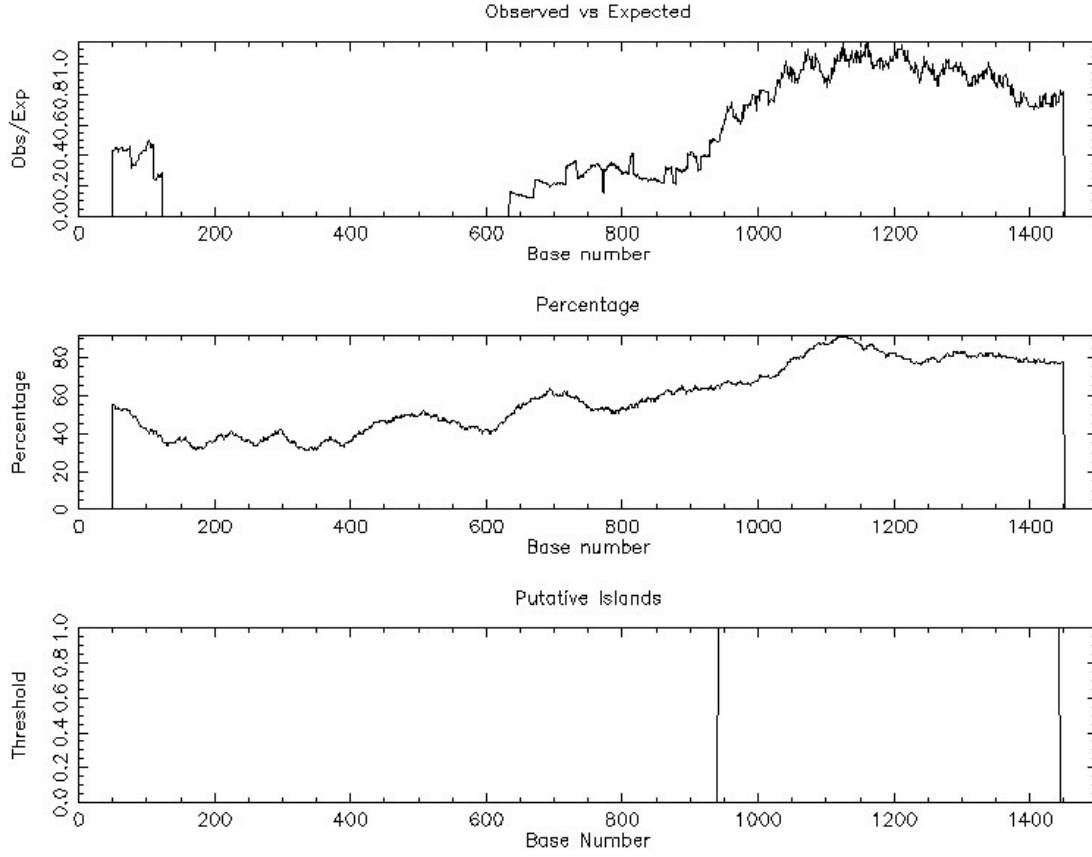
En büyük insan ADAMTS14 promotor parçası ve NCBI data bankasında bulunan genomik dizi NCBI-blast programı kullanılarak karşılaştırıldı.

Şekil 3.11 ile gösterilen dizi analizi sonucu elde edilen veriler NCBI blast data bankasında bulunan dizi kullanılarak analiz edildiğinde hem ADAMTS14 geninin ATG kodonuna kadar olan (+1....+278bç) 5'UTR bölgesine hem de kromozom 10'da +1'den -381 bç'ye kadar olan bölgeye bağlandığını tespit ettik.



Şekil 3.12: İnsan ve fare için ADAMTS14 promotorlarının karşılaştırması

Şekil 3.12 ile gösterildiği gibi insan promotoru ile fare promotoru ile karşılaştırılmış, sonuç olarak ikisi arasında önemli farklılıklar ortaya çıkarılmıştır. Promotor bölgelerde gözlemlenen farklılıklar, her bir türe özgü seçici baskıları ve fonksiyonel gereksinimleri yansıtabilir. İnsan ve fare arasındaki promotor bölgelerindeki farklılıklar, transkripsiyon faktörleri, güçlendirici elementler veya gen ekspresyonunun kontrolünde önemli roller oynayan diğer düzenleyici elementler için bağlanma yerlerinde farklılıklar olabileceğini düşündürmektedir. İnsan ve fare promotorları arasındaki bu farklılıkları anlamak, gen düzenlemesinin altında yatan moleküler mekanizmalar ve genetik varyasyonların işlevsel sonuçları hakkında bilgi edinmek için gereklidir.



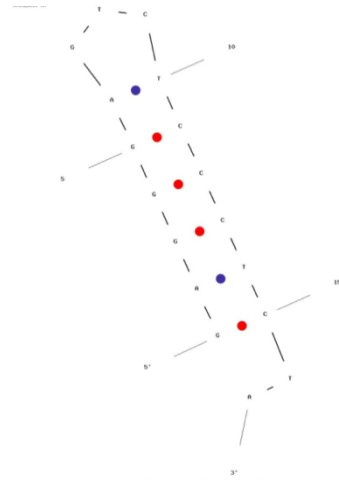
Şekil 3.13: İnsan ADAMTS14 promotor bölgesinin % guanin sitozin içeriğinin gösterilmesi

GC adı verilen guanin-sitozin dinükleotidlerinin yüksek frekansına sahip DNA bölgeleri genlerin destekleyici bölgelerinde bulunur. GC adalarını tanımlayarak, gen ifadesini kontrol eden potansiyel düzenleyici unsurlar hakkında bilgi edinebiliriz. Gen promotorlarındaki GC adalarını iyi tespit etmek, gen regülasyonunu anlamak, transkripsiyon başlangıç bölgelerini belirlemek, epigenetik modifikasyonları incelemek için önemlidir. Gen promotorlarında GC adalarının saptanması, transkripsiyonun başladığı kesin konumları belirlememize yardımcı olur. Gen yapısı ve ekspresyonu hakkında değerli bilgiler sağlar.

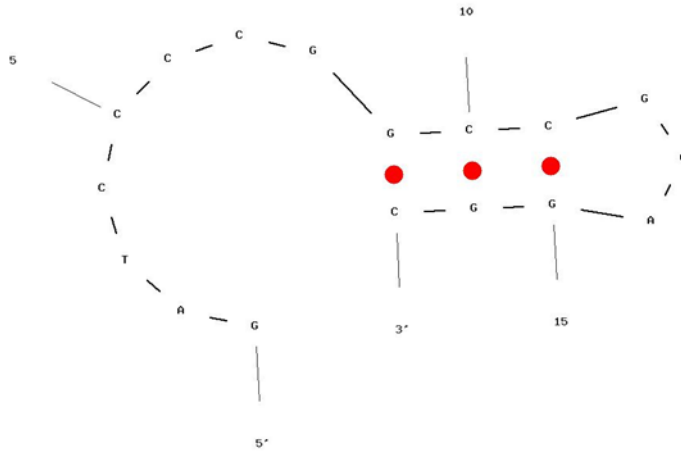


Şekil 3.14: İnsan ADAMTS14 promotor bölgesine bağlanan muhtemel transkripsiyon faktörü şematik gösterimi.

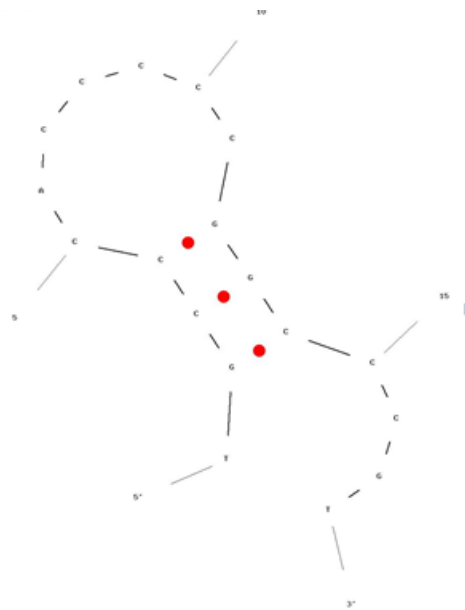
ADAMTS14 promotoru guanin sitozince (GC) oldukça zengin ve TATA kutusu olmayan bir promotor bölgesidir. Bu diziler arasında SP1/GC kutusu motifleri de önemli rol oynarlar. ADAMTS14 promotoruna bağlanan muhtemel transkripsiyon faktörleri. <https://epd.epfl.ch/> kullanılarak analiz edilmiştir ve Şekil 3.14 ile gösterilen transkripsiyon faktörlerinin buraya bağlandığı bulunmuştur.



Şekil 3.15 : ADAMTS14 Promotorunun 720 bp primerinin saç tokası yapısı.



Şekil 3.16 : ADAMTS14 Promotörünün 470 bp primerinin saç tokası yapısı

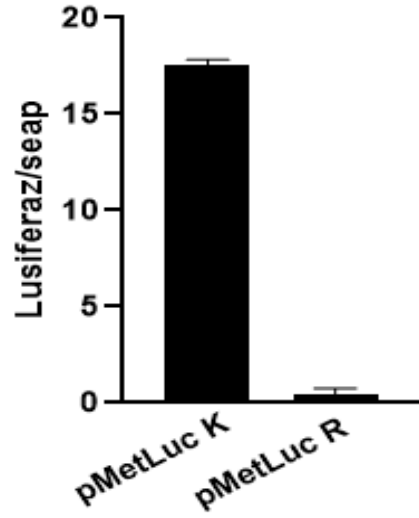


Şekil 3.17 : ADAMTS14 Promotorunun 390 bp primerinin saç tokası yapısı.

3.1.1.5 Bazal Promotor Aktivitesinin Belirlenmesi

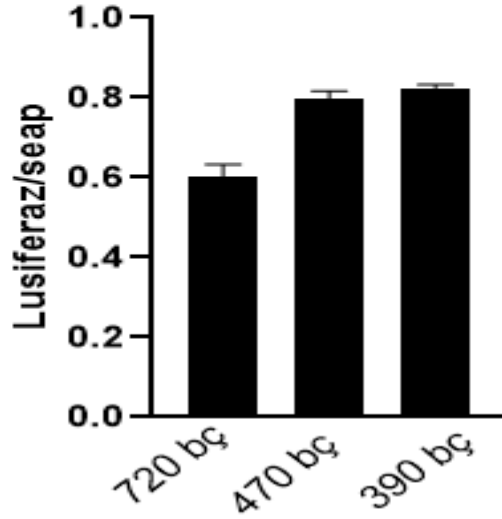
İnsan ADAMTS14 genine ait 720,470,390bp promotor parçalarının bazal aktivitelerinin belirlenmesi için Salınan Sistem Lusiferaz Metodu kullanıldı. Bu protokol Bölüm 2.3.8'de anlatıldığı gibi yapıldı. Transfeksiyonda model hücre olarak SW480 hücreleri kullanıldı. Bu hücre hattının seçilmesinin nedeni ADAMTS14 ifadesi için yapılan analizler sonucunda SW480 hücre hattında genin en iyi ifadesinin olduğu belirlenmiştir. Ayrıca kalsiyum fosfat metodu ile transfeksiyon metodu bu hücrelerde laboratuvarımızda başarıyla uygulanabilir durumdadır. Transfeksiyon deneyi 12 kuyucuklu plakalarda gerçekleştirildi. Transfeksiyon analizinde pMetLuc vektörüne klonlanmış promotor parçalarının yanı sıra, transfeksiyon etkinliğinin her kuyuda tespiti için normalizatör olarak kullandığımız (0,5 µg) SEAP ekspresyon vektörü de hücrelere verildi. Ayrıca hücrelerde genel transfeksiyon durumunun tespiti için çok güçlü viral promotor ile ifade olan pMetLuc kontrol plasmiti de transfekte edildi. Aynı zamanda hiçbir promotor içermeyen pMetLuc reporter vektörü de arka plan olarak negatif kontrol olması açısından kullanıldı. (Tüm deneyler 6 tekrarlı olarak kuruldu. 48 ,72 saat diliminde 100 µL medyum alınarak -20°C'de muhafaza edildi. Bölüm 2.3.8 'de belirtildiği üzere lusiferaz ve seap aktiviteleri belirlendi. Sonuçlar luminometrede okutuldu. Lusiferaz aktivitesinin seap aktivitesine bölünmesiyle relatif lusiferaz aktivitesi belirlendi

pMetLuc Kontrol ve Reporter vektörleri 48 saat



Şekil 3.18 : pMetLuc kontrol vektörünün 48 saat lusiferaz sonuçları

Promotor Parçaları 48 saat

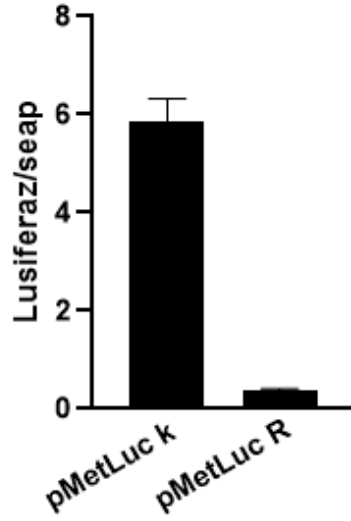


Şekil 3.19: Promotor parçalarının 48 saat bazal aktivitelerinin istatistiksel analizi.

Şekil 3.18 'deki gibi 48 saatte pMetLuc kontrolünün aktivitesinin pMetLuc raportöre göre yüksek etkinlikte olması transfeksiyonun geçerliliğini sağlamaktadır. Promotor parçalarının lusiferaz aktiviteleri Şekil 3.19 ile gösterilmiştir. Buna göre promotör parçalarının lusiferaz

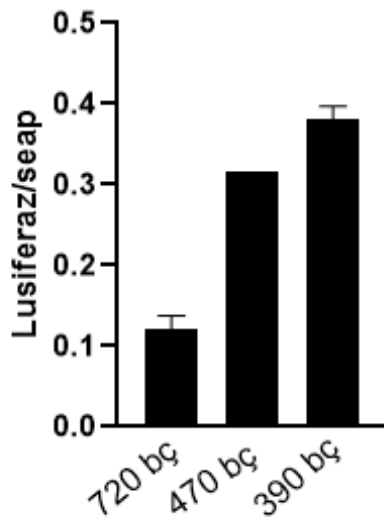
aktivitesiyle karşılaştırıldığında promotörün en küçük parçası olan 390 bç diğer iki parçaya göre en aktif olanıdır.

pMetLuc Kontrol ve Reporter vektörleri 72 saat



Şekil 3.20 : pMetLuc kontrol vektörünün 72 saat lusiferaz sonuçları

Promotor Parçaları 72 saat



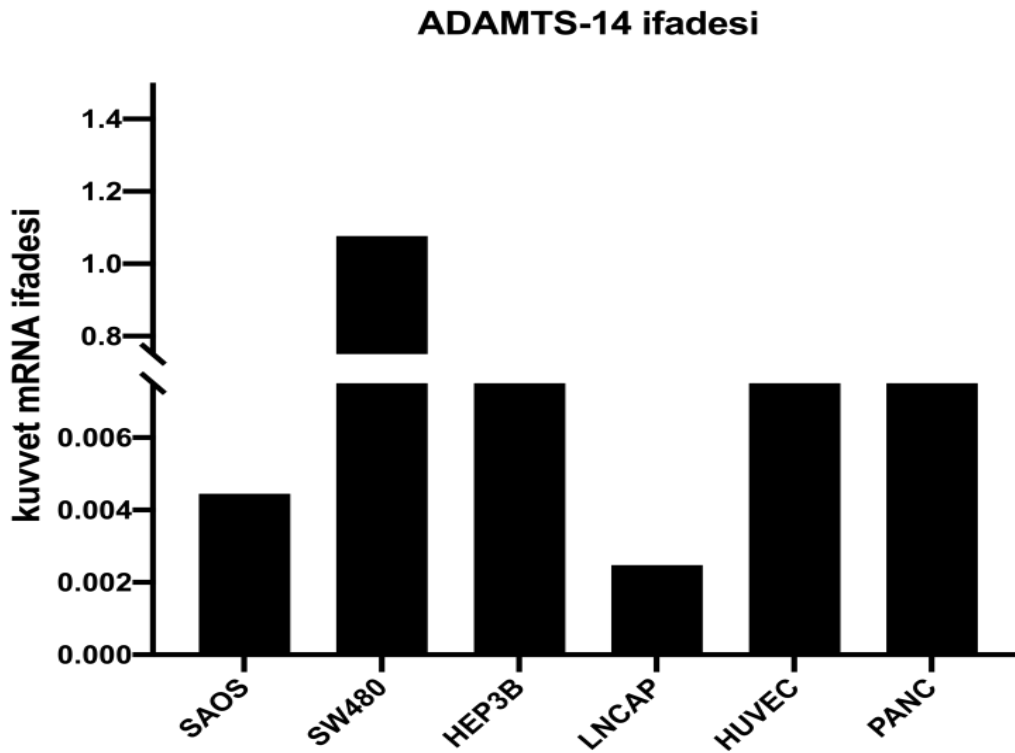
Şekil 3.21: Promotor parçalarının 72 saat bazal aktivitelerinin istatistiksel analizi

72 saat lusiferaz aktivitesinin değerlendirmesi yapıldığında, 48 saatteki aktiviteye kıyasla hem pMetLuc kontrol ve pMetLuc reporter hem de üç parçanın her birinin aktivitesinde bir düşüş gösterdiği belirlenmiştir.

3.2 Hücre Kültürü Çalışmaları

3.2.1 Farklı hücre hatlarında ADAMTS14 ifadesinin belirlenmesi

Farklı hücre hatında ADAMTS14 ifadesinin belirlenmek amacıyla ADAMTS14 Eksipresyon primerleri kullanarak Saos-2, SW480, PC3, LnCAP, HUVEC ile gerçek zamanlı PZR Tablo 2.15 ve 2.16 ile gösterildiği gibi gerçekleştirilmiştir. Buna göre en fazla ifadenin SW480 hücre hattında olduğu belirlenmiştir.

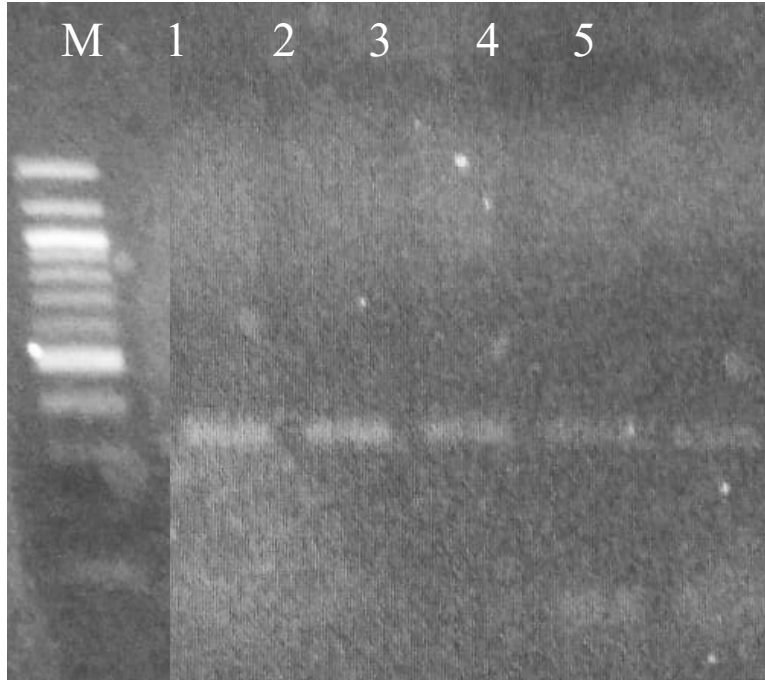


Şekil 3.22 : ADAMTS14 farklı hücre hatında ifadesinin Real Time PZR ile gösterilmesi

3.2.2 Sitokin Uygulanması

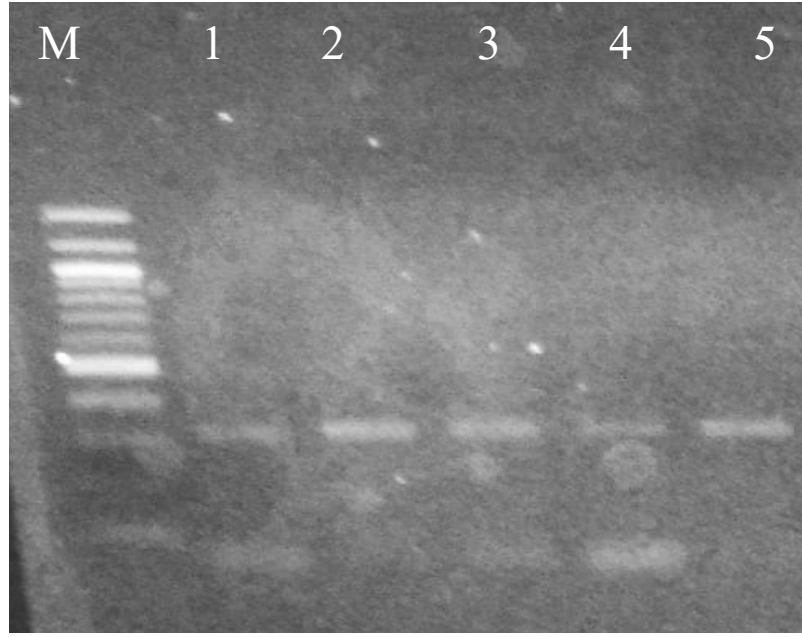
3.2.2.1 SW408 Hücre Modelinde IL-6 Sitokininin Etkilerinin mRNA Seviyesinde Gösterilmesi

IL-6 sitokininin ADAMTS14 geninin ekspresyonuna etkisini belirlemek için, ilk olarak hücreler 25 cm² flask yüzeyini % 90 kaplayıncaya kadar büyütüldü. 25 cm² flasklar içerisinde 2.000.000 hücre olacak şekilde kullanıldı. IL-6 sitokini 20 ve 40 ng olacak şekilde uygulandı. Sitokin uygulamadığımız hücre grubu kontrol olarak adlandırıldı. Sitokin uygulanmış olan hücreler 1, 3, 6, 24 ve 72. zaman dilimleri sonucunda Tripsin-EDTA kullanılarak uzaklaştırıldı. Ardından 5 dk süresince 1000 rpm'de santrifüjlenerek çöktürüldü. Elde edilen pelletlerden Fermentas RNA izolasyonu kitinin önerdiği şekilde RNA izolasyonu yapıldı. 1µg total RNA'dan Fermentas cDNA sentez kitininTM önerdiği ve Bölüm 2.4.3'da anlatılana uygun olarak cDNA eldesi gerçekleştirildi. cDNA kalıp olarak kullanılarak ADAMTS14 geninin ekspresyon primerleri ile gerçek zamanlı qRT-PCR yapıldı. Aynı zamanda normalizasyon amaçlı insan β-2 mikroglobulin primerleri kullanıldı. Elde edilen Ct değerleri ΔΔct metodu ile analiz edildi.



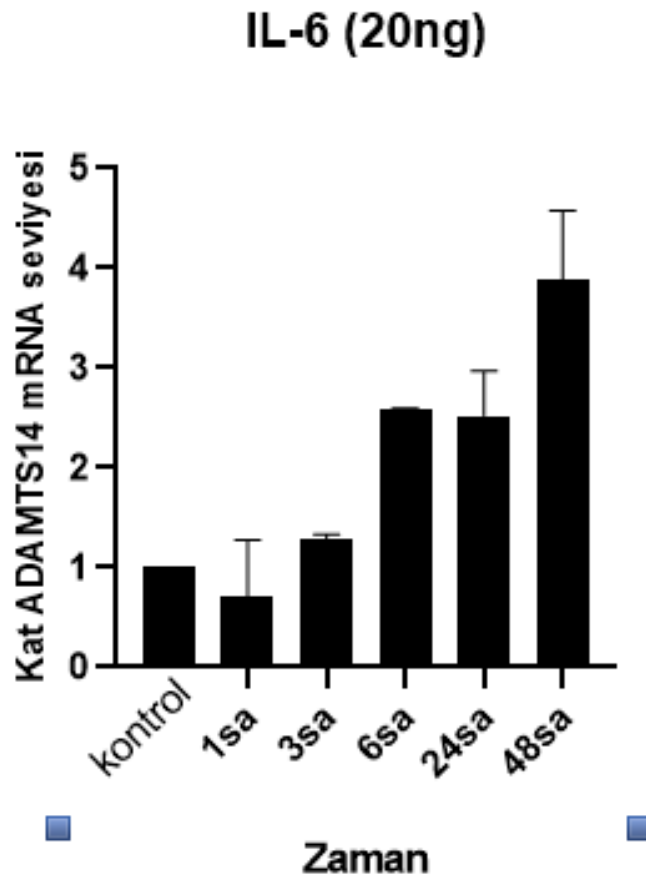
Şekil 3.23: SW480 hücre hattında 40ng IL-6 uygulanan kontrol PZR

M : Marker 100 bp, 1:1saat IL-, 2:3saat IL-6, 3: 6saat IL-6, 4: 24saat IL-6 ,5: 48saat IL-6



Şekil 3.24: SW480 hücre hatında 20ng IL-6 uygulanan kontrol PZR

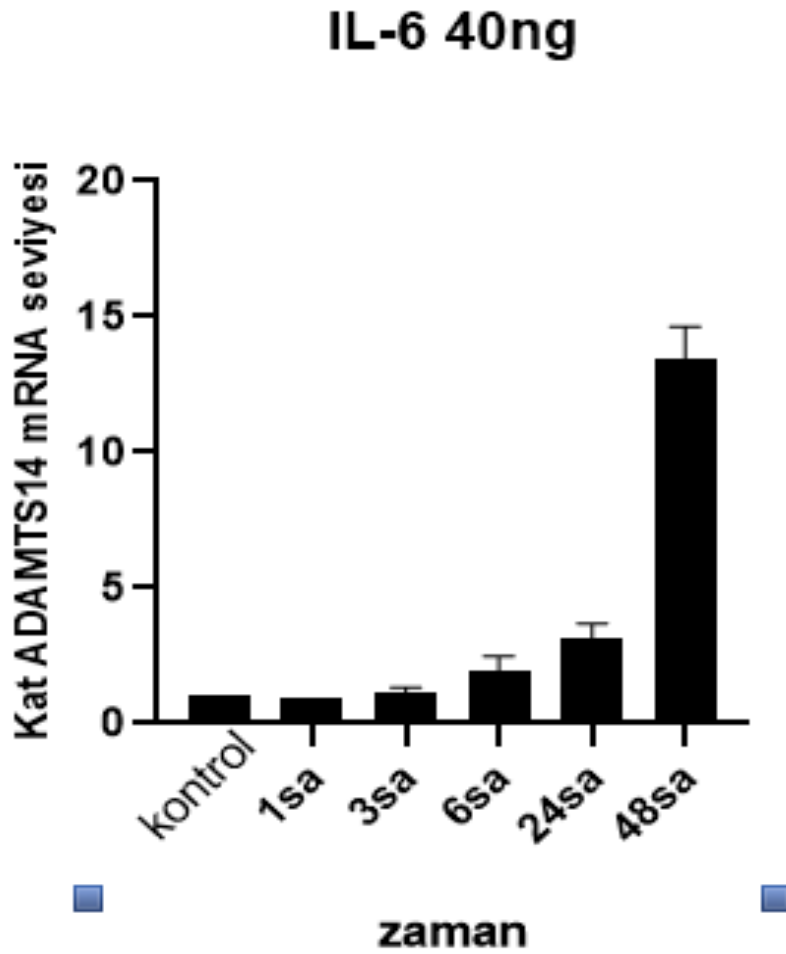
M : marker 100 bp, 1:1saat IL-6, 2: 3saat IL-6, 3: 6saat IL-6, 4: 24saat IL-6, 5: 48saat IL-6



Şekil 3.25: SW480hücre hattında 20ng IL-6 uygulanan qRT-PZR

IL-6 uygulanmış olan SW480 hücre hattında ADAMTS14 gen ifadesi incelendiği zaman 20ng ve 40ng uygulamalarda farklılıklar olduğu görülmektedir.

20ng uygulandığı zaman 1. saatte ADAMTS14 gen ifadesi kontrolden az olduğu gösterilmiştir. 3. ve 6. saatlerde ise ifade seviyesi mRNA kat düzeyinde yükselmeye başlamış ve 48. saatte belirgin bir artış kaydedilmiştir.



Şekil 3.26: SW480 hücre hattında 40ng IL-6 uygulanan qRT PZR

SW480 hücrelerine IL-6 sitokini 40ng dozunda uygulandığı zaman ise 1. saatte ADAMTS14 gen ifadesinin kontrolden daha az olduğu ve 3.,6. ve 24. saatlerde ise kademeli olarak artmaya başladığı ve 48 saatte yüksek bir artış kaydettiği belirlenmiştir.

4 TARTIŞMA

Matris metalloproteinazlar ile yakından ilişkili olan ADAMTS'lerin, tümörlerin ortaya çıkması, gelişmesi ve metastazında vazgeçilmez bir rol oynadığını ortaya koymuştur. Bu proteinaz molekülleri, ECM'nin yeniden modellenmesi, zara bağlı proteinlerin dökülmesi, hücrel adezyon, hücrel füzyon, hücrel istila, proteoliz ve kataliz gibi çok çeşitli biyolojik davranışlarda yer almaktadır. Bugüne kadar insanlarda 19 ADAMTS ailesi üyesi tanımlanmıştır. ADAMTS14, 2002 yılında insan kromozomu 10q22.1'de bulunan ve ECM'nin birleştirilmesi ve bozulmasında önemli bir rol oynayan bir proteinazı kodlayan bir gen olarak literatüre kazandırılmıştır. ADAMTS14'ün anormal ekspresyonunun, hücre proliferasyonu ve metastazı dahil olmak üzere tümör hücresi davranışlarını etkilediğine daha fazla dikkat çekilmiştir (Al Nakouzi vd., 2012).

ADAMTS14, dört trombospondin modülü içeren ADAMTS'lerin karakteristik çok alanlı yapısını sergiler ve ADAMTS2 ve ADAMTS3'e oldukça benzerdir. ADAMTS2 ve ADAMTS3 kollajen işleyen enzimler olduğundan, ADAMTS14'ün de benzer bir işleve sahip olabileceği düşünülmektedir (Mochizuki.,2007). ADAMTS14'ün tümörjenezdeki kesin mekanizmaları hala tam olarak anlaşılammıştır, ancak önceki çalışmalar ADAMTS14'ün ağırlıklı olarak prostat kanserinde eksprese edildiğini ve tümörjenez ve kanser metastazını kolaylaştıran tümör mikroçevresini etkileyebileceğini göstermiştir. Ancak farklı olarak ADAMTS14 geni, kanser hücresi proliferasyonunu ve apoptozu düzenleyerek hepatoselüler karsinomun ilerlemesini baskılamıştır. Bu nedenle, ADAMTS14'ün farklı tümörlerde farklı roller oynayabildiği görülmüştür. (Song vd.,2019; Wang vd., 2022).

Yueh-Min Lin ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada immünohistokimyasal analizler ile 250 OSCC doku örneğini analiz ettikten sonra, ADAMTS14 proteinlerinin sitoplazmik ekspresyonunun OSCC dokularında normal oral mukoza kontrol dokularına göre önemli ölçüde daha düşük olduğunu bulmuşlardır. ADAMTS14'ün negatif sitoplazmik ekspresyonunun lenf düğümü metastazı ile önemli ölçüde ilişkili olduğunu ortaya koyduğunu gösterir. ADAMTS14'ün aşağı regülasyonu, zayıf klinikopatolojik özelliklerle ilişkilidir. ADAMTS14'ün OSCC teşhisi için yeni bir biyobelirteç olarak kullanılabilceğini

ve gelecekte OSCC tedavisi için yararlı bir hedef olarak hizmet edebileceğini öne süren güçlü ön kanıtlar sunmaktadır (Lin vd. 2020).

Öte yandan Sheu ve arkadaşları, ADAMTS14 genetik polimorfizminin ve sigara içiminin hepatoselüler karsinomun klinikopatolojik gelişimi üzerindeki etkilerini araştırmışlardır. ADAMTS14'ün genetik varyantlarının, sigara içme davranışları olan lokalize HCC hastalarında klinik sonuçları etkileyebileceğini varsaymaktadır. ADAMTS14'ün genetik varyantlarının, sigara içme davranışları olan lokalize HCC hastalarında klinik sonuçları etkileyebileceğini varsayılmaktadır (Sheu vd. 2017).

OA ile ilişkili genler, hücre dışı matris (ECM) ve diğerleri dahil olmak üzere birçok moleküler yola kategorize edildi. Osteoartrit eklem, kıkırdak yıkımına yol açan ECM'nin sentezi ve yıkımı arasında bir dengesizliğe sahiptir. Bu nedenle, metalloproteinazlar, bu OA özelliğinden sorumlu ana enzim grupları olarak kabul edilmiştir (Kivorkian vd., 2004). Bu nedenle, bazı çalışmalar osteoporoz ve ADAMTS, özellikle ADAMTS 14 arasında bir ilişki olduğunu göstermiştir. 10q22.1 kromozomunda bulunan ADAMTS14'ün yakın zamanda yeni bir OA aday geni olduğu bildirilmiştir (Rodriguez vd., 2009). ADAMTS14'ün 21. eksonunda (rs4747096) olası zararlı etkiye sahip eşanlamlı olmayan bir tek nükleotid polimorfizminin (nsSNP) diz OA'sı ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Rodriguez vd., 2009) ve bu enzimlerin, prokollajen tip I'in N-propeptitlerini (PNPI aktivitesi) ve homotrimerik prokollajen tip II'yi kollajen liflerine dahil edilmeden önce parçalama yeteneğine sahip olduğuna dair kanıtlar vardır (Hojima vd., 1989, 1994). Birkaç çalışma, yakın zamanda keşfedilen bir aday OA geni olan ADAMTS14'te rs4747096 nsSNP ilişkisini değerlendirmiştir. Bu nsSNP'nin, ADAMTS14 proteininin COOH-terminal alanında glutamik asidin (GAA) glisine (GGA) değişimini gösterdiği bulundu. ADAMTS14'te (E1049G) glutamik asidin (asidik) glisine (polar olmayan) ikame edilmesinin, proteinin kollajen öncüsünü işlemede anormal yeteneğe ve nihayetinde OA'ya yol açabileceğine inanılıyordu (Poonpet vd., 2013) (Le Goff vd., 2006). Ek olarak, osteoartrit fenotiplerini ve tümör mikroçevresini etkilemek için ADAMTS14 proteazlarındaki eşanlamlı olmayan tek nükleotid polimorfizmlerinin (nsSNP'ler) genetik birlikteliği bildirilmiştir (Bruni vd. 2011)(Sheu vd. 2017)

Renal hücreli kanser ile ADAMTS 14 arasındaki ilişkiyi biyobelirteç gibi çeşitli testler ve immünoterapinin bağışıklık tepkilerini tahmin etmek için ADAMTS14 kullanımı kullanarak değerlendirmek için çeşitli çalışmalar yapılmıştır. ADAMTS14 ile ilgili sinyal yollarını ve biyolojik işlevi tanımlamak için gen seti zenginleştirme analizi (GSEA) yapıldı. Potansiyel mekanizmaları açısından, LncRNA/RNA bağlayıcı protein (RBP)/ADAMTS14 mRNA ağları Çalışma, ADAMTS14'ün ccRCC tümör dokularında bitişik normal doku örneklerine kıyasla daha yüksek ekspresyon gösterdiğini gösterdi, Ayrıca ADAMTS14 mRNA ekspresyonunun önemli ölçüde ilişkili olduğu da ortaya çıktı. ADAMTS14'ün ccRCC için bağımsız bir prognostik faktör olabileceği kaydedilmiştir. (Li vd., 2022)

Yan Wang ve diğerleri tarafından yapılan bir çalışma ADAMTS14'ün, CRC'de düşük ekspresyon ile birlikte yüksek oranda metillendiğini ortaya çıkardı. ADAMTS14'ün yıkılmasının SW480 ve SW620'nin hücre apoptozunu baskıladığını gösterdi. Ek olarak, ADAMTS14 aşırı ekspresyonu, açıkça RKO ve DLD1'in hücre apoptozunu destekleyebilir. ADAMTS14'ün hücre yaşayabilirliğindeki rolünü açıklığa kavuşturmak için CCK-8 deneyleri yapıldı ve sonuçlar, susturulmuş ADAMTS14 hücrelerinin çoğalma oranının kontrol hücrelerinden daha yüksek olduğunu gösterdi. ADAMTS14'ün immünohistokimya (IHC) ile doğrulanan ekspresyon paterni, bunun ağırlıklı olarak sitoplazma ve plazma zarında bulunduğunu öne sürdü. ADAMTS14 yüksek ekspresyon grubu, kanser dokusunda ADAMTS14 ekspresyon seviyesinin komşu normal mukozadan daha yüksek olduğu vakalar olarak tanımlandı. Kaplan-meier sağkalım analizi, yüksek ADAMTS14 ekspresyonu olan CRC hastalarının kötü prognoza sahip olduğunu göstermiştir. Bu sonuçlar, ADAMTS14'ün CRC metastazını destekleyebileceğini ve bunun da kötü bir prognostik sonuca yol açabileceğini göstermiştir. Aslında, ADAMTS14'ün SW620, SW480 ve HCT116'da, bu arada tek bir hastadan türetilen SW480 ve SW620'de promotör hipometilasyonunu da gözlemlenmiştir. SW480 ve SW620'nin metilasyon seviyesi arasında anlamlı bir fark yoktur, yani kanser ilerlemesi ve metastatik bir fenotipin gelişimi sırasında ADAMTS14 metilasyon seviyesinde anlamlı bir değişiklik bulunamamıştır (C. Slater vd., 2018; Wang vd., 2022).

ADAMTS14'ün tümörün farklı bölgelerinde aynı anda farklı ekspresyon paternlerinin olduğu, ancak tümörler için, tümörün farklı evrelerinde gen ekspresyon seviyelerini ve biyolojik etkilerini yansıtabileceğidir Bu nedenle, CRC'nin ADAMTS14'ün ekspresyonu ve

işlevinde seçici bir avantaja sahip olduğunu varsaydılar, yani ADAMTS14, CRC'de tümörijenisitesini ve agresifliğini sürdürmek için esas olarak farklı tümör bölgelerinde veya tümör evrelerinde spesifik roller oynar (Wang vd., 2022).

Bu tez kapsamında ilk olarak biyoinformatik çalışmalar yapılarak ADAMTS14 promotörüne ait 720bç, 470bç, 390bç olmak üzere üç adet gen bölgesi için promotör primeri tasarlanmıştır. Tasarlanan primerler baz alınarak PCR yöntemi aracılığı ile promotör gen bölgeleri çoğaltılmıştır. Çoğaltılan gen bölgeleri Jel elektroforezi yöntemi aracılığı ile yürütülmüştür. Elde edilen bantlar UV ışık altında kesilmiştir. Jelden DNA saflaştırma yöntemi kullanılarak DNA fragmentleri izole edildi. Ligasyon kuruldu. JM109 kompetant hücreleri kullanılarak pGEM-T Easy vektörüne klonlama yapıldı. Restriksiyon endonükleaz enzimleri olan HinIII ve XhoI kullanılarak kesim gerçekleştirilerek rekombinant koloniler belirlendi. Rekombinant kolonilerin küçük ölçekli plazmit izolasyonu yapıldı. Daha sonra pMetLuc alt vektörüne klonlama yapılarak büyük ölçekli plazmit izolasyonu yapıldı. Akabinde ikinci deneysel aşama olan hücre kültürü basamağına taşındı.

Deneysel çalışmanın ikinci aşamasına gelindiğinde ise klonlanmış olan 3 adet ADAMTS14 promotör gen bölgeleri için kalsiyum-fosfat geçici transfeksiyon yapılarak SEAP ve lusiferaz aktivitelere bakılarak bazal aktiviteleri belirlendi. ADAMTS14 promotörünün üç parçası için bazal aktivitesini belirlemeye çalıştık. 48 saat ve 72 saat sonra gen uyarıcı aktiviteyi ölçülmüştür.

48 saatte hem pMetLuc kontrolünün hem de pMetLuc raportörünün lusiferaz aktivitesinin promotör parçalarının lusiferaz aktivitesiyle karşılaştırıldığında üç parçalarının gen ekspresyonunun pMetLuc raportörden daha yüksek ve pMetLuc kontrolü daha düşük olduğunu gösterildi ve promotörün küçük parçası 390 bç diğer iki parçaya göre en aktif olanıdır. 72 saat sonraki lusiferaz aktivitesine gelince , 48 saatteki aktiviteye kıyasla hem pMetLuc kontrol ve pMetLuc reporter hemde üç parçanın her birinin aktivitesinde bir düşüş gösterdi.

ADAMTS14 promotör parçalarının 390 bp parçasında gözlenen bazal aktivitedeki artış, birkaç faktöre bağlanabilir; Arttırıcı elementler, transkripsiyonel mekanizmanın bağlanmasını ve işe alınmasını arttırmak için transkripsiyon faktörleri ve yardımcı

düzenleyicilerle etkileşime girerek yüksek bazal aktiviteye yol açabilir, bazal aktiviteyi inhibe edebilen veya baskılayabilen bazı negatif düzenleyici elementlerden yoksun olabilir. Promotorun 390 bp parçası, transkripsiyon faktörleri için ek veya daha fazla erişilebilir bağlanma bölgesi içerebilir. Epigenetik modifikasyonlar da promotör aktivitesini etkileyebilir. Promotorun bu parçası, transkripsiyon başlangıcı için daha uygun bir konfigürasyona yol açan yapısal değişikliklere uğrayabilir.

48 saat sonraki aktiviteye kıyasla 72 saat sonra bazal aktivitedeki azalmayı açıklayan birkaç olasılık vardır. İlk olarak, lusiferazın biyoluminesans reaksiyonu katalize eden bir protein olduğunu ve aktivitesinin, proteinin varlığına ve bütünlüğüne bağlı olduğu bilinmektedir. Zamanla, lusiferaz proteini aktivitesinde bir azalmaya yol açan hücreler içinde bozulmaya uğrayabilir (Tinikul vd., 2016). Hücre çoğalma hızı genel lusiferaz aktivitesini etkileyebilir. Hücre döngüsü dinamiklerindeki değişiklikler veya hücre çoğalmasını düzenleyen faktörlerin varlığı, 72 saat sonra lusiferaz aktivitesini etkileyebilir (Barriscale vd., 2014). Zamanla promotör, transkripsiyon faktörleri veya diğer düzenleyici proteinler ile doymuş hale gelebilir. Başlangıçta, promotör, bu faktörlerle etkileşime girmek ve gen ekspresyonunu yönlendirmek için yeterli kapasiteye sahip olabilir, bu da daha yüksek bazal aktivite ile sonuçlanır. Bununla birlikte, zaman ilerledikçe mevcut düzenleyici faktör havuzu tükenebilir veya bir doyma noktasına ulaşarak promotör aktivitesinde bir azalmaya yol açabilir (Blazek vd., 2013). Promotör tarafından düzenlenen ADAMTS14 geni, negatif geri besleme mekanizmaları sergileyebilir. Bu, genin kendi ifadesinin, kendi promotörünün aktivitesini baskılayabilen veya azaltabilen faktörlerin üretimine yol açabileceği anlamına gelir. Gen zamanla kopyalanmaya ve çevrilmeye devam ettikçe, negatif geri bildirim mekanizmaları daha belirgin hale gelir ve bu da promotör aktivitesinde bir azalmaya neden olur (Siemens vd., 2011).

DNA metilasyonu veya histon modifikasyonları gibi epigenetik modifikasyonlar, bir promotörün erişilebilirliğini ve aktivitesini etkileyebilir. Bu modifikasyonlar, transkripsiyon faktörlerinin bağlanmasını değiştirebilir veya transkripsiyonel mekanizmanın işe alınmasını etkileyerek bazal promotör aktivitesini azaltabilir (Bavik vd., 2006).

IL-6 sitokini iki farklı zamanda uygulanmıştır. Sonuçlar değerlendirildiği zaman, SW480 hücre hattında ADAMTS14 promotör ifadesinde kademeli bir artış gösterdiği belirlenmiştir. SW480 hücre hattına IL-6 uygulamasından sonra gözlemlenen ADAMTS14

promotör ifadesinin kademeli olarak göreceli yükselmesi, IL-6 stimülasyonuna hücrel yanıtta yer alan birkaç faktöre bağlanabilir. IL-6'nın reseptörüne bağlanması, birden çok aşağı akış molekülünün ve yolunun aktivasyonunu içeren bir sinyalleşme dizisini başlatır. Bu yollar, spesifik hedef genlerin transkripsiyonunu destekleyen STAT3 ve NF- κ B gibi çeşitli transkripsiyon faktörlerini aktive edebilir (Wang vd., 2014). Sinyal kaskadı ilerledikçe, daha fazla sinyal molekülü aktive olur, bu da sinyalin kademeli olarak amplifikasyonuna ve gen ekspresyonuna yol açar. IL-6 stimülasyonu, SW480 hücreleri içinde ikincil sinyal moleküllerinin üretimini indükleyebilir. Sitokinler ve büyüme faktörleri gibi bu ikincil moleküller, gen ekspresyonunu daha fazla uyarmak için otokrin veya parakrin bir şekilde hareket edebilir. Gen ifadesindeki kademeli artış, bu ikincil sinyal moleküllerinin üretimi ve birikmesi için gereken süreyi yansıtabilir. IL-6 sinyali, gen ifadesinin kademeli olarak yükselmesine katkıda bulunan transkripsiyonel ve translasyonel geri besleme döngülerini etkinleştirebilir (Nyati vd., 2017). Bu süreçlerin, artan gen ekspresyonuna elverişli bir ortamı tam olarak oluşturması zaman alabilir. SW480 hücre hattında IL-6 stimülasyonundan etkilenen spesifik genlerin ve yolların değişebileceğini not etmek önemlidir. Gen ekspresyon değişikliklerinin zaman süreci, IL-6 tedavisinin süresi ve konsantrasyonu gibi faktörlere ve ayrıca SW480 hücrelerinin spesifik biyolojik özelliklerine bağlı olabilir (Yang vd., 2009).

5 KAYNAKLAR

- Al Nakouzi, N., Bawa, O., Le Pape, A., Lerondel, S., Gaudin, C., Opolon, P., ... & Chauchereau, A. (2012). The IGR-CaP1 xenograft model recapitulates mixed osteolytic/blastic bone lesions observed in metastatic prostate cancer. *Neoplasia*, *14*(5), 376-IN1.
- Amour, Augustin, C Graham Knight, William R English, Ailsa Webster, Patrick M Slocombe, Vera Knäuper, Andrew J P Docherty, J David Becherer, Carl P Blobel, and Gillian Murphy. 2002. "The Enzymatic Activity of ADAM8 and ADAM9 Is Not Regulated by TIMPs." *FEBS Letters* 524 (1–3): 154–58.
- Avouac, Jérôme, Laure Gossec, and Maxime Dougados. 2006. "Diagnostic and Predictive Value of Anti-Cyclic Citrullinated Protein Antibodies in Rheumatoid Arthritis: A Systematic Literature Review." *Annals of the Rheumatic Diseases* 65 (7): 845–51.
- Barrett, Alan J, and J Ken McDONALD. 1986. "Nomenclature: Protease, Proteinase and Peptidase." *Biochemical Journal* 237 (3): 935.
- Barriscale, K. A., O'Sullivan, S. A., & McCarthy, T. V. (2014). A single secreted luciferase-based gene reporter assay. *Analytical biochemistry*, 453, 44-49.
- Bavik, C., Coleman, I., Dean, J. P., Knudsen, B., Plymate, S., & Nelson, P. S. (2006). The gene expression program of prostate fibroblast senescence modulates neoplastic epithelial cell proliferation through paracrine mechanisms. *Cancer research*, 66(2), 794-802.
- Bennett, Brydon L, Dennis T Sasaki, Brion W Murray, Eoin C O'Leary, Steve T Sakata, Weiming Xu, Jim C Leisten, Aparna Motiwala, Steve Pierce, and Yoshitaka Satoh. 2001. "SP600125, an Anthranyrazolone Inhibitor of Jun N-Terminal Kinase." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98 (24): 13681–86.
- Blazec, J., & Alper, H. S. (2013). Promoter engineering: recent advances in controlling transcription at the most fundamental level. *Biotechnology journal*, 8(1), 46-58.
- Bolz, Hanno, Alfredo Ramírez, Benigna von Brederlow, and Christian Kubisch. 2001. "Characterization of ADAMTS14, a Novel Member of the ADAMTS Metalloproteinase Family." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression* 1522 (3): 221–25.
- Brábek, Jan, Milan Jakubek, Frédéric Vellieux, Jiří Novotný, Michal Kolář, Lukáš Lacina, Pavol Szabo, Karolína Strnadová, Daniel Rösel, and Barbora Dvořánková. 2020.

- “Interleukin-6: Molecule in the Intersection of Cancer, Ageing and COVID-19.” *International Journal of Molecular Sciences* 21 (21): 7937.
- Bruni, Roberto, Mattia Prosperi, Cinzia Marcantonio, Alessandra Amadori, Umbertina Villano, Elena Tritarelli, Alessandra Lo Presti, Massimo Ciccozzi, and Anna R Ciccaglione. 2011. “A Computational Approach to Identify Point Mutations Associated with Occult Hepatitis B: Significant Mutations Affect Coding Regions but Not Regulative Elements of HBV.” *Virology Journal* 8 (1): 1–9.
- Chang, Qing, Eirini Bournazou, Pasquale Sansone, Marjan Berishaj, Sizhi Paul Gao, Laura Daly, Jared Wels, Till Theilen, Selena Granitto, and Xinmin Zhang. 2013. “The IL-6/JAK/Stat3 Feed-Forward Loop Drives Tumorigenesis and Metastasis.” *Neoplasia* 15 (7): 848-IN45.
- Chen, Y., Ji, H., Liu, S., Xing, Q., Zhu, B., & Wang, Y. (2022). Survival prognosis, tumor immune landscape, and immune responses of ADAMTS14 in clear cell renal cell carcinoma and its potential mechanisms. *Frontiers in Immunology*, 13.
- Chen, Y., Ji, H., Liu, S., Xing, Q., Zhu, B., & Wang, Y. (2022). Survival prognosis, tumor immune landscape, and immune responses of ADAMTS14 in clear cell renal cell carcinoma and its potential mechanisms. *Frontiers in Immunology*, 13.
- Cheng, D. L., Xiang, Y. Y., Ji, L. J., & Lu, X. J. (2015). Competing endogenous RNA interplay in cancer: Mechanism, methodology, and perspectives. *Tumour Biology*, 36(2), 479-488
- Cho, Wonkyoung, Xiongjie Jin, Junfeng Pang, Yan Wang, Nahid F Mivechi, and Demetrius Moskophidis. 2019. “The Molecular Chaperone Heat Shock Protein 70 Controls Liver Cancer Initiation and Progression by Regulating Adaptive DNA Damage and Mitogen-Activated Protein Kinase/Extracellular Signal-Regulated Kinase Signaling Pathways.” *Molecular and Cellular Biology* 39 (9): e00391-18.
- Churchman, Sarah M, Janina Geiler, Rekha Parmar, Elizabeth A Horner, Leigh D Church, Paul Emery, Maya H Buch, Michael F McDermott, and Frederique Ponchel. 2012. “Multiplexing Immunoassays for Cytokine Detection in the Serum of Patients with Rheumatoid Arthritis: Lack of Sensitivity and Interference by Rheumatoid Factor.” *Clin Exp Rheumatol* 30 (4): 534–42.
- Colige, Alain, Isabel Vandenberghe, Marc Thiry, Charles A Lambert, Jozef Van Beeumen, Shi-Wu Li, Darwin J Prockop, Charles M Lapiere, and Betty V Nusgens. 2002. “Cloning and Characterization of ADAMTS-14, a Novel ADAMTS Displaying

- High Homology with ADAMTS-2 and ADAMTS-3.” *Journal of Biological Chemistry* 277 (8): 5756–66.
- Compton, Carolyn, and Carolyn Compton. 2020. *Cancer Initiation, Promotion, and Progression and the Acquisition of Key Behavioral Traits*. Springer.
- Crotti, Sara, Martina Piccoli, Flavio Rizzolio, Antonio Giordano, Donato Nitti, and Marco Agostini. 2017. “Extracellular Matrix and Colorectal Cancer: How Surrounding Microenvironment Affects Cancer Cell Behavior?” *Journal of Cellular Physiology* 232 (5): 967–75.
- Dagoneau, Nathalie, Catherine Benoist-Lasselín, Céline Huber, Laurence Faivre, André Mégarbané, Abdulrahman Alswaid, Hélène Dollfus, Yves Alembik, Arnold Munnich, and Laurence Legeai-Mallet. 2004. “ADAMTS10 Mutations in Autosomal Recessive Weill-Marchesani Syndrome.” *The American Journal of Human Genetics* 75 (5): 801–6.
- Denisenko, Tatiana V, Anna S Gorbunova, and Boris Zhivotovsky. 2019. “Mitochondrial Involvement in Migration, Invasion and Metastasis.” *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 7: 355.
- Dubail, Johanne, and Suneel S Apte. 2015. “Insights on ADAMTS Proteases and ADAMTS-like Proteins from Mammalian Genetics.” *Matrix Biology* 44: 24–37.
- Dupont, L., Joannes, L., Morfoisse, F., Blacher, S., Monseur, C., Deroanne, C. F., ... & Colige, A. C. (2022). ADAMTS2 and ADAMTS14 can substitute for ADAMTS3 in adults for pro-VEGFC activation and lymphatic homeostasis. *JCI insight*, 7(8).
- Fernandes, Russell J, Satoshi Hirohata, J Michael Engle, Alain Colige, Daniel H Cohn, David R Eyre, and Suneel S Apte. 2001. “Procollagen II Amino Propeptide Processing by ADAMTS-3: Insights on Dermatosparaxis.” *Journal of Biological Chemistry* 276 (34): 31502–9.
- Fontanil, Tania, Yamina Mohamedi, Teresa Cobo, Santiago Cal, and Álvaro J Obaya. 2019. “Novel Associations within the Tumor Microenvironment: Fibulins Meet ADAMTSs.” *Frontiers in Oncology* 9: 796.
- Gluba-Brzózka, A., Rysz, J., Ławiński, J., & Franczyk, B. (2022). Renal Cell Cancer and Obesity. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(6), 3404
- Goetz, Jacky G, Susana Minguet, Inmaculada Navarro-Lérida, Juan José Lazcano, Rafael Samaniego, Enrique Calvo, Marta Tello, Teresa Osteso-Ibáñez, Teijo Pellinen, and Asier Echarri. 2011. “Biomechanical Remodeling of the Microenvironment by Stromal Caveolin-1 Favors Tumor Invasion and Metastasis.” *Cell* 146 (1): 148–63.

- Hall, M. P., Unch, J., Binkowski, B. F., Valley, M. P., Butler, B. L., Wood, M. G., ... & Wood, K. V. (2012). Engineered luciferase reporter from a deep sea shrimp utilizing a novel imidazopyrazinone substrate. *ACS chemical biology*, 7(11), 1848-1857.
- Hanahan, Douglas, and Robert A Weinberg. 2011. "Hallmarks of Cancer: The next Generation." *Cell* 144 (5): 646–74.
- Handle, Florian, Martin Puhr, Georg Schaefer, Nicla Lorito, Julia Hoefler, Martina Gruber, Fabian Guggenberger, Frédéric R Santer, Rute B Marques, and Wytse M van Weerden. 2018. "The STAT3 Inhibitor Galiellalactone Reduces IL6-Mediated AR Activity in Benign and Malignant Prostate ModelsGaliellalactone Reduces IL6-Mediated AR Activity." *Molecular Cancer Therapeutics* 17 (12): 2722–31.
- Haugwitz, M., Nourzaie, O., Garachtchenko, T., Hu, L., Gandlur, S., Olsen, C., ... & Sagawa, H. (2008). Multiplexing bioluminescent and fluorescent reporters to monitor live cells. *Current chemical genomics*, 1, 11.
- Hellsten, Rebecka, Martin Johansson, Anna Dahlman, Nishtman Dizeyi, Olov Sterner, and Anders Bjartell. 2008. "Galiellalactone Is a Novel Therapeutic Candidate against Hormone-refractory Prostate Cancer Expressing Activated Stat3." *The Prostate* 68 (3): 269–80.
- Hirano, Toshio, Kiyoshi Yasukawa, Hisashi Harada, Tetsuya Taga, Yasuo Watanabe, Tadashi Matsuda, Shin-ichiro Kashiwamura, Koichi Nakajima, Koichi Koyama, and Akihiro Iwamatsu. 1986. "Complementary DNA for a Novel Human Interleukin (BSF-2) That Induces B Lymphocytes to Produce Immunoglobulin." *Nature* 324 (6092): 73–76.
- Homo-Delarche, F, F Fitzpatrick, N Christeff, E A Nunez, J F Bach, and M Dardenne. 1991. "Sex Steroids, Glucocorticoids, Stress and Autoimmunity." *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 40 (4–6): 619–37.
- Jackson, A. L., & Loeb, L. A. (2001). The contribution of endogenous sources of DNA damage to the multiple mutations in cancer. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 477(1-2), 7-21.
- Jemal, Ahmedin, Freddie Bray, Melissa M Center, Jacques Ferlay, Elizabeth Ward, and David Forman. 2011. "Global Cancer Statistics." *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 61 (2): 69–90.
- Jia, Deyong, Li Li, Sulaiman Andrew, David Allan, Xuguang Li, Jonathan Lee, Guang Ji, Zemin Yao, Suresh Gadde, and Danial Figeys. 2017. "An Autocrine Inflammatory Forward-Feedback Loop after Chemotherapy Withdrawal Facilitates the

- Repopulation of Drug-Resistant Breast Cancer Cells.” *Cell Death & Disease* 8 (7): e2932–e2932.
- Johnson, Daniel E, Rachel A O’Keefe, and Jennifer R Grandis. 2018. “Targeting the IL-6/JAK/STAT3 Signalling Axis in Cancer.” *Nature Reviews Clinical Oncology* 15 (4): 234–48.
- Korbecki, Jan, Donata Simińska, Magdalena Gąssowska-Dobrowolska, Joanna Listos, Izabela Gutowska, Dariusz Chlubek, and Irena Baranowska-Bosiacka. 2021. “Chronic and Cycling Hypoxia: Drivers of Cancer Chronic Inflammation through HIF-1 and NF-KB Activation: A Review of the Molecular Mechanisms.” *International Journal of Molecular Sciences* 22 (19): 10701.
- Lacina, Lukáš, Jan Brábek, Vladimír Král, Ondřej Kodet, and Karel Smetana Jr. 2019. “Interleukin-6: A Molecule with Complex Biological Impact in Cancer.”
- Lin, Yueh Min, Chiao Wen Lin, Jeng Wei Lu, Kun Tu Yeh, Shu Hui Lin, and Shun Fa Yang. 2020. “Decreased Cytoplasmic Expression of ADAMTS14 Is Correlated with Reduced Survival Rates in Oral Squamous Cell Carcinoma Patients.” *Diagnostics* 10 (2): 1–13. <https://doi.org/10.3390/diagnostics10020122>.
- Ma, N., Shen, W., Pang, H., Zhang, N., Shi, H., Wang, J., & Zhang, H. (2017). The effect of RCAN1 on the biological behaviors of small cell lung cancer. *Tumour Biology*, 39(6)
- Ma, Sen, Cheng Ouyang, and Shuxin Ren. 2018. “Relationship between ADAMTS14/Rs4747096 Gene Polymorphism and Knee Osteoarthritis in Chinese Population.” *Bioscience Reports* 38 (5).
- Manore, Sara G, Daniel L Doheny, Grace L Wong, and Hui-Wen Lo. 2022. “IL-6/JAK/STAT3 Signaling in Breast Cancer Metastasis: Biology and Treatment.” *Frontiers in Oncology* 12.
- Marano, Luigi, Virginia Boccardi, Bartolomeo Braccio, Giuseppe Esposito, Michele Grassia, Marianna Petrillo, Modestino Pezzella, Raffaele Porfidia, Gianmarco Reda, and Angela Romano. 2015. “Comparison of the 6th and 7th Editions of the AJCC/UICC TNM Staging System for Gastric Cancer Focusing on the ‘N’ Parameter-Related Survival: The Monoinstitutional NodUs Italian Study.” *World Journal of Surgical Oncology* 13 (1): 1–7.
- Mullooly, Maeve, Patricia M McGowan, John Crown, and Michael J Duffy. 2016. “The ADAMs Family of Proteases as Targets for the Treatment of Cancer.” *Cancer Biology & Therapy* 17 (8): 870–80.

- Naba, Alexandra, Sebastian Hoersch, and Richard O Hynes. 2012. “Towards Definition of an ECM Parts List: An Advance on GO Categories.” *Matrix Biology: Journal of the International Society for Matrix Biology* 31: 371.
- Nakouzi, Nader Al, Olivia Bawa, Alain Le Pape, Stéphanie Lerondel, Catherine Gaudin, Paule Opolon, Patrick Gonin, Karim Fizazi, and Anne Chauchereau. 2012. “The IGR-CaP1 Xenograft Model Recapitulates Mixed Osteolytic/Blastic Bone Lesions Observed in Metastatic Prostate Cancer.” *Neoplasia* 14 (5): 376-IN1.
- Nam, Anna S, Ronan Chaligne, and Dan A Landau. 2021. “Integrating Genetic and Non-Genetic Determinants of Cancer Evolution by Single-Cell Multi-Omics.” *Nature Reviews Genetics* 22 (1): 3–18.
- Nickel, Walter, and Catherine Rabouille. 2009. “Mechanisms of Regulated Unconventional Protein Secretion.” *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 10 (2): 148–55.
- Novick, Daniela, Soo-Hyun Kim, Giamila Fantuzzi, Leonid L Reznikov, Charles A Dinarello, and Menachem Rubinstein. 1999. “Interleukin-18 Binding Protein: A Novel Modulator of the Th1 Cytokine Response.” *Immunity* 10 (1): 127–36.
- Nyati, K. K., Masuda, K., Zaman, M. M. U., Dubey, P. K., Millrine, D., Chalise, J. P., ... & Kishimoto, T. (2017). TLR4-induced NF- κ B and MAPK signaling regulate the IL-6 mRNA stabilizing protein Arid5a. *Nucleic acids research*, 45(5), 2687-2703.
- Philips, C. A., Rajesh, S., Nair, D. C., Ahamed, R., Abduljaleel, J. K., Augustine, P., & Abduljaleel, J. (2021). Hepatocellular carcinoma in 2021: an exhaustive update. *Cureus*, 13(11).
- Puente, Xose S, Luis M Sánchez, Christopher M Overall, and Carlos López-Otín. 2003. “Human and Mouse Proteases: A Comparative Genomic Approach.” *Nature Reviews Genetics* 4 (7): 544–58.
- Rašková, Magdalena, Lukáš Lacina, Zdeněk Kejík, Anna Venhauerová, Markéta Skaličková, Michal Kolář, Milan Jakubek, Daniel Rosel, Karel Smetana, and Jan Brábek. 2022. “The Role of IL-6 in Cancer Cell Invasiveness and Metastasis—Overview and Therapeutic Opportunities.” *Cells* 11 (22). <https://doi.org/10.3390/cells11223698>.
- Rawlings, N D, A J Barrett, and A Bateman. n.d. “MEROPS: The Peptidase Database *Nucl Acids Res* 2009; 38.” Database Issue D227–D233.
- Redondo-García, Silvia, Carlos Peris-Torres, Rita Caracuel-Peramos, and Juan Carlos Rodríguez-Manzaneque. 2021. “ADAMTS Proteases and the Tumor Immune

- Microenvironment: Lessons from Substrates and Pathologies.” *Matrix Biology Plus* 9: 100054.
- Rose, K. W., Taye, N., Karoulias, S. Z., & Hubmacher, D. (2021). Regulation of ADAMTS proteases. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 621.
- Rose-John, Stefan. 2012. “IL-6 Trans-Signaling via the Soluble IL-6 Receptor: Importance for the pro-Inflammatory Activities of IL-6.” *International Journal of Biological Sciences* 8 (9): 1237–47.
- Rypdal, Karoline B, Pugazendhi M Erusappan, A Olav Melleby, Deborah E Seifert, Sheryl Palmero, Mari E Strand, Theis Tønnessen, Christen P Dahl, Vibeke Almaas, and Dirk Hubmacher. 2021. “The Extracellular Matrix Glycoprotein ADAMTSL2 Is Increased in Heart Failure and Inhibits TGF β Signalling in Cardiac Fibroblasts.” *Scientific Reports* 11 (1): 19757.
- Sachs, M. M., & Ho, T. H. D. (1986). Alteration of gene expression during environmental stress in plants. *Annual review of plant physiology*, 37(1), 363-376.
- Sasi, Walid, Anup K Sharma, and Kefah Mokbel. 2014. “The Role of Suppressors of Cytokine Signalling in Human Neoplasms.” *Molecular Biology International* 2014.
- Scheller, Jürgen, Athena Chalaris, Dirk Schmidt-Arras, and Stefan Rose-John. 2011. “The Pro-and Anti-Inflammatory Properties of the Cytokine Interleukin-6.” *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research* 1813 (5): 878–88.
- Shah, Jatin P, and Bhuvanesh Singh. 2006. “Keynote Comment: Why the Lack of Progress for Oral Cancer?” *The Lancet Oncology* 7 (5): 356–57.
- Shen, Hong-Bin, and Kuo-Chen Chou. 2009. “Identification of Proteases and Their Types.” *Analytical Biochemistry* 385 (1): 153–60.
- Sheu, Ming Jen, Ming Ju Hsieh, Ying Erh Chou, Po Hui Wang, Chao Bin Yeh, Shun Fa Yang, Hsiang Lin Lee, and Yu Fan Liu. 2017. “Effects of ADAMTS14 Genetic Polymorphism and Cigarette Smoking on the Clinicopathologic Development of Hepatocellular Carcinoma.” *PLoS ONE* 12 (2): 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0172506>.
- Song, C., Li, D., Liu, H., Sun, H., Liu, Z., Zhang, L., & Hu, Y. (2019). The competing endogenous circular RNA ADAMTS14 suppressed hepatocellular carcinoma progression through regulating microRNA-572/regulator of calcineurin 1. *Journal of Cellular Physiology*, 234(3), 2460-2470.
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and

- mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*, 71(3), 209-249.
- Talmadge, James E, and Isaiah J Fidler. 2010. "AACR Centennial Series: The Biology of Cancer Metastasis: Historical Perspective." *Cancer Research* 70 (14): 5649–69.
- Tauro, Bow J, Rommel A Mathias, David W Greening, Shashi K Gopal, Hong Ji, Eugene A Kapp, Bradley M Coleman, Andrew F Hill, Ulrike Kusebauch, and Janice L Hallows. 2013. "Oncogenic H-Ras Reprograms Madin-Darby Canine Kidney (MDCK) Cell-Derived Exosomal Proteins Following Epithelial-Mesenchymal Transition." *Molecular & Cellular Proteomics* 12 (8): 2148–59.
- Tinikul, R., & Chaiyen, P. (2016). Structure, mechanism, and mutation of bacterial luciferase. *Bioluminescence: Fundamentals and Applications in Biotechnology-Volume 3*, 47-74.
- Tlsty, Thea D, and Patrick W Hein. 2001. "Know Thy Neighbor: Stromal Cells Can Contribute Oncogenic Signals." *Current Opinion in Genetics & Development* 11 (1): 54–59.
- Wang A, Bao Y, Wu Z, Zhao T, Wang D, Shi J, et al.. Long Noncoding RNA EGFR-AS1 Promotes Cell Growth and Metastasis via Affecting HuR Mediated mRNA Stability of EGFR in Renal Cancer. *Cell Death Dis* (2019) 10(3):154. doi: 10.1038/s41419-018-1251-0
- Wang, S. W., & Sun, Y. M. (2014). The IL-6/JAK/STAT3 pathway: potential therapeutic strategies in treating colorectal cancer. *International journal of oncology*, 44(4), 1032-1040.
- Wayne, Gareth J, Su-Jun Deng, Augustin Amour, Satty Borman, Rosalie Matico, H Luke Carter, and Gillian Murphy. 2007. "TIMP-3 Inhibition of ADAMTS-4 (Aggrecanase-1) Is Modulated by Interactions between Aggrecan and the C-Terminal Domain of ADAMTS-4." *Journal of Biological Chemistry* 282 (29): 20991–98.
- Whiteside, T L. 2008. "The Tumor Microenvironment and Its Role in Promoting Tumor Growth." *Oncogene* 27 (45): 5904–12.
- Wong, Connie, Samuel L Odom, Kara A Hume, Ann W Cox, Angel Fettig, Suzanne Kucharczyk, Matthew E Brock, Joshua B Plavnick, Veronica P Fleury, and Tia R Schultz. 2015. "Evidence-Based Practices for Children, Youth, and Young Adults with Autism Spectrum Disorder: A Comprehensive Review." *Journal of Autism and Developmental Disorders* 45: 1951–66.

- Wünnemann, Florian, Asaf Ta-Shma, Christoph Preuss, Severine Leclerc, Patrick Piet van Vliet, Andrea Oneglia, Maryse Thibeault, Emily Nordquist, Joy Lincoln, and Franka Scharfenberg. 2020. "Loss of ADAMTS19 Causes Progressive Non-Syndromic Heart Valve Disease." *Nature Genetics* 52 (1): 40–47.
- Yang, C-Y, A Chanalaris, and L Troeberg. 2017. "ADAMTS and ADAM Metalloproteinases in Osteoarthritis—Looking beyond the 'Usual Suspects.'" *Osteoarthritis and Cartilage* 25 (7): 1000–1009.
- Yang, E. V., Kim, S. J., Donovan, E. L., Chen, M., Gross, A. C., Marketon, J. I. W., ... & Glaser, R. (2009). Norepinephrine upregulates VEGF, IL-8, and IL-6 expression in human melanoma tumor cell lines: implications for stress-related enhancement of tumor progression. *Brain, behavior, and immunity*, 23(2), 267-275.
- Yıldırım, H. (2009). Karbonik anhidraz 9 geninin transkripsiyonel kontrolünün moleküler analizi.
- Yu, Hua, Drew Pardoll, and Richard Jove. 2009. "STATs in Cancer Inflammation and Immunity: A Leading Role for STAT3." *Nature Reviews Cancer* 9 (11): 798–809.
- Zhou, Shang-Hui, Wen-Jun Yang, Sheng-Wen Liu, Jiang Li, Chun-Ye Zhang, Yun Zhu, and Chen-Ping Zhang. 2014. "Gene Expression Profiling of Craniofacial Fibrous Dysplasia Reveals ADAMTS2 Overexpression as a Potential Marker." *International Journal of Clinical and Experimental Pathology* 7 (12): 8532.

EKLER

EK A: ADAMTS-14 Geni İçin Seçilen Promotor Bölgesinin Restriction Mapper Analizi

Name: Untitled

Conformation: linear

Overhang: five_prime, three_prime, blunt

Minimum Site Length: 5 bases

Maximum Number of Cuts: all

Included: all commercial, prototypes only

Noncutters: AarI, AatII, AbsI, AccI, AclI, AflIII, AflIII, AgeI, Aloi, ApaI, ArsI, AscI, AsuII, AvrII, BaeI, Ball, BarI, BcgI, BciVI, BclI, BdaI, BglI, BglIII, BsaAI, Bsp1407I, BspHI, BstEII, BtgZI, BtrI, ClaI, CspCI, DrdI, Eco47III, EcoNI, EcoRI, EcoRV, Esp3I, Fall, FseI, FspAI, **HindIII**, KpnI, MauBI, MfeI, MluI, MslI, NdeI, NheI, NmeAIII, NotI, NruI, NspI, OliI, PacI, PflMI, PmaCI, PmeI, PsiI, PI-PspI, PspXI, PsrI, PstI, PvuI, SacI, Sall, SapI, Scal, PI-SceI, SfiI, SgfI, SgrAI, SgrDI, SmlI, SnaBI, SpeI, SphI, SrfI, Sse8387I, SspI, StuI, SwaI, TspDTI, VspI, XbaI, **XhoI**, XmnI

Name	Sequence	Site Length	Overhang	Frequency	Cut Positions
BsaBI	GATNNNNATC	6	blunt	1	512
BsrBI	CCGCTC	6	blunt	1	1143
HindII	GTYRAC	6	blunt	1	465
HpaI	GTTAAC	6	blunt	1	465
PshAI	GACNNNNGTC	6	blunt	1	584
PvuII	CAGCTG	6	blunt	1	932

Name	Sequence	Site Length	Overhang	Frequency	Cut Positions
ApaLI	GTGCAC	6	five_prime	1	594
ApoI	RAATTY	6	five_prime	1	6
BamHI	GGATCC	6	five_prime	1	841
BspMI	ACCTGC	6	five_prime	1	114
Eco31I	GGTCTC	6	five_prime	1	322
NcoI	CCATGG	6	five_prime	1	166
PaeI	CCCWGGG	7	five_prime	1	600
PfoI	TCCNGGA	6	five_prime	1	1064
PpuMI	RGGWCCY	7	five_prime	1	1205
RsrII	CGGWCCG	7	five_prime	1	868
SanDI	GGGWCCC	7	five_prime	1	1205
SexAI	ACCWGGT	7	five_prime	1	312

Name	Sequence	Site Length	Overhang	Frequency	Cut Positions
TatI	WGTACW	6	five_prime	1	298
TfiI	GAWTC	5	five_prime	1	155
Tsp45I	GTSAC	5	five_prime	1	1072
Tth111I	GACNNNGTC	6	five_prime	1	314
AlwNI	CAGNNNCTG	6	three_prime	1	781
BfiI	ACTGGG	6	three_prime	1	1003
BseRI	GAGGAG	6	three_prime	1	539
BsgI	GTGCAG	6	three_prime	1	918
BsmI	GAATGC	6	three_prime	1	76
BsrDI	GCAATG	6	three_prime	1	326
BtsI	GCAGTG	6	three_prime	1	1074
DraIII	CACNNNGTG	6	three_prime	1	1118

Name	Sequence	Site Length	Overhang	Frequency	Cut Positions
Eam1105I	GACNNNNNGTC	6	three_prime	1	866
EciI	GGCGGA	6	three_prime	1	815
Eco57I	CTGAAG	6	three_prime	1	553
HaeIV	GAYNNNNNRTC	6	three_prime	1	885
HphI	GGTGA	5	three_prime	1	544
Hpy99I	CGWCG	5	three_prime	1	1047
MboII	GAAGA	5	three_prime	1	273
SacII	CCGCGG	6	three_prime	1	1059
TspGWI	ACGGA	5	three_prime	1	860
NaeI	GCCGGC	6	blunt	2	1103, 1153
SmaI	CCCGGG	6	blunt	2	962, 1291
AvaI	CYCGRG	6	five_prime	2	960, 1289

Name	Sequence	Site Length	Overhang	Frequency	Cut Positions
BbvCI	CCTCAGC	7	five_prime	2	1249, 1316
BccI	CCATC	5	five_prime	2	406, 634
Bpu10I	CCTNAGC	6	five_prime	2	1249, 1316
DraII	RGGNCCY	6	five_prime	2	778, 1205
EcoP15I	CAGCAG	6	five_prime	2	1363, 1375
AgsI	TTSAA	5	three_prime	2	220, 513
AjuI	GAANNNNNNTTG G	7	three_prime	2	806, 838
AlfI	GCANNNNNNTGC	6	three_prime	2	914, 948
BsaXI	ACNNNNNCTCC	6	three_prime	2	112, 142
BseSI	GKGCMC	6	three_prime	2	598, 1018
BstXI	CCANNNNNNTGG	6	three_prime	2	47, 138
GsuI	CTGGAG	6	three_prime	2	627, 1131

Name	Sequence	Site Length	Overhang	Frequency	Cut Positions
MmeI	TCCRAC	6	three_prime	2	1007, 1306
PpiI	GAACNNNNNCTC	7	three_prime	2	874, 906
XcmI	CCANNNNNNNNNT GG	6	three_prime	2	637, 1105
BsePI	GCGCGC	6	five_prime	3	948, 1163, 1386
BsmAI	GTCTC	5	five_prime	3	322, 689, 900
CfrI	YGGCCR	6	five_prime	3	785, 920, 1366
FokI	GGATG	5	five_prime	3	63, 397, 424
NarI	GGCGCC	6	five_prime	3	965, 972, 1193
XhoII	RGATCY	6	five_prime	3	278, 626, 841
Eco57MI	CTGRAG	6	three_prime	3	553, 627, 1131

Name	Sequence	Site Length	Overhang	Frequency	Cut Positions
TsoI	TARCCA	6	three_prime	3	159, 563, 632
AcyI	GRCGYC	6	five_prime	4	850, 965, 972, 1193
AvaII	GGWCC	5	five_prime	4	125, 868, 1180, 1205
BseYI	CCCAGC	6	five_prime	4	941, 976, 1347, 1359
Cfr10I	RCCGGY	6	five_prime	4	554, 1101, 1151, 1273
HgaI	GACGC	5	five_prime	4	839, 1060, 1118, 1344
BpII	GAGNNNNNCTC	6	three_prime	4	669, 673, 701, 705

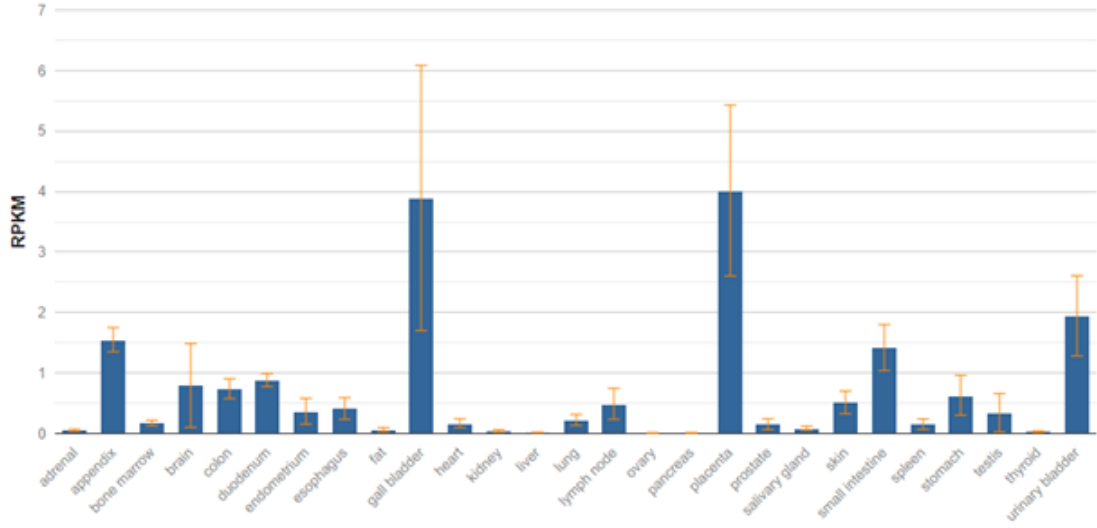
Name	Sequence	Site Length	Overhang	Frequency	Cut Positions
BsrI	ACTGG	5	three_prime	4	52, 127, 405, 1009
HaeII	RGCGCY	6	three_prime	4	968, 975, 1196, 1343
TaqII	GACCGA	6	three_prime	4	856, 882, 1082, 1108
TstI	CACNNNNNTCC	6	three_prime	4	112, 144, 898, 930
StyI	CCWWGG	6	five_prime	5	137, 166, 379, 630, 741
TspRI	CASTG	5	three_prime	5	127, 711, 1016, 1081, 1139
PleI	GAGTC	5	five_prime	6	298, 355, 522, 617,

Name	Sequence	Site Length	Overhang	Frequency	Cut Positions
					690, 1069
SfaNI	GCATC	5	five_prime	6	41, 151, 349, 375, 453, 663
Hin4I	GAYNNNNNVTC	6	three_prime	6	263, 295, 302, 334, 852, 884
SduI	GDGCHC	6	three_prime	6	351, 545, 598, 749, 1018, 1281
BseMII	CTCAG	5	three_prime	7	371, 482, 511, 573, 845, 1240, 1330
EcoRII	CCWGG	5	five_prime	9	207, 312, 537, 599, 749,

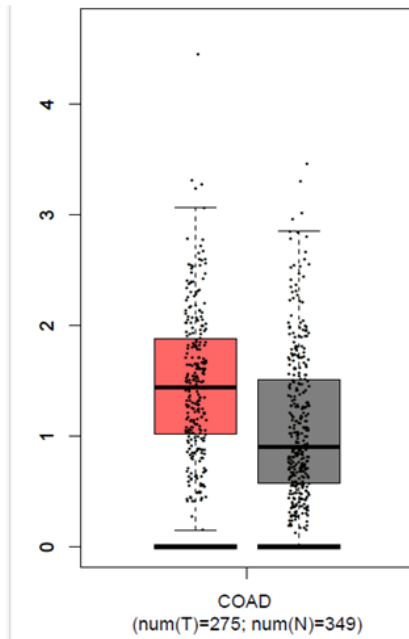
Name	Sequence	Site Length	Overhang	Frequency	Cut Positions
					845, 877, 1182, 1320
BbvI	GCAGC	5	five_prime	10	740, 817, 919, 941, 1167, 1241, 1269, 1278, 1377, 1392
TseI	GCWGC	5	five_prime	10	728, 805, 929, 932, 1155, 1229, 1257, 1266, 1390, 1405
FauI	CCCGC	5	five_prime	12	962, 995, 1007, 1012, 1041, 1063, 1074, 1078, 1148,

Name	Sequence	Site Length	Overhang	Frequency	Cut Positions
					1211, 1230, 1360
TauI	GCSGC	5	three_prime	14	787, 821, 925, 948, 1039, 1190, 1193, 1198, 1248, 1257, 1263, 1266, 1313, 1368

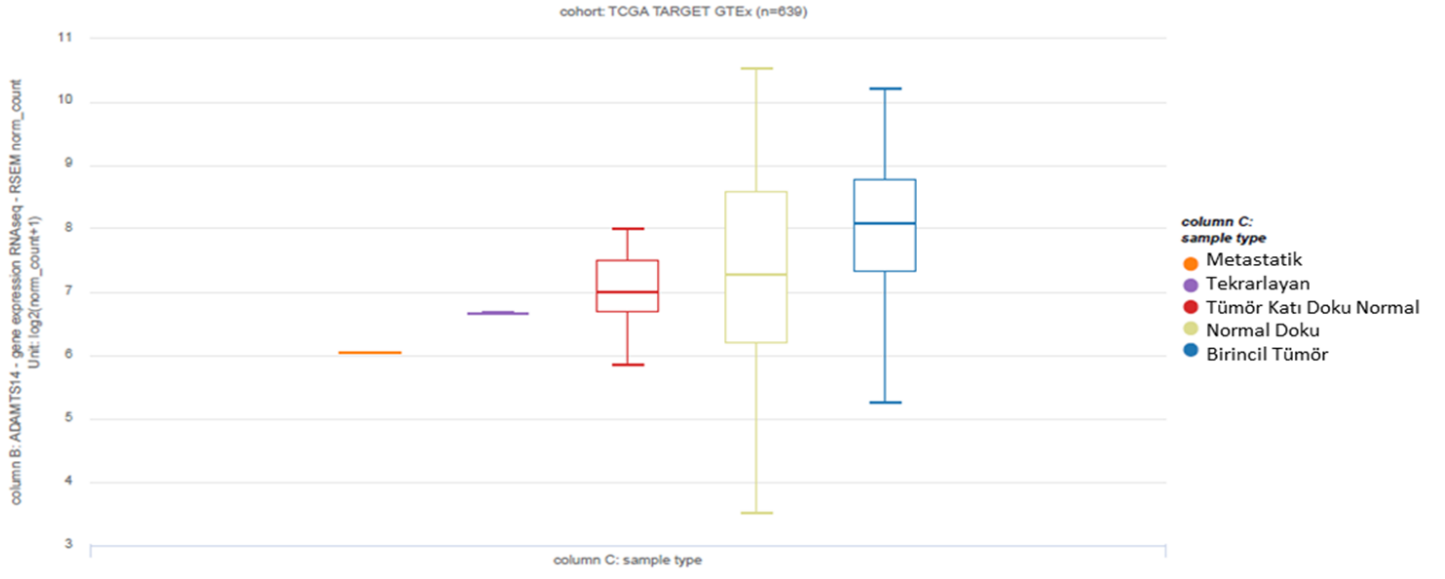
EK B: ADAMTS14 geninin normal dokularda ve Kolon adenokarsinomunda gen ekspresyonu



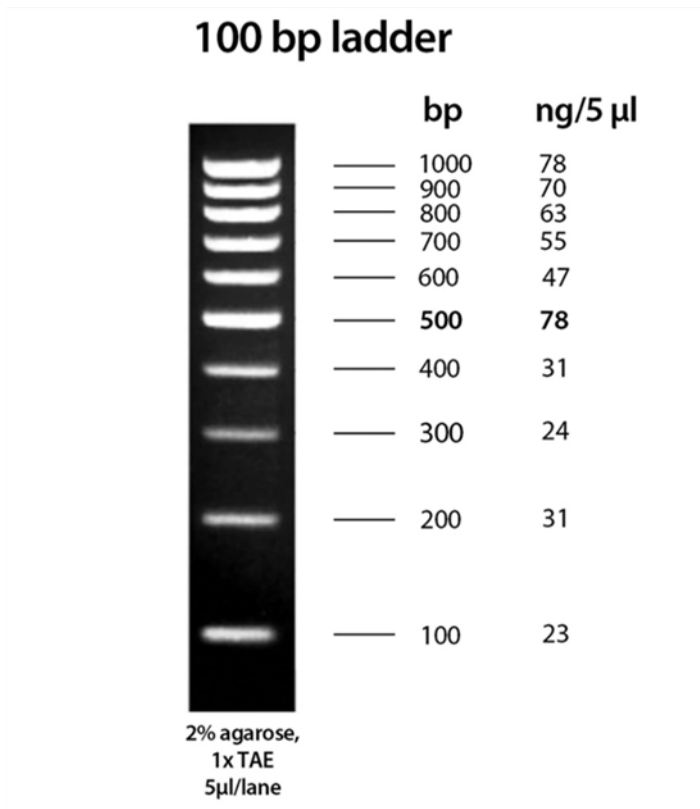
EK C: Kolon adenokarsinomunda ADAMTS14 geninin gen ekspresyonu ve normal dokularda ile karşılaştırması



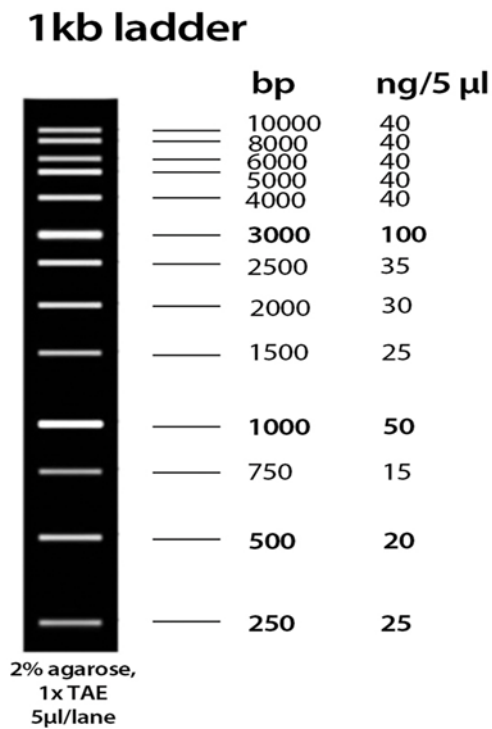
EK Ç: Metastatik, Nüks Tümör, Katı Doku Normal, Normal Doku, Primer Tümörde ADAMTS14 gen ifadesini gösterir.



EK D: DNA büyüklük belirteci (100bp)



EK E: DNA büyüklük belirteci (1 Kb)



ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı : GHUFRAN HAQI ISMAEL ALBAZI

Doğum tarihi ve yeri : 28/02/1994

e-posta :gufran.albazi@gmail.com

Öğrenim Bilgileri

Derece	Okul/Program	Yıl
Y. Lisans	Balikesir Üniversitesi/Moleküler Biyoloji ve Genetik	2023
Lisans	Samarra University / Pathological analyses	2017
Lise	Ghaza school	2013