

**T.C.  
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**



**ADAMTS2 GENİNİN KLONLANMASI VE EKSPRESYONU**

**ARİFE SİNEM GÜLTEKİN**

**BALIKESİR, OCAK - 2017**

**T.C.  
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**



**ADAMTS2 GENİNİN KLONLANMASI VE EKSPRESYONU**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**ARİFE SİNEM GÜLTEKİN**

**Jüri Üyeleri : Yrd. Doç. Dr. Sümeyye AYDOĞAN TÜRKOĞLU (Tez  
Danışmanı)**

**Prof. Dr. Feray KÖÇKAR (Eş Danışmanı)**

**Prof. Dr. Nilüfer ÇİNKİLİÇ**

**Yrd. Doç. Dr. Aylin ER**

**Yrd. Doç. Dr. Hatice YILDIRIM**

**BALIKESİR, OCAK - 2017**

## KABUL VE ONAY SAYFASI

ARİFE SİNEM GÜLTEKİN tarafından hazırlanan “ADAMTS2 GENİNİN KLONLANMASI VE EKSPRESYONU” adlı tez çalışmasının savunma sınavı 13.01.2017 tarihinde yapılmış olup aşağıda verilen jüri tarafından oy birliği / oy çokluğu ile Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

İmza

Danışman  
Yrd. Doç. Dr. Sümeyye AYDOĞAN  
TÜRKOĞLU

Eş Danışman  
Prof. Dr. Feray KÖÇKAR

Üye  
Prof. Dr. Nilüfer ÇİNKILIÇ

Üye  
Yrd. Doç. Dr. Aylin ER

Üye  
Yrd. Doç. Dr. Hatice YILDIRIM

  
.....  
  
.....  
  
.....  
  
.....  
  
.....

Jüri üyeleri tarafından kabul edilmiş olan bu tez Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunca onanmıştır.

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Doç. Dr. Necati ÖZDEMİR

.....

**Bu tez çalışması Balıkesir Üniversitesi Bilimsel Projeler Birimi tarafından 2015/42 nolu proje ile desteklenmiştir.**

## ÖZET

**ADAMTS2 GENİNİN KLONLANMASI VE EKSPRESYONU  
YÜKSEK LİSANS TEZİ  
ARİFE SİNEM GÜLTEKİN  
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**(TEZ DANIŞMANI: YRD. DOÇ. DR. SÜMEYYE AYDOĞAN  
TÜRKOĞLU)  
(EŞ DANIŞMAN: PROF. DR. FERAY KÖÇKAR)  
BALIKESİR, OCAK - 2017**

ADAMTS'ler (A Disintegrin And Metalloproteaz With Trombospondin Motifs; Trombospondin Motifli Matriks Metalloproteazlar) dokuların yeniden düzenlenmesi, pıhtılaşması, matriks yapımı ve yıkımı gibi fizyolojik olaylarda rol aldığı gibi kanser, kas-iskelet sistemi hastalıkları, enflamasyon, fibrozis gibi patolojik olaylarda da yer alır. ADAMTS ailesine ait 19 üye tanımlanmış ve birçok özelliğine göre gruplandırılmıştır. Bu gruplardan ADAMTS2, 3 ve 14 kollajen ADAMTS'leri oluşturur ve kollajen işlenmesinde görev alır. Kollajen ADAMTS'lerden ADAMTS2'nin önemli özelliklerinden biri kollajenlerin amino uçlarının kesilip uzaklaştırılmasında görev alması diğeri ise anti-anjiyogenik aktiviteye sahip olmasıdır.

Yüksek lisans tezi kapsamında ADAMTS2'nin farklı hücre hatlarında ekspresyon profili ve hipoksik koşullardaki ifadesi incelenmiştir. Ayrıca genin klonlanması ve ektopik olarak Saos-2 (insan kemik karsinomu) hücre hattında ifadesi gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla rekombinant ADAMTS2'nin Saos-2 hücrelerine kalsiyum-fosfat presipitasyonu ile geçici transfeksiyonu gerçekleştirildi ve transfeksiyon sonucu ADAMTS2'nin ifadesinde kontrol grubuna kıyasla 50 kat artış olduğu gözlemlendi.

**ANAHTAR KELİMELER:** ADAMTS2, hipoksiya, klonlama, kollajen, Saos-2.

## **ABSTRACT**

**CLONING AND EKSPRESSION OF ADAMTS2 GENE  
MSC THESIS  
ARİFE SİNEM GÜLTEKİN  
BALIKESİR UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE  
BIOLOGY**

**(SUPERVISOR: ASSIST. PROF. DR. SÜMEYYE AYDOĞAN  
TÜRKOĞLU)  
(CO-SUPERVISOR: PROF. DR. FERAY KÖÇKAR)  
BALIKESİR, JANUARY - 2017**

ADAMTS (A Disintegrin And Metalloproteinase with Trombospondin Motifs) is involved in pathological events such as cancer, fibrosis, musculoskeletal disorders, inflammation as well as physiological events such as tissue reorganization, clotting, matrix building and destruction. 19 members of the ADAMTS family have been identified and grouped according to many characteristics. From these groups, ADAMTS2, 3 and 14 form collagen ADAMTS and serve in collagen processing. One of the important features of ADAMTS2 from collagen ADAMTS is that the amino ends of the collagen are excised and the other is anti-angiogenic activity.

In the master thesis, the expression profile of ADAMTS2 in different cell lines and the expression in hypoxic conditions were examined. Also ADAMTS2 gene is cloned in eucaryotic expression vector and ectopically expressed in the Saos-2 (human bone carcinoma) cell line. For this purpose, recombinant ADAMTS2 was transiently transfected with calcium-phosphate precipitation into Saos-2 cells. There was a 50-fold increase of ADAMTS2 mRNA expression compared to the control group.

**KEYWORDS:** ADAMTS2, cloning, hypoxia, collagen, Saos-2.

# İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	i
ABSTRACT .....	ii
İÇİNDEKİLER .....	iii
ŞEKİL LİSTESİ .....	vi
TABLO LİSTESİ.....	viii
SEMBOL LİSTESİ.....	ixx
ÖNSÖZ.....	xi
<b>1. GİRİŞ.....</b>	<b>1</b>
1.1 Kollajen Biyosentezi ve İşlenmesi .....	3
1.2 ADAMTS Gen Ailesi ve Fizyolojik Fonksiyonları .....	4
1.2.1 Kollajen ADAMTS'ler: Prokollajen N-propeptidazlar .....	7
1.2.1.1 ADAMTS2, 3 ve 14 Genlerinin Yapısal Özellikleri.....	7
1.3 ADAMTS2 Geni .....	8
1.4 ADAMTS2 Gen Mutasyonları ve Hastalıklarla İlişkisi .....	9
1.4.1 Ehlers-Danlos Sendromu (EDS).....	10
1.4.2 Diğer Hastalıklar ve Hastalıkların Dentin Efektleri İle İlişkisi ...	11
1.4.2.1 Osteogenesiz İmperfekta (OI).....	11
1.4.2.2 Goldblatt Sendromu .....	11
1.4.2.3 Seckel Sendromu.....	11
1.4.2.4 Ailesel Hipofosfatemik Vitamin D Dirençli Raşitizm.....	11
1.4.2.5 Hiperfosfatemik Ailesel Tümoral Kalsinosis.....	12
1.4.2.6 Schimke İmmunoosseöz Displazi .....	12
1.5 Hipoksiya.....	12
1.5.1 Hipoksiya ile İndüklenebilir Faktör (Hif).....	12
1.6 Kimyasal Hipoksiya .....	14
1.7 Çalışmanın Amacı .....	15
<b>2. MATERYAL-METOD .....</b>	<b>18</b>
2.1 Laboratuvarlarda ve Laboratuvar Çalışmalarında Kullanılan Malzemelerin Temizliği .....	18
2.2 Çalışmalarda Kullanılan Malzemeler .....	18
2.3 Çalışmalarda Kullanılan Araç-Gereçler .....	20
2.4 Çalışmalarda Kullanılan Vektörler.....	21
2.5 DNA Çalışmaları ile İlgili Teknikler.....	23
2.5.1 ADAMTS2 Klonlama Primerlerinin Tasarlanması .....	23
2.5.2 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR).....	24
2.5.2.1 Agaroz Jel Elektroforezi .....	25
2.5.2.2 DNA Örneklerinin Agaroz Jelden Saflaştırılması .....	26
2.5.2.3 DNA Miktar Tayini.....	26
2.5.3 PZR Ürünlerinin T:A Stratejisi ile Klonlanması .....	27
2.5.4 Ökaryotik pcDNA 3.1 V5 His A, B, C Vektörüne Alt Klonlama	27
2.5.4.1 Kesim Koşulları .....	28
2.5.4.2 Defosforilizasyon .....	28
2.5.5 ADAMTS2'nin His A vektörüne Klonlanması .....	29
2.6 Bakteri Çalışmaları İle İlgili Teknikler .....	30
2.6.1 Çalışmalarda Kullanılan Bakteri Soyları .....	30

2.6.2	Bakteriyel Kültür Ortamı .....	30
2.6.3	Bakterilerin Seçilmesinde Kullanılan Antibiyotik.....	30
2.6.4	Kompetant Hücre Hazırlanması.....	31
2.6.5	Transformasyon .....	31
2.6.6	Gliserol Stok Hazırlama.....	32
2.6.7	Küçük Ölçekli Plazmit DNA İzolasyonu (Miniprep).....	32
2.6.8	Büyük Ölçekli Plazmit DNA İzolasyonu (Maxiprep) .....	32
2.7	Hücre Kültürü Çalışmaları ile İlgili Teknikler .....	33
2.7.1	Hücre Kültürü Çalışmalarında Kullanılan Solüsyonların Hazırlanması .....	33
2.7.2	Hücre Kültüründe Kullanılan Ökaryotik Hücre Hatları .....	34
2.7.3	Hücre Hatlarının Açılması .....	34
2.7.4	Hücre Hatlarının Büyütülmesi .....	34
2.7.5	Hücre Hatlarının Pasajlanması.....	35
2.7.6	Hücrelerin Dondurulması ve Saklanması .....	35
2.8	Transkripsiyonel Aktivite Çalışmaları ile İlgili Teknikler .....	35
2.8.1	Canlı Hücrelerin Belirlenmesi ve Hücre Sayımı .....	35
2.8.2	Kalsiyum-Fosfat Presipitasyon Tekniği ile Transfeksiyon.....	36
2.8.2.1	Geçici Transfeksiyon .....	37
2.8.3	pSEAP2 Aktivitesinin Ölçümü.....	37
2.8.4	Koloni Oluşum Testi.....	37
2.9	Hipoksiya Çalışmaları ile İlgili Teknikler.....	38
2.9.1	CoCl <sub>2</sub> Konsantrasyon Çalışmaları .....	38
2.9.2	MTT (3-(4, 5-dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) Testi.....	38
2.9.3	Farklı Hücre Hatlarında Hipoksiya Çalışmaları .....	39
2.10	RNA Çalışmaları ile İlgili Teknikler.....	39
2.10.1	Farklı Hücre Pelletlerinden RNA İzolasyonu.....	39
2.10.2	RNA Miktar Tayini.....	40
2.10.3	RNA Jel Elektroforezi .....	40
2.10.4	cDNA Sentezi (RT-PZR).....	41
2.10.5	Gerçek Zamanlı PZR (q-PZR) ve Ekspresyon Çalışmaları .....	41
2.10.5.1	q-PZR Sonuçların Değerlendirilmesi ve İstatistiksel Analizleri.....	43
<b>3.</b>	<b>BULGULAR .....</b>	<b>44</b>
3.1	Farklı Hücre Hatlarında ADAMTS2 Ekspresyonunun Belirlenmesi .....	44
3.2	Farklı Hücre Hatlarında ADAMTS2'nin Hipoksik Regülasyonunun Belirlenmesi .....	48
3.2.1	Hipoksiya Deneyi İçin CoCl <sub>2</sub> Konsantrasyon Miktarının Belirlenmesi .....	48
3.2.1.1	MTT Testi .....	48
3.2.1.2	q-PZR .....	49
3.2.2	Farklı Hücrelerde Hipoksiya Deneyi .....	51
3.2.3	Hipoksik Koşulların Hif-1 $\alpha$ ile Doğrulanması .....	51
3.3	Saos-2 Hipoksik Koşullarda Saos-2 Hücrelerinde ADAMTS2'nin Kollajen Tip I, II ve III'e Etkisi .....	57
3.4	İnsan ADAMTS2 Geninin Klonlanması .....	59
3.4.1	ADAMTS2 Klonlama Primerlerinin Tasarlanması .....	59
3.4.2	ADAMTS2 Geninin PZR Yöntemi ile Çoğaltılması.....	60
3.4.3	pGEMT-Easy Vektör Sistemine Klonlama .....	62



3.4.3.1	Kompetant Hücelere Transformasyon .....	63
3.4.3.2	pGEMT-Easy Vektörüne Yapılan Ligasyonun Kontrolü .....	63
3.4.3.3	Dizi Analizi .....	64
3.4.4	pcDNA 3.1 V <sub>5</sub> His A, B, C Vektörüne Alt Klonlanma .....	67
3.4.4.1	ADAMTS2 Geninin pGEMT-Easy Vektöründen Çıkartılması .....	69
3.4.4.2	His A Vektörünün Kesilmesi ve Defosforilasyonu.....	70
3.4.4.3	His A Vektörüne Ligasyon.....	70
3.4.4.4	His A Vektörüne Ligasyonun Kontrolü .....	71
3.4.4.5	Dizi Analizi .....	71
3.5	ADAMTS2 Geninin Geçici Transfeksiyonu .....	72
3.5.1	Transfeksiyonun Kontrolü .....	72
3.5.2	Kalsiyum-Fosfat Tekniğı ile Geçici Transfeksiyon.....	73
3.5.3	ADAMTS2 Transfekte Edilen Saos-2 Hücrelerindeki Koloni Formasyonu .....	74
<b>4.</b>	<b>SONUÇ VE ÖNERİLER .....</b>	<b>76</b>
<b>5.</b>	<b>KAYNAKLAR.....</b>	<b>81</b>
<b>6.</b>	<b>EKLER .....</b>	<b>87</b>

<b>Şekil 1.1:</b> Kollajen biyosentezi.....	3
<b>Şekil 1.2:</b> MMP, ADAM ve ADAMTS'nin birbirine benzer ve ayrı yapısal özellikleri.....	5
<b>Şekil 1.3:</b> ADAMTS gen ailesinin sınıflandırılması.....	6
<b>Şekil 1.4:</b> ADAMTS2, 3 ve 14 genlerinin domain bölgeleri.....	7
<b>Şekil 1.5:</b> Normoksik ve hipoksik koşullarda hücre sel yanıt lar.....	13
<b>Şekil 1.6:</b> Yüksek lisans tez çalışmasının akış diyagramı.....	17
<b>Şekil 2.1:</b> pGEM-T Easy vektör haritası ve klonlama bölgeleri.....	22
<b>Şekil 2.2:</b> pcDNA 3.1 V5 His A, B, C vektör haritası ve klonlama bölgeleri.....	22
<b>Şekil 2.3:</b> pSEAP2 kontrol vektör haritası.....	23
<b>Şekil 2.4:</b> Thoma lamı.....	36
<b>Şekil 3.1:</b> ADAMTS2 ekspresyon çalışmalarının akış diyagramı.....	44
<b>Şekil 3.2:</b> Farklı hücre hatlarının mikroskoptaki morfolojik görüntüleri.....	45
<b>Şekil 3.3:</b> Farklı hücre hatlarındaki RNA örneklerinin FA jel elektroforez görüntüleri.....	46
<b>Şekil 3.4:</b> Farklı hücre hatlarında ekspresyon çalışmalarının agaroz jel elektroforezindeki görüntüleri.....	47
<b>Şekil 3.5:</b> Farklı hücre hatlarındaki ADAMTS2 ekspresyonunun densitometrik analizi.....	47
<b>Şekil 3.6:</b> Hipoksiya çalışmalarının akış diyagramı.....	48
<b>Şekil 3.7:</b> Saos-2 hücrelerine farklı konsantrasyonlarda uygulanan CoCl <sub>2</sub> 'nin hücrelere etkisi.....	49
<b>Şekil 3.8:</b> Saos-2 hücrelerinde hipoksiyanın Hif-1 $\alpha$ ile doğrulanması.....	50
<b>Şekil 3.9:</b> Saos-2 hücrelerinde 24 saat CoCl <sub>2</sub> 'nin ADAMTS2 üzerine etkisi.....	50
<b>Şekil 3.10:</b> Saos-2 hücrelerinde Hif-1 $\alpha$ ile hipoksiyanın doğrulanması.....	52
<b>Şekil 3.11:</b> Hipoksik koşullarda Saos-2 hücrelerinde ADAMTS2 ekspresyonu.....	52
<b>Şekil 3.12:</b> HT-29 hücrelerinde Hif-1 $\alpha$ ile hipoksiyanın doğrulanması.....	53
<b>Şekil 3.13:</b> Hipoksik koşullarda HT-29 hücrelerinde ADAMTS2 ekspresyonu.....	53
<b>Şekil 3.14:</b> PC-3 hücrelerinde Hif-1 $\alpha$ ile hipoksiyanın doğrulanması.....	54
<b>Şekil 3.15:</b> Hipoksik koşullarda PC-3 hücrelerinde ADAMTS2 ekspresyonu.....	54
<b>Şekil 3.16:</b> DU-145 hücrelerinde Hif-1 $\alpha$ ile hipoksiyanın doğrulanması.....	55
<b>Şekil 3.17:</b> Hipoksik koşullarda DU-145 hücrelerinde ADAMTS2 ekspresyonu.....	55
<b>Şekil 3.18:</b> MCF-7 hücrelerinde Hif-1 $\alpha$ ile hipoksiyanın doğrulanması.....	56
<b>Şekil 3.19:</b> Hipoksik koşullarda MCF-7 hücrelerinde ADAMTS2 ekspresyonu.....	56
<b>Şekil 3.20:</b> Hipoksiyanın tip I kollajene etkisi.....	57
<b>Şekil 3.21:</b> Hipoksiyanın tip II kollajene etkisi.....	58
<b>Şekil 3.22:</b> Hipoksiyanın tip III kollajene etkisi.....	58
<b>Şekil 3.23:</b> ADAMTS2 klonlama çalışmalarının akış diyagramı.....	59
<b>Şekil 3.24:</b> PZR sonucu I.....	60
<b>Şekil 3.25:</b> PZR sonucu II.....	61
<b>Şekil 3.26:</b> PZR sonucu III.....	61
<b>Şekil 3.27:</b> PZR sonucu IV.....	61
<b>Şekil 3.28:</b> PZR sonucu V.....	61

<b>Şekil 3.29:</b> Agaroz jelden saflaştırılan ADAMTS2 insert .....	62
<b>Şekil 3.30:</b> EcoRI enzimi ile pGEMT-Easy vektörüne ligasyonun kontrolü. ..	63
<b>Şekil 3.31:</b> ADAMTS2'nin dizileme sonucu.....	67
<b>Şekil 3.32:</b> pcDNA 3.1 V <sub>5</sub> His A vektör klonlama bölgesi. ....	68
<b>Şekil 3.33:</b> pcDNA 3.1 V <sub>5</sub> His B vektör klonlama bölgesi. ....	68
<b>Şekil 3.34:</b> pcDNA 3.1 V <sub>5</sub> His C vektör klonlama bölgesi.....	69
<b>Şekil 3.35:</b> pGEMT-Easy vektöründen His A vektörüne klonlamada tek enzim stratejisinde kullanılan EcoRI enziminin seçilmesi.....	69
<b>Şekil 3.36:</b> EcoRI enzimi ile pGEMT-Easy vektöründen çıkan ADAMTS2 geni ve klonlama bölgesindeki uçları kesilen His A vektörü.....	70
<b>Şekil 3.37:</b> EcoRI ile His A vektörüne ligasyonun kontrolü. ....	71
<b>Şekil 3.38:</b> Transfeksiyon sonucunda pSEAP2 aktivitesi.....	72
<b>Şekil 3.39:</b> Saos-2 hücrelerinde geçici transfeksiyonun ADAMTS2'ye mRNA düzeyinde etkisi. ....	74
<b>Şekil 3.40:</b> Saos-2 hücrelerinde koloni oluşumu .....	75
<b>Şekil 4.1:</b> Prokollajenin N- ve C-terminal bölgelerinin kesilip çıkartılması. .	77
<b>Şekil A.1:</b> DNA büyüklük belirteci (1 kb).....	87

## TABLO LİSTESİ

## Sayfa

<b>Tablo 1.1:</b>	Kollajen tipleri ve özellikleri.....	2
<b>Tablo 1.2:</b>	İnsanlarda görülen ADAMTS mutasyonları sonucu hastalıklar, substratları ve sentezlendikleri dokular .....	9
<b>Tablo 1.3:</b>	Hif hedef genleri.....	14
<b>Tablo 2.1:</b>	Çalışmalarda kullanılan malzemeler ve temin edildikleri firmalar.....	19
<b>Tablo 2.2:</b>	Çalışmalarda kullanılan araç-gereçler.....	20
<b>Tablo 2.3:</b>	ADAMTS2 klonlama primerleri ve özellikleri.....	23
<b>Tablo 2.4:</b>	PZR ürünleri ve miktarları.....	24
<b>Tablo 2.5:</b>	PZR sıcaklık gradientleri.....	24
<b>Tablo 2.6:</b>	Agaroz jel için hazırlanan solüsyonlar.....	25
<b>Tablo 2.7:</b>	Ligasyon koşulları.....	27
<b>Tablo 2.8:</b>	EcoRI ile restriksiyon kesim koşulları.....	28
<b>Tablo 2.9:</b>	Defosforilizasyon koşulları.....	29
<b>Tablo 2.10:</b>	ADAMTS2'nin His A vektörüne ligasyon koşulları.....	29
<b>Tablo 2.11:</b>	Klonlama ve stok amaçlı kullanılan <i>E. coli</i> hücre soyları ve özellikleri.....	30
<b>Tablo 2.12:</b>	Bakteri sıvı ve katı üreme ortamları ve hazırlanışları.....	30
<b>Tablo 2.13:</b>	Bakteri çalışmalarında kullanılan antibiyotiğin hazırlanışı.....	30
<b>Tablo 2.14:</b>	Kompetant hücre için kullanılan bileşikler.....	31
<b>Tablo 2.15:</b>	Hücre kültüründe kullanılan solüsyonlar ve hazırlanışı.....	33
<b>Tablo 2.16:</b>	Hücre kültüründe çalışılan hücre hatları.....	34
<b>Tablo 2.17:</b>	Transfeksiyon çözeltileri.....	36
<b>Tablo 2.18:</b>	MTT solüsyonu ve hazırlanışı.....	38
<b>Tablo 2.19:</b>	FA jel elektroforez tamponu.....	40
<b>Tablo 2.20:</b>	RT-PZR için kullanılan cDNA bileşenleri.....	41
<b>Tablo 2.21:</b>	Ekspresyon çalışmalarında kullanılan primerler ve dizileri.....	42
<b>Tablo 2.22:</b>	q-PZR döngü koşulları.....	43
<b>Tablo 3.1:</b>	ADAMTS2 dizileme primerleri.....	64

## SEMBOL LİSTESİ

<b>°C</b>	Selsius Derecesi
<b>µg</b>	Mikrogram
<b>µl</b>	Mikrolitre
<b>ADAMTS</b>	A Disintegrin And Metalloproteinase With Thrombospondin Motifs
<b>ADAMTS2</b>	A Disintegrin And Metalloproteinase With Thrombospondin Motifs Type 2
<b>C-terminal</b>	Karboksi Uç
<b>cDNA</b>	Tamamlayıcı DNA (Complementary DNA)
<b>CoCl<sub>2</sub></b>	Kobalt Klorür
<b>COMP</b>	Kıkırdak Oligomerik Matriks Proteini
<b>Ct</b>	Cycle Treshold
<b>DEPC</b>	Dietilpirokarbonat
<b>dH<sub>2</sub>O</b>	Di-iyonize Su
<b>DMSO</b>	Dimetil Sülfoksit
<b>DNA</b>	Deoksiribonükleik Asit
<b>DNAaz</b>	Deoksiribonükleik Asit Proteaz
<b><i>E.coli</i></b>	<i>Escherichia coli</i>
<b>EDS</b>	Ehlers-Danlos Sendromu
<b>EDTA</b>	Etilendiamintetraasedik Asit
<b>EPO</b>	Eritropoietin
<b>ESM</b>	Estrasellüler Matriks
<b>FA</b>	Formaldehit Agaroz
<b>FCS</b>	Fetal Sığır Serumumu
<b>H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	Sülfürik Asit
<b>HCl</b>	Hidrojen Klorür
<b>Hif</b>	Hipoksiya ile İndüklenebilir Faktör
<b>LB</b>	Luria Broth
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	Magnezyum Klorür
<b>mRNA</b>	Mesajcı Ribonükleik Asit
<b>MTT</b>	3-(4,5-Dimetilthiazol-2yl)-2,5-Difeniltetrazolium Bromit
<b>N-terminal</b>	Amino Uç

<b>NaCl</b>	Sodyum Klorür
<b>nm</b>	Nanometre
<b>Oİ</b>	Osteogenesisiz İmperfekta
<b>PBS</b>	Fosfat Tuz Buffer
<b>pH</b>	Asitlik Derecesini Belirten Ölçü Birimi
<b>pNP</b>	Propeptid N-proteaz
<b>pVHL</b>	Von Hippel-Lindau Tümör Supressör Protein
<b>PZR</b>	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
<b>RPM</b>	Dakikadaki Dönüş Sayısı
<b>RT-PZR</b>	Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu
<b>Saos-2</b>	İnsan Kemik Karsinomu
<b>TBE Çözeltisi</b>	Tris-Borik Asit-EDTA
<b>TSP1</b>	Trombospondin Motif Tip 1
<b>TTP</b>	Trombotik Trombositopenik Purpura
<b>UV</b>	Ultra Viyole
<b>vWF</b>	Von Willebrand Faktörü
<b>WMS</b>	Weil Marchesani Sendromu

## ÖNSÖZ

Yüksek lisans tezi çalışmaları Balıkesir Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü ile Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü araştırma laboratuvarlarında yapılmıştır. Gerçekleştirilen tüm çalışmalar Yrd. Doç. Dr. Sümeyye Aydoğan Türkoğlu danışmanlığında ve Prof. Dr. Feray Köçkar eş danışmanlığında gerçekleştirilmiştir.

Yüksek lisans tez çalışmasında bilgi ve tecrübesiyle bana ışık tutan, deneysel aşamalarda yardımcı olan, desteğini üzerimden esirgemeyen canım hocam Yrd. Doç. Dr. Sümeyye Aydoğan Türkoğlu'na,

Yüksek lisansa başlayıp araştırma ve uygulama yapmama fırsat tanıyan, akademik bilgi, tecrübe ve çalışmalarında bana önderlik eden Prof. Dr. Feray Köçkar hocama,

Laboratuvardaki yoğun çalışmalarda yardımcı olan, üzerimde emeği olan sayın hocalarım Yrd. Doç. Dr. Hatice Yıldırım, Yrd. Doç. Dr. Meltem Alper, Uz. Dr. Esra Tokay, Öğr. Gör. Derya Altan ve Dr. A. Tuğşen Aydemir'e,

Laboratuvar ortamında birlikte vakit geçirdiğim değerli arkadaşlarım Din Muhammed Doliyev, Fatma Poyrazlı, Gamze Güngör, Gizem Güler, Merve Karaman, Sevgi Baysal'a ve diğer ekip arkadaşlarıma,

Hayatı birlikte göğüslediğim, elimi hiç bırakmayan, gerek mesleki gerek özel hayatımda varlığıyla beni güçlendirip bana inanan İbrahim Tosun'a ve ailesine,

Teşekkür ederim.

Ünlü Türk yazarı, asker ve öğretmen olan Ömer Seyfettin'in dediği gibi "Ben Gönen'de doğdum". Gönen'ime, çocukluğumun geçtiği mahalleme özlem, saygı ve sevgilerimle...

Bu yüksek lisans tezimi minicik ellerimden sıkı sıkı tutan ve hala daha o elleri ilk günkü gibi hiç bırakmayan maddi manevi destekleri, verdikleri şevkat ve sevgileri ile her daim yanımda olan biricik annem Nimet Gültekin'e ve biricik babam Selami Gültekin'e ithaf ediyorum.

## 1. GİRİŞ

Bağ dokusu hücreler ve dokular arası bağlantıları sağlamakta ve hücreleri destekleyici görev yapmaktadır. Embriyonik olarak mezenşimal kökenlidir. Bağ doku hücreleri, bağ doku iplikleri ve hücreler arası madde olan ekstrasellüler matriks (ESM)'den oluşur. Bağ doku ara maddesi olan ESM, hücre ve dokular için bağlayıcı ve destekleyici bir iskelet oluşturur. Ayrıca hücre-yüzey reseptörleri aracılığıyla hücreler ve dokular arasındaki iletişimi sağlar. Bağ doku iplikleri, peptit zincirlerinden oluşan proteinlerden meydana gelir. Kollajen, fibronektin, laminin, elastin ve proteoglikanlar önemli bağ doku iplikleridir [1].

ESM'nin temel bileşenlerinden biri olan kollajen, basit fibriler skleroproteinlerdir. Kollajen doku şeklini korur, dokuya dayanıklılık, destek ve gerilme direnci sağlar. Kollajenin diğer bir özelliği kanın pıhtılaşmasında görev alarak yara iyileşmesini sağlar. Kollajen, memelilerin vücut ağırlığının % 6'sını oluştururken bütün vücut proteinlerinin yaklaşık % 30'unu oluşturur. En fazla fibroblastlarda sentezlenmesinin yanı sıra osteoblast, odontoblast, kondroblastlar tarafından da sentezlenir. Kollajen kondroitin sülfatla 1:1 oranında birleşerek kıkırdağı; 9:1 oranında elastinle birleşerek tendonları; kendisinin dört katından çok kalsiyum fosfat ile birleşerek kemikleri oluşturur. Kendi oranında dermatan sülfat ile birlikte deride bulunurken 9:1 oranında ise elastinle birlikte bulunur. Kollajen dentinlerin organik matrikslerinde, göz korneasında, ligamentlerde ve dişlerde de bulunduğu yapılan araştırmalarda ortaya çıkmıştır. Kollajenler yapısal ve doku dağılımlarına göre farklı tiplere ayrılmaktadır (Tablo 1.1).



**Tablo 1.1:** Kollajen tipleri ve özellikleri [2, 3].

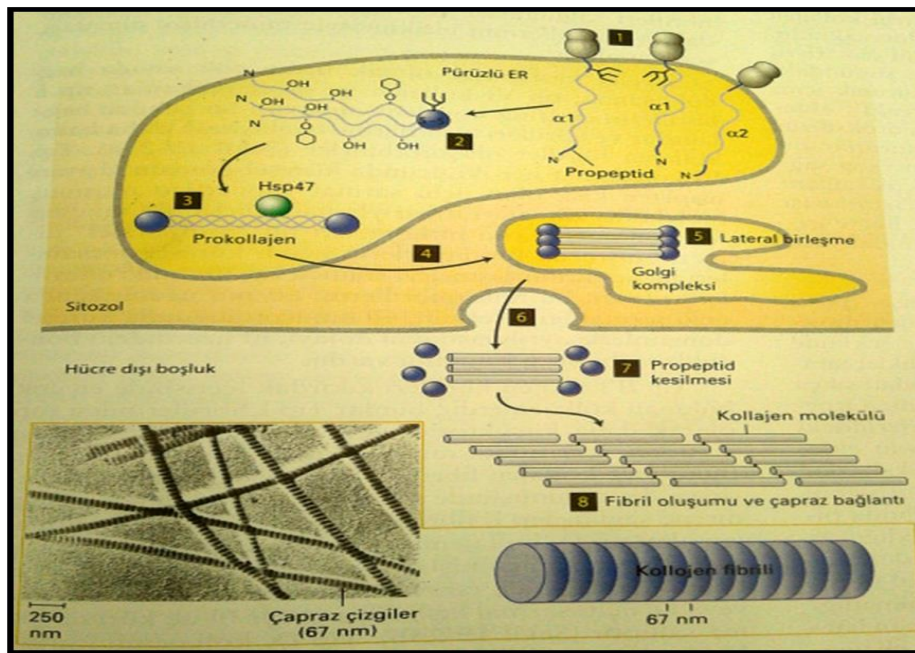
<b>Fibril Kollajenler</b>		
<b>Tip</b>	<b>Yapısal Özellikleri</b>	<b>Bulunduğu Dokular</b>
I	300 nm uzunlukta fibriller	Vücutta en fazla bulunup kollajen tiplerinin toplam % 30 kadarını oluşturur: Deri, tendon, kemik, ligament, intertisyel dokular
II	300 nm uzunlukta fibriller	Kıkırdak, camsı dokular
III	300 nm uzunlukta fibriller, çoğunlukla tip I' dönüşür	Deri, kas, kan damarları
IV	390 nm uzunlukta, küresel N-ucu uzantılı fibriller, çoğunlukla tip I'e dönüşür	Kornea, dişler, kemik, deri, düz kaslar, plesenta
<b>Fibril Bağlı Kollajenler</b>		
<b>Tip</b>	<b>Yapısal Özellikleri</b>	<b>Bulunduğu Dokular</b>
VI	Tip I ile lateral birleşmiş, periyodik küresel bölgeler	Ara dokuların büyük kısmı
IX	Tip I ile lateral birleşmiş, N-ucu küresel bölge; GAG bağlı	Kıkırdak, camsı dokular
<b>Tabaka Oluşturan ve Kenetleyici Kollajenler</b>		
<b>Tip</b>	<b>Yapısal Özellikleri</b>	<b>Bulunduğu Dokular</b>
IV	İki boyutlu ağ	Tüm bazal laminalar
VII	Uzun fibriller	Derinin bazal laminasındaki kısımlar
XV	Kondroitin sülfat proteoglikanların kor protein	Yaygın bulunur, kastaki bazal laminanın yakınındaki kısımlar
<b>Transmembran Kollajenler</b>		
<b>Tip</b>	<b>Yapısal Özellikleri</b>	<b>Bulunduğu Dokular</b>

Tablo 1.1: (devam).

XIII	İntegral zar protein	Derideki hemidesmozomlar
XVII	İntegral zar protein	Derideki hemidesmozomlar
Konak Savunma Kollajenleri		
Tip	Yapısal Özellikleri	Bulunduğu Dokular
Kollektinler	Üçlü sarmal oligomerleri, lektin domainleri	Kan, alveolar boşluk
Clq	Üçlü sarmal oligomerleri	Kan
Sınıf A süpürücü reseptörler	Homotrimerik zar proteinleri	Makrofajlar

### 1.1 Kollajen Biyosentezi ve İşlenmesi

Kollajen biyosentezi sırasında kollajenler, öncül molekül olarak sentezlenir ve sonrasında olgunlaşmak üzere işlenir. İlk olarak kollajen, bağ doku fibroblastlarında intrasellüler prekürsör molekül halinde sentezlenir. Sentezlenme aşamasında ilk olarak ortaya çıkan kollajen prekürsörü, preprokollajendir. Daha sonra sırasıyla çeşitli modifikasyonlar geçirerek olgun kollajen lifler meydana gelir.



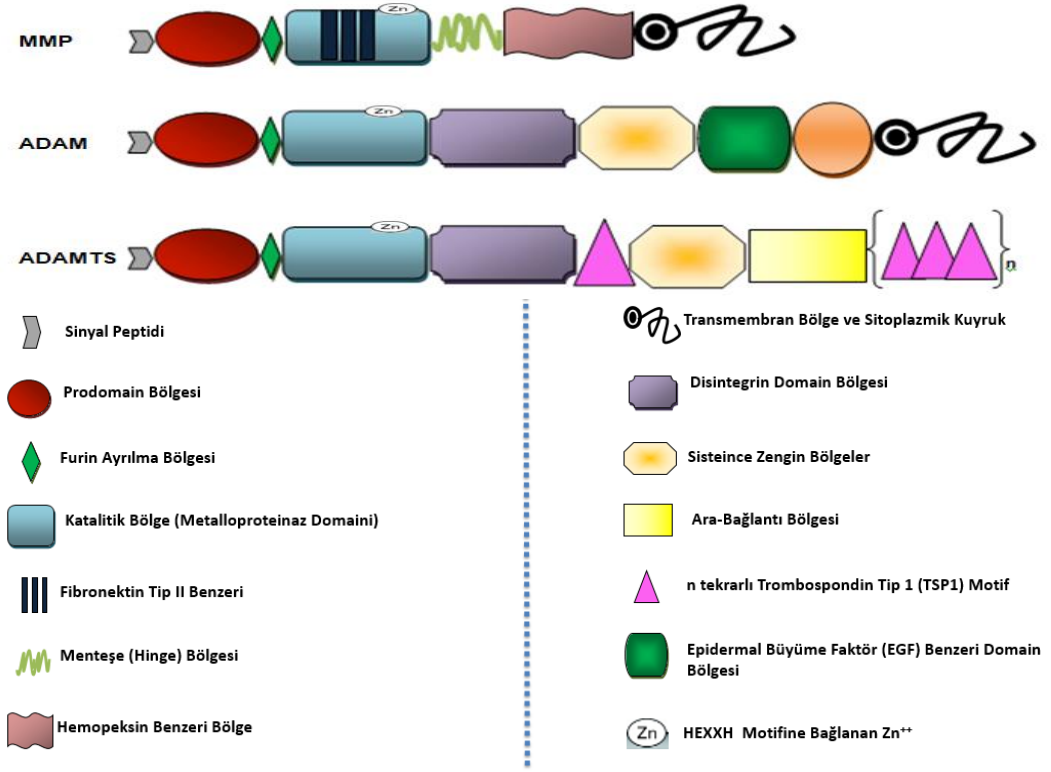
Şekil 1.1: Kollajen biyosentezi [4].

Şekil 1.1'deki kollajen biyosentezinin oluşum aşamaları: 1.adım: Preprokollajenler, granüllü endoplazmik retikuluma bağlı ribozomlar tarafından meydana getirilir. 2. adım: Propeptitler, trimerler oluşturmak üzere bir araya gelir ve disülfid bağları ile kovalent olarak bağlanırlar ve Gly-X-Y triplet tekrarları oluşur. Gly-X-Y triplet tekrarlarındaki bazı rezidüeller modifikasyon geçirir (bazı prolinler ve lizinler hidroksillenir, galaktoz veya galaktoz-glukoz hidroksilizinlere bağlanır). 3. adım: Modifikasyonlar ile üçlü sarmal yapılar oluşur ve bu yapıların stabilizasyonu için endoplazmik retikulumda preprokollajenlerin N-terminalinden sinyal peptidi ayrılır ve prokollajenler oluşur. Zincire şaperon proteini Hsp47 bağlanır ve prokollajenler katlanır. 4. ve 5. adım: Katlanmış prokollajenler golgi aygıtına gönderilir ve bu aygıt boyunca taşınırlar. Burada bazı lateral bağlantılar küçük lifler oluşturmak üzere birleşir. 6. Adım: Zincirler intrasellüler modifikasyonlarla prokollajen molekülü hidroksillenir ve glikozillenir daha sonra golgi kompleksi yoluyla hücre dışına salgılanır. 7. adım: Hücre dışına salgılanan prokollajenlerin N-terminal ve C-terminal propeptidleri çıkarılır: N-terminal peptitleri prokollajen aminoproteaz enzimini sentezleyen ADAMTS (A Disintegrin And Metalloproteaz With Trombospondin Motifs; Trombospondin Motifli Matriks Metalloproteazlar) gen ailesinden kollajen ADAMTS'ler (ADAMTS2, 3 ve 14) tarafından; C-terminal peptitleri ise, prokollajen karboksiproteaz enzimleri (BMP-1; kemik farklılaşma protein ve Tolloid-like 1) tarafından yıkıma uğratılır. Proteaz aktiviteler sonucunda tropokollajen molekülü oluşur. 8. adım: Tropokollajen molekülleri kovalent çapraz bağlantılar ile bir araya gelerek mikrofibrilleri oluşturur. Mikrofibrillerin paketlenmesi ile fibril yapısı oluşur ve son olarak fibril iplikçikleri kollajen liflerini meydana getirir [5].

## 1.2 ADAMTS Gen Ailesi ve Fizyolojik Fonksiyonları

Estrasellüler matriksin proteolitik işlenmesinde birçok proteaz aktivitesine sahip molekül rol oynar. Domain yapılarına göre bu moleküller çok sayıda protein ailesi olarak gruplandırılır (Şekil 1.2). İlk grup, serin proteazlar; doku plazminojen aktivatörü, trombin, plazmin, ve urokinazı bulundurur. İkinci grup, matriks metalloproteazlar (MMP); 23 üyeden oluşan yüksek oranda korunmuş  $Zn^{++}$  bağımlı endopeptidazlardır. Bu iki grup ESM yıkımında ve kanser metastasında rol alır.

Üçüncü grup, kemik farklılaşma protein 1/tolloid ailesi metalloproteazlarıdır. Dördüncü grup ise hücre-hücre adezyonu ve proteolizde görev alan ADAM (A Disintegrin and Metalloprotease; Disintegrin Metalloproteazları) olarak adlandırılan transmembran glikoproteinlerdir [6, 7].

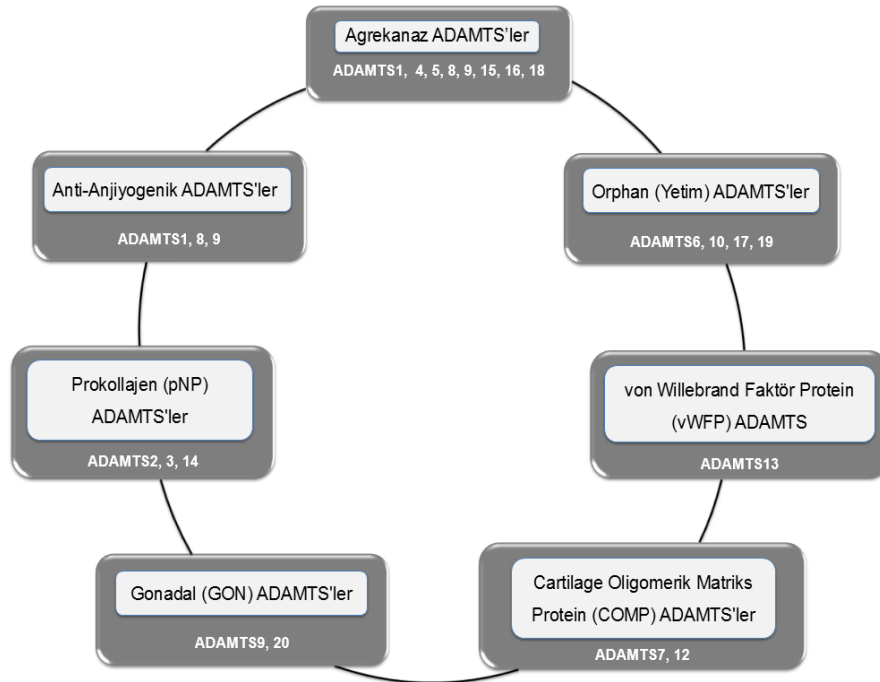


Şekil 1.2: MMP, ADAM ve ADAMTS'nin birbirine benzer ve ayrı yapısal özellikleri.

ADAM proteinleri büyük ölçüde tanımlandıktan sonra Kuno ve arkadaşları tarafından 1997 yılında ADAM ailesine benzer yeni bir grup protein bulunmuştur. Kuno ve arkadaşları farelere enjekte ettikleri bir hücre hattıyla kaşeksik kolon kanser modeli oluşturmuş ve bu kanser türünde ekspre olan genleri belirlemişlerdir. Bu çalışmada, ADAM protein ailesine çok benzerlik gösteren ayrıca trombospondin tip 1 (TSP1) motifleri taşıyan ve enflamasyonla ilişkili olan bir protein klonlanmıştır [8]. Daha sonraki çalışmalar *Caenorhabditis elegans*'da ve memelilerde yapılmıştır ve bu çalışmaların sonucunda araştırmacılar yeni üyeyi tanımlamak için ADAMTS adını kullanmışlardır. ADAMTS'ler ADAM ailesi üyelerinin aksine hücre membranında yer almazlar, ekstrasellüler matrikse salgılanırlar. ADAMTS'ler, ADAM ailesi

üyelerinin sahip oldukları bütün domainleri içerirler ancak ADAM'lardan farklı olarak kendilerine özgü TSP1 motifleri bulundurlar. ADAMTS'ler bu nedenle ADAM üyeleri içerisinde alınmamış ve yeni bir gen ailesi olarak kabul edilmiştir [9].

ADAMTS gen ailesine ait 19 üye tanımlanmıştır (Şekil 1.3). ADAMTS üyeleri protein dizisi, domainlerin organizasyonu, substrat tercihi ve gen dizisi korunmuşluğuna göre gruplandırılmıştır [10, 11]. Anti-anjiyogenik aktiviteye sahip olanlar: ADAMTS1, 8 ve 9, Agrekanazlar: ADAMTS1, 4, 5, 8, 9, 15, 16 ve 18, prokollajen N-proteazlar (pNP): ADAMTS2, 3 ve 14, Gonadal organ gelişiminde görev alanlar (GON): ADAMTS9 ve 20, von Willebrand faktörü kesen proteaz (vWFCP): ADAMTS13, Kıkırdak oligomerik matriks proteinler (COMP): ADAMTS7 ve 12'dir. Ailenin fonksiyonu ve substratları tam olarak aydınlatılamamış üyeleri olan Orphan (yetim) ADAMTS'ler: ADAMTS6, 10, 17, ve 19 olarak adlandırılmaktadır.

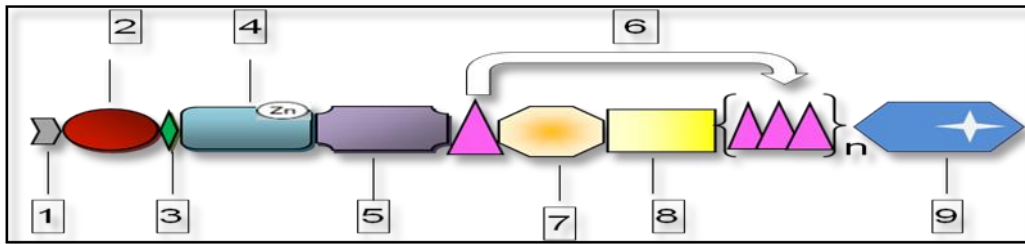


**Şekil 1.3:** ADAMTS gen ailesinin sınıflandırılması.

### 1.2.1 Kollajen ADAMTS'ler: Prokollajen N-propeptidazlar

Prokollajen N-propeptidazlar; ADAMTS2, 3 ve 14 olmak üzere üç üyeden oluşur. Prokollajen kesim izoenzimleri olarak bilinirler ve kollajen biyosentezinde önemli görev alırlar. ADAMTS2 geni 5. kromozomun uzun kolunda (5q35.3) lokalize olur ve 22 ekzona sahiptir. 134 kDa ağırlığındadır ve 1211 amino asitten oluşur [12]. ADAMTS3 geni 4. kromozomun uzun kolunda (4q13.3) lokalize olur ve 23 ekzona sahiptir. 135 kDa ağırlığındadır ve 1205 amino asitten oluşur. ADAMTS14 geni 10. kromozomun uzun kolunda (10q22.1) lokalize olur ve 22 ekzona sahiptir. 134 kDa ağırlığındadır ve 1226 amino asitten oluşur [13].

#### 1.2.1.1 ADAMTS2, 3 ve 14 Genlerinin Yapısal Özellikleri



Şekil 1.4: ADAMTS2, 3 ve 14 genlerinin domain bölgeleri.

ADAMTS2, 3 ve 14 genleri, aktif enzim içeren proteaz kısım ve trombospondin tekrarları içeren yardımcı yan modüllerden meydana gelirler (Şekil 1.4). Proteaz kısım; sinyal peptid (1), propeptid (2), furin ayrılma bölgesi (3), katalitik domain (4) ve disintegrin benzeri modüllerden (5) oluşur. Yardımcı yan modüller; trombospondin tekrarları (6) içeren kısım, sisteince zengin modül (7), ara-bağlantı bölgesi (8) ve PLAC (9) adı verilen kısımdan oluşur [13, 15]. Ayrıntılı domain organizasyonu ve üstlendikleri görevleri aşağıda verilmiştir;

**1. Sinyal Peptid Bölgesi:** Değişken amino asit uzunluğunda olup enzim sinyalizasyonunu başlatan peptid kısımdır.

**2. Propeptid Bölge:** Bu bölge enzimin substrat ile etkileşmesini engeller ve enzimi inaktif halde tutmayı sağlar [16].

**3. Furin Ayrılma Bölgesi:** Furin enzimi propeptid bölgesini kesip uzaklaştırarak ADAMTS enziminin aktifleşmesini sağlar ve bu olay zimojen aktivasyonu olarak adlandırılır [17].

**4. Katalitik Bölge:** Katalitik bölge denilen yer metalloproteaz kısımdır ve enzim aktivitesini sağlar. Çinko bağlama bölgesine ve aktif motif dizisine sahiptir. Aktif motif, "HEXXHXXGXXHD" dizisinden oluşur. Burada X herhangi bir amino asidi ifade eder. Aktif motifte herhangi bir mutasyon olursa katalitik aktivite kaybolur [18].

**5. Disintegrin Benzeri Bölge:** Hücre-matriks bağlanma süreçlerinde görev alır. Disintegrin bölgede, integrin ile bağlanmayı sağlayan arjinin/glisin/aspartik asid (RGD) tanıma sekansı bulunur ve ADAMTS aktivitesi için gerekli bir kısımdır [19].

**6. Trombospondin 1 (TSP 1) Bölgesi:** ADAMTS'lere ismini veren bu bölge, 1971 yılında keşfedilen ilk anjiyogenez inhibitörüdür [20]. TSP1, trombositlerden salınan estrasellüler matriks adezyon glikoproteinidir. TSP1 motifi kollajen, fibronektin ve laminin gibi hücre dışı matriks moleküllerine bağlanarak hücre-hücre ve hücre-matriks etkileşimlerini sağlar.

**7. Sisteince Zengin Bölge:** Substrat spesifliğinde ve matrikse yerleşme mekanizmalarında rol alır [21].

**8. PLAC (Proteinase and lacunin; Proteaz ve lasunin) Motifi:** Kanat oluşumu ve embriyonik gelişimde epitel hücrelerin şekillenmesinde görev yapar. ADAMTS2, 3, 10, 12, 14, 17 ve 19 gibi birçok ADAMTS ailesinde bu motife rastlanır [22].

### **1.3 ADAMTS2 Geni**

Ailenin aydınlatılan ikinci üyesi olduğu için ADAMTS2 olarak adlandırılır. Bilinen diğer isimleri; "ATS2\_HUMAN, HPCPNI, NPI, PCINP, PCPNI, pNPI, Procollagen I/II amino-propeptide processing enzyme, a disintegrin-like and metalloprotease (reprolysin type) with thrombospondin motifs 2, Procollagen I N-proteinase, Procollagen N-endopeptidase" olarak literatürde geçmektedir [23, 24].

#### 1.4 ADAMTS2 Gen Mutasyonları ve Hastalıklarla İlişkisi

ADAMTS genlerinin sentezi esnasında bazı hatalar sonucu hastalıklar meydana geldiği görülmüştür (Tablo 1.2).

**Tablo 1.2:** İnsanlarda görülen ADAMTS mutasyonları sonucu hastalıklar, substratları ve sentezlendikleri dokular [25].

Gen İsmi	Hastalık	Substrat	Sentezlendiği Dokular
ADAMTS1	Kanser (anti-tümörigenik/metastatik) anti-anjiyogenik	Brevikan, heparin-bağlayıcı EGF, TGF- $\alpha$ , Nidogen1/2, Desmokolin-3, Distroglikan-1, Agrekan, Semaforin-3C, Versikan, MAC2 bağlayıcı protein, TFPI-2, amfiregülin, sendekan-4,	Kıkırdak, Kalp, Böbrek
<b>ADAMTS2</b> ★	EDS Tip VIIC, Dermatosparaksis (koyunda), Oİ, dentin hastalıkları	Fibriler prokollajenler (tip I-III ve V)	Kemik, Diş, Tendon, Cilt, Deri,
ADAMTS3	-	Fibriler prokollajen (tip II), biglikan	Kıkırdak, Beyin
ADAMTS4	Artrit	Reelin, Versikan, Brevian, Matrilin-3, Agrekan, COMP, Hevin	Kıkırdak, Beyin, Kalp
ADAMTS5	Artrit, kanser (anti-tümörigenik, anti-anjiyogenik)	Agrekan, Versikan, Brevian, Nörokan, $\alpha$ 2-makroglobulin, Matrilin-4	Plesenta, Uterus, Kıkırdak
ADAMTS6	-	-	Plesenta
ADAMTS7	Koroner arter hastalığı (düz kas hücresi göçü)	COMP	-



Tablo 1.2: (devam).

ADAMTS8	-	Agrekan	Kalp, Akciğer
ADAMTS9	Kanser (anti-anjiyogenik)	Versikan, Agrekan	Kıkırdak
ADAMTS10	WMS	Fibrillin-1	-
ADAMTS12	Kanser (anti-tümorigenik)	COMP	Akciğer
ADAMTS13	TTP	vWF	Prostat, Beyin, Karaciğer
ADAMTS14	-	Fibriler prokollajen (tip I pN $\alpha$ 1 ve pN $\alpha$ 2 zinciri)	Uterus, Beyin
ADAMTS15	Kanser (anti-tümorigenik/metastatik) anti-anjiyogenik	Versikan, Agrekan	Böbrek, Karaciğer
ADAMTS16	Hipertansiyon	Agrekan	Prostat, Uterus, Beyin
ADAMTS17	WMS	-	Karaciğer, Prostat, Beyin
ADAMTS18	-	Agrekan	Prostat
ADAMTS19	-	-	Akciğer
ADAMTS20	-	Versikan	Testis, Beyin

Tablo 1.2’de görüldüğü üzere ADAMTS gen aileleri içerisinde ADAMTS2 geninde oluşan anomaliler nedeniyle Ehlers-Danlos sendromu başta olmak üzere çeşitli hastalıklar meydana gelmektedir. ADAMTS2 hastalıkları ile ilgili detaylı bilgiler aşağıda verilmiştir.

#### 1.4.1 Ehlers-Danlos Sendromu (EDS)

Ehlers-Danlos sendromu tipi ilk kez büyükbaş hayvanlarda ve daha sonra koyunda tanımlanarak dermatosparaksis, insanlarda tanımlanarak EDS tip VIIC adını almıştır. Bu bağ doku hastalığı dermisteki tip I prokollajenin propeptid kısmının uzaklaştırılmaması nedeniyle kollajen sentezinde hatalara neden olur. Sonuç olarak

yara iyileşmesinde gecikme, ciltte morarma ve eklem laksisitesi, aşırı elastik ve kırılğan deri tabakası meydana gelir [26].

## **1.4.2 Diğer Hastalıklar ve Hastalıkların Dentin Efektleri İle İlişkisi**

### **1.4.2.1 Osteogenesisiz İmperfekta (Oİ)**

Heterojen tip I kollajenin kalıtsal anomalilerini içeren kalıtsal otozomal resesif ya da otozomal dominant bağ doku hastalığıdır. Kemik kırılğanlığında artma, gevşek eklemler, opalesant dişler, işitme kaybı, kemik deformiteleri görülebilir [27, 28].

### **1.4.2.2 Goldblatt Sendromu**

Col2A1 geninde mutasyonlar sonucunda meydana gelir ve sonuçta dentinogenesis imperfekta (DGI), eklem problemleri ve dentin displazisi (DD tip II) sendromları ortaya çıkabilir [29].

### **1.4.2.3 Seckel Sendromu**

Nadir görülen otozomal resesif bir hastalıktır. Bu sendrom mikrosefali, kuş yüzü görünümü, kısa boy, mental retardasyon ile karakterizedir ayrıca dentin anomalileri olarak şiddetli mikrodonti, opalesant dişler ve köksüz büyük azı dişler gibi sorunlar ortaya çıkmasına neden olur [30].

### **1.4.2.4 Ailesel Hipofosfatemik Vitamin D Dirençli Raşitizm**

Hipofosfatemiya büyüme-gelişim geriliği, osteomalik kemik hastalığı, raşitik ve böbreğe bağlı defektler ile karakterizedir. Ayrıca histolojik çalışmalarda belirgin globüler dentinle birlikte predentin kalınlaşmasına neden olduğu bulunmuştur [31].

#### **1.4.2.5 Hiperfosfatemik Ailesel Tümorale Kalsinosis**

Büyük eklemlerin etrafında geniş, kalsifiye, ağırlı yumuşak doku kitlesi ile karakterize otozomal resesif bir hastalıktır. Omuz, kalça ve dirsek arkasında lokalize olan ailesel metabolik bir hastalıktır. Dişlerin kök uzunluğunda azalma ve daimi dişlerde sürme gecikmesine neden olduğu da bilinmektedir [32].

#### **1.4.2.6 Schimke İmmünoosseöz Displazi**

Spondiloepifizial displazi, böbrek fonksiyon bozukluğu ve immün yetersizlik ile karakterizedir. Otozomal resesif olan bu hastalık dişlerde sarımsı gri renk değişikliği ve süt dişler ile daimi azı dişlerde servikal daralmaya neden olur. Ayrıca bu sendroma sahip olan kişilerin pulpa odaları küçük veya tıkalıdır. Mine ve dentin normalden daha yumuşaktır [33].

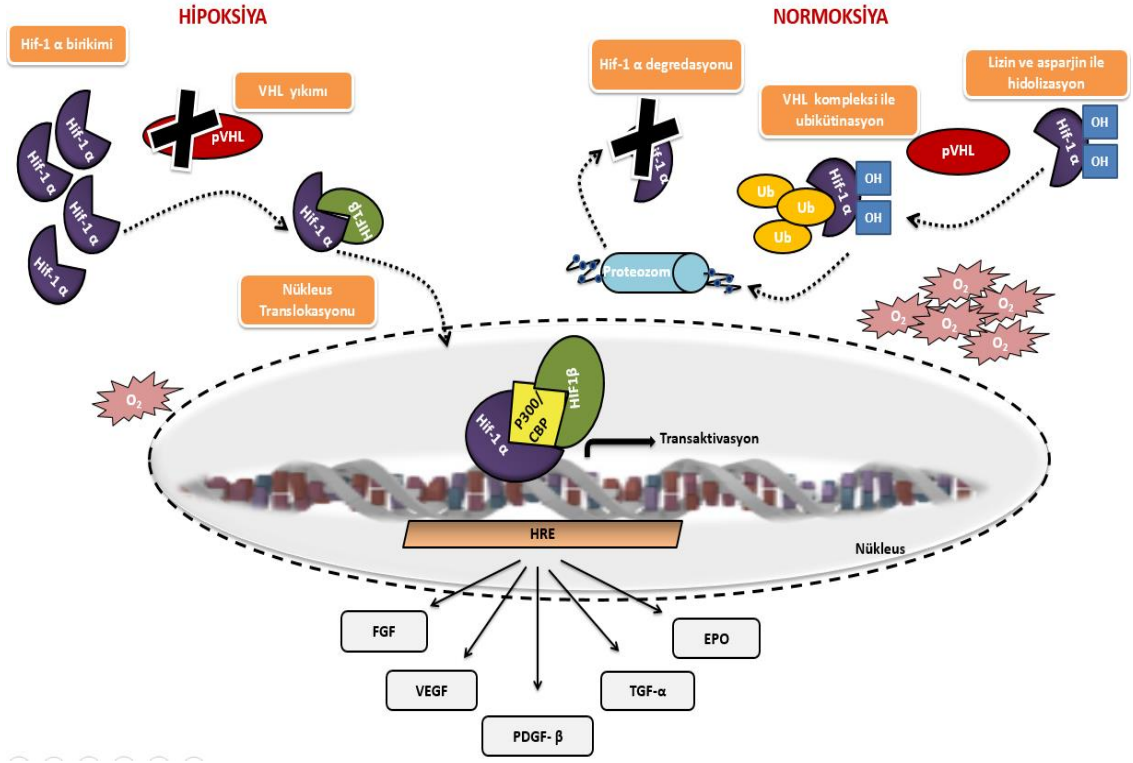
### **1.5 Hipoksiya**

#### **1.5.1 Hipoksiya ile İndüklenebilir Faktör (Hif)**

Hipoksik koşullarda vücutta iki ana sinyalizasyon sistemi devreye girer: AMPK yolağı (AMP activated protein kinase; adozin monofosfat aktive eden protein kinaz) ve Hif yolağı (hypoxia inducible factor; hipoksiya ile indüklenebilir faktör) [34]. Hücre içi ATP düzeyi azaldığında AMPK yolağı aktive olarak katabolik süreçleri hızlandırır ve anabolik süreçleri inhibe eder. Hif ise oksijen yetersizliği (hipoksi) durumunda memeli hücrelerinde hücresele yanıt oluşturur [35].

Oksijen algılama mekanizmasında “Von Hippel Lindau” molekülü görev alır (Şekil 1.5). Hipoksiyada anahtar rol oynayan Hif üyelerinden Hif-1’in önemli fonksiyonları vardır. Hif-1 oksijene hassas birim olan  $\alpha$  ve yapısal alt birim olan  $\beta$ ’dan oluşur. Hif-1’in nükleer  $\alpha$  alt ünitesi yapısal olarak işlev görürken  $\alpha$  alt ünitesi regülatör bileşen olarak işlev görür. Hif-1  $\alpha$  alt ünitesi normal durumlarda kararsızdır ve bir süre sonra Von Hippel Lindau E ubiquitin ligaz kompleksinin bir parçası olan pVHL ile parçalanır ve hidrolize olur. Hipoksik koşullarda ise Hif-1  $\alpha$  proteozomal yıkımdan kaçır, sitozolde birikir, kararlı hale gelir, fosforillenir ve nükleusa geçerek

heterodimerik bir kompleks meydana getirir. Bu kompleks hipoksiya ile indüklenebilen genlerin güçlendirici bölgesi ile bağlanır ya da promotor bölgesinde 50 baz çiftli bir DNA bağlanma motifi olan HRE (hypoxia response element; hipoksiya yanıt elementi) ile bağlanır ve hedef genlerin transkripsiyonlarını başlatır [36, 37].



**Şekil 1.5:** Normoksik ve hipoksik koşullarda hücresel yanıtlar.

Hücrede hipoksiya ile beraber, başta Hif-1 olmak üzere eritropoietin (EPO), fibroblast büyüme faktörü (FGF), tranferrin, laktik dehidrojenaz A, vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF), trombosit kökenli büyüme faktörü (PDGF) ve endotelin-1 gibi gen yolları aktive olur. Hipoksiya dışında NO, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , anjiyotensin II gibi birçok neden Hif artışına sebep olur ve çeşitli mekanizmalara katılır [38].

**Tablo 1.3:** Hif hedef genleri [39].

<b>Sistem</b>	<b>Hedef Gen</b>
Apoptozis	Wilm tümör supressör, IGFBP-1
Demir metabolizması	Transferin, transferin reseptörü, serloplazmin, eritropoietin
Eritrosit üretimi	Eritropoietin
ESM regülasyonu	PAL-1, TIMP
Glukoz ve enerji metabolizması	Glukoz transporter, laktat dehidrogenaz (LDH), aldolaz, gliseraldehid 3 fosfat dehidrogenaz kinaz 1 (PDK1), enolaz, heksokinaz
Hücre proliferasyonu, diferansiasyonu ve yaşayabilirliği	Nip3, insülin benzeri büyüme faktörü 1 ve 3, (TGF- $\beta$ ), p21, siklin G2, transforme büyüme faktörü- $\beta$ 3
Kan damarlarının oluşumu ve düzenlenmesi	Endotelin-1, vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF), adrenomedullin, nitrik oksit sentaz-2, hemeoksijenaz 1,
Migrasyon, multilite	CXCR4, c-met
pH düzenlenmesi	Karbonik anhidraz 9 ve 12
Vazomotor düzenleme	Endotelin-1, iNOS, hemoksijenaz, ANP

## 1.6 Kimyasal Hipoksiya

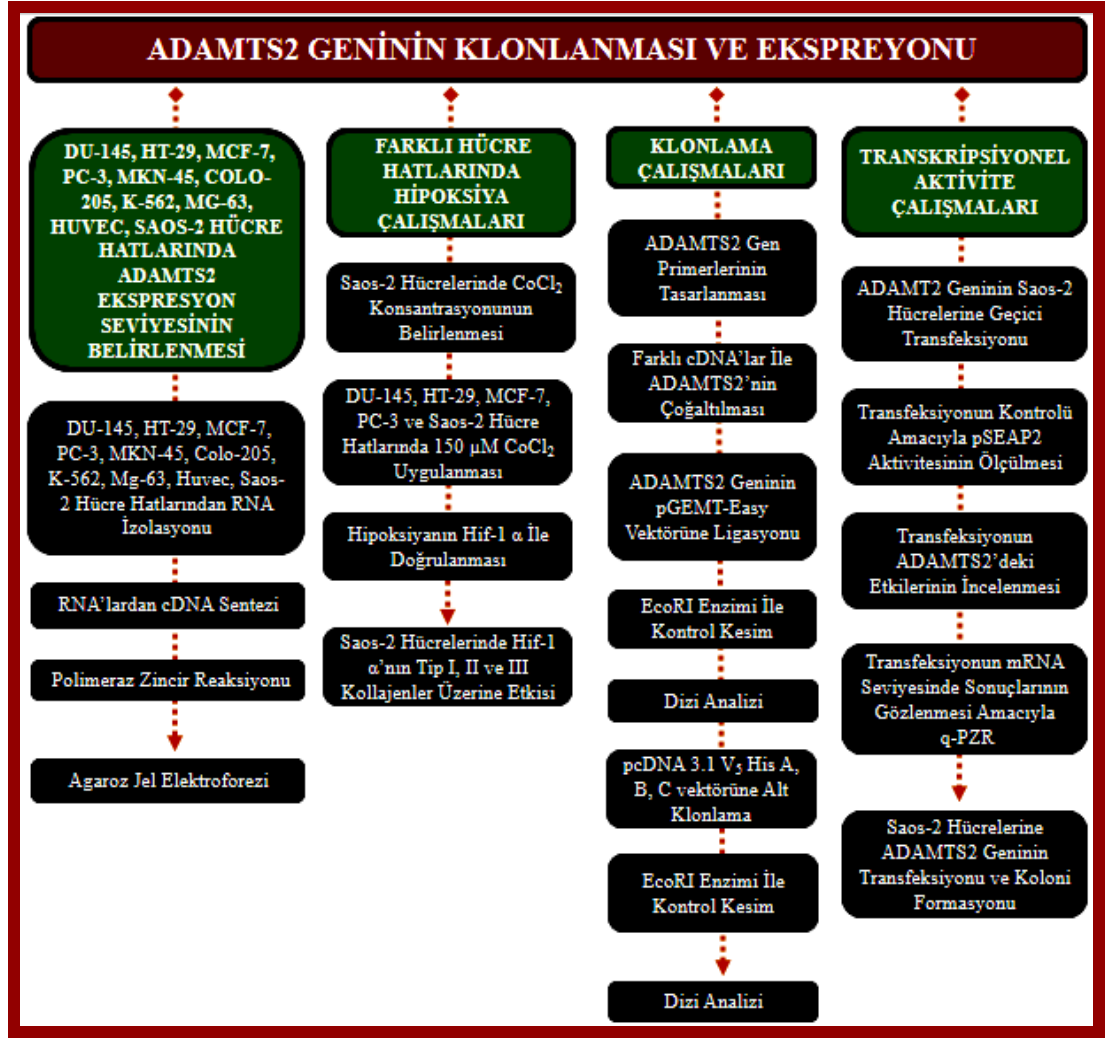
Kimyasal hipoksiya modeli, memeli hücrelerinde düşük oksijen koşullarındaki biyokimyasal ve moleküler cevap oluşturması nedeniyle düşük oksijen koşullarını taklit etmede kullanılmaktadır. Kimyasal hipoksiya modeli oluşturulurken kobalt klorür ( $\text{CoCl}_2$ ) solüsyonu kullanılmıştır.  $\text{CoCl}_2$  Hif-1'i indükleyen açık kırmızı renkli kimyasal bir maddedir. Hücre ortamına verilen  $\text{CoCl}_2$ , normal oksijen koşullarında Hif-1'i inhibe eden prolin hidroksilazlara bağlanarak onların aktivitesini durdurur. Böylece Hif-1 hidroksillenir ve degrade olur. Oksijen azlığında ise Hif-1 hidroksillenmez ve kararlı hale geçer. Böylece Hif-1 hipoksiya ile regüle olan diğer genleri uyararak ekspresyon düzeylerini azaltır ya da artırır.

## 1.7 Çalışmanın Amacı

ADAMTS2 ile yapılan literatür çalışmaları göstermektedir ki ADAMTS2 proteini hücre için kollajen biyosentezinde olduğu kadar kanserleşme sürecinde de önemlidir. Kollajen biyosentezi oldukça karmaşık bir süreç olup çok sayıda protein bu sürece katkı sağlamaktadır. Yrd. Doç. Dr. Meltem Alper'in doktora tezinde "ADAMTS2 geninin transkripsiyonel regülasyonu" çalışılmış ve ADAMTS2 promotorunun nasıl regüle edildiği, sitokinlerce hücrel cevabın mRNA ve protein düzeyinde nasıl değiştiği aydınlatılmıştır. Yapılan bu çalışmalar yüksek lisans tez çalışmasına ışık tutmuştur. Yrd. Doç. Dr. Sümeyye Aydoğan Türkoğlu danışmanlığında ve Prof. Dr. Feray Köçkar eş danışmanlığında yapılan yüksek lisans çalışmasında ADAMTS2'nin farklı hücre hatlarında ekspresyon seviyelerinin incelenmesi ile Saos-2 hücrelerinde ADAMTS2'nin yüksek ekspre olduğu belirlendi. ADAMTS2 gen klonlama çalışmaları gerçekleştirildi ve ökaryotik bir vektöre klonlandı. Ektopik ifadesinin hücrel düzeyde etkilerinin araştırılması için rekombinant ADAMTS2'nin Saos-2 hücrelerine transfeksiyonu gerçekleştirildi. ADAMTS2 çalışmalarında kollajen sentezi ile ilgili çalışmaların yanı sıra ADAMTS2'nin anti-anjiyogenik özelliği ile ilgili anjiyogenik çalışmalar da gerçekleştirilmiştir. Anjiyogenezi uyaran transkripsiyon faktörü Hif-1  $\alpha$  ile farklı hücre hatlarında ADAMTS2'nin hipoksik regülasyonu incelenmiştir. Hipoksik regülasyona uğrayan genlerin etkileri ve hücrel cevapları araştırılmıştır. Hem kollajen sentezi hem de hipoksik çalışmalar dikkate alınarak yüksek lisans tez çalışmasının amaçları maddeler halinde ve akış diyagramı şeklinde aşağıda verilmiştir.

- i. **"Farklı kanser hücrelerinde ADAMTS2 ifadesi nasıldır"** sorusuna cevap oluşturmak üzere farklı hücre hatlarında ADAMTS2 ifadesi incelenmiştir. RT-PZR tekniği kullanılarak ADAMTS2'nin farklı hücre hatlarındaki ekspresyon profilleri insan Beta 2 Mikroglobulin ( $\beta$ 2M) geni ile karşılaştırılarak belirlenmiştir.
- ii. **"Farklı kanser hücrelerinde hipoksik koşullardaki ADAMTS2 ifadesi değişmekte midir"** sorusuna cevap oluşturmak üzere seçilen hücre hatlarında kimyasal hipoksiya oluşturulmuş ve 24, 48, 72 saat zaman dilimlerinde ADAMTS2'nin normoksiya ve hipoksiya ifadeleri mRNA düzeyinde gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu ile belirlenmiştir.

- iii. **“Hipoksik koşullarda kollajen tiplerinin ifadeleri nasıl değişmektedir”** sorusuna cevap oluşturmak üzere Saos-2 hücreslerinde 24, 48 ve 72 saat hipoksiya ve normoksiya çalışmaları gerçekteştirilmiştir. Hipoksiya ifadeleri mRNA düzeyinde incelenmek üzere kollajen tip I, II ve III primerleri kullanılarak q-PZR gerçekteştirilmiştir.
- iv. **“Saos-2 hücrelerinde ADAMTS2’nin arttırılmış ektopik ekspresyonu hücreleri hangi yollara sürüklemektedir”** sorusuna cevap oluşturmak için ADAMTS2 geninin önce pGEMT-Easy vektörüne sonra da ökaryotik hücrelerde çalışmak üzere ökaryotik ekspresyon vektörü olan pcDNA 3.1 V<sub>5</sub> His A vektörüne klonlanması gerçekteştirilmiştir. Daha sonra model olarak seçilen Saos-2 hücre hattına geçici transfeksiyon için rekombinant ADAMTS2 transfekte edilerek hücrelerde oluşan cevaplar araştırılmıştır.
- v. **“ADAMTS2 içeren Saos-2 hücrelerinin koloni oluşumu nasıl řekillenmektedir”** sorusuna cevap oluşturmak için Saos-2 hücrelerine geçici transfeksiyon gerçekteřtirilmiřtir ve transfeksiyon sonucunda Saos-2 hücrelerinde ADAMTS2’nin koloni oluřumuna etkisi gözlenmiştir.



**Şekil 1.6:** Yüksek lisans tez çalışmasının akış diyagramı.



## **2. MATERİYAL-METOD**

### **2.1 Laboratuvarlarda ve Laboratuvar Çalışmalarında Kullanılan Malzemelerin Temizliği**

Öncelikli olarak sağlık güvenliği için çalışmalarda gerekli tüm önlemlerin alınmasına hassasiyet gösterilmiştir.

Laboratuvarların düzenli periyotlar halinde okul ve laboratuvar görevlileri tarafından temizliği sağlanmıştır.

DNA, RNA ve bakteri tabanlı çalışmalarda kullanılan cam ve ısıya dayanıklı malzemeler, pipet uçları ile birlikte uç kutuları, ependorflar, santrifüj tüpleri, steril olması gereken solüsyonlar 121°C’de 20 dakika (1,02 atm basınç ile) otoklavda steril edildi. % 70’lik etil alkol ile çalışma ortamı ve malzemelerin sterilizasyonu sağlandı.

Hücre kültürü çalışmalarının temizliğinde ise UV lambası açılarak hücre kültürü laboratuvarı ve laminar air flow steril edildi. Laminar air flow ve CO<sub>2</sub>’li inkübatör periyodik olarak çamaşır suyu ve % 70’lik etil alkol ile temizlendi. İnkübatör içerisindeki ortamın nemli kalması amacıyla düzenli olarak inkübatör su tablasına otoklavlanmış su konuldu. Kültürdeki ısıya dayanıklı ependorflar, pipet uçları ve uç kutuları, solüsyonlar ve diğer malzemeler 121°C’de 20 dakika otoklavlanarak steril edildi. Steril edilmeye uygun olmayan solüsyonların sterilizasyonu ise 0,22 mikronluk filtreler kullanılarak gerçekleştirildi.

### **2.2 Çalışmalarda Kullanılan Malzemeler**

Hücre kültürü, DNA, RNA, bakteri, hücre kültürü ve transkripsiyonel aktivite çalışmalarında kullanılan malzemelerin listesi Tablo 2.1’de belirtilmiştir.

**Tablo 2.1:** Çalışmalarda kullanılan malzemeler ve temin edildikleri firmalar.

<b>DNA Çalışmalarında Kullanılan Malzemeler</b>	<b>Firma</b>
Agaroz	Sigma
Alkalen fosfataz	Fermentas
Etidyum bromür (Et-Br)	Sigma
Jelden geri kazanma kiti	Thermo Scientific-GeneJET Gel Extraction Kit
Ökaryotik vektör sistemi	Fermentas
pGEM-T Easy vektör sistemi	Promega
PZR bileşenleri (Taq Polimeraz enzimi, MgCl <sub>2</sub> , Taq buffer, dNTP karışımı)	Fermentas
Restriksiyon endonükleaz enzimleri	Fermentas
T4 DNA ligaz	Fermentas
<b>Bakteri Çalışmalarında Kullanılan Malzemeler</b>	
Ampisilin	Sigma
CaCl <sub>2</sub>	Sigma
Gliserol	Sigma
Kompetant bakteri soyu	DH5α kompetant hücre soyu
LB agar	Invitrogen
Luria Broth (LB)	Sigma
Maxiprep kiti	Thermo Scientific-GeneJET Plasmid Maxiprep Kit
Miniprep kiti	Thermo Scientific-GeneJET Plasmid Miniprep Kit
SOC (Super Optimal Broth)	Sigma
<b>Hücre Kültürü Çalışmalarında Kullanılan Malzemeler</b>	
Dimetilsülfoksit (DMSO)	Merck
Dulbecco's Modified Eagle's Medyum (DMEM)	Gibco
Fetal sığır serumu (FCS)	Sigma
Fosfat tamponu tabletleri (PBS)	Sigma
L-glutamin	Sigma

Tablo 2.1: (devam).

Tripan mavi solüsyonu	Sigma
Tripsin-EDTA	Sigma
<b>Transkripsiyonel Aktivite Çalışmalarında Kullanılan Malzemeler</b>	
4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineetansülfonik asit (HEPES )	Sigma
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Sigma
pSEAP2 substratları	Clontech
<b>RNA Çalışmalarında Kullanılan Malzemeler</b>	
3-(N-morpholino) Propanesülfonik Asit (MOPS)	Merck
Diethylpyrocarbonate (DEPC)	Sigma
Formaldehit	Sigma
Reverse transkriptaz	Fermentas
RNA izolasyon kiti	GeneJET RNA Purification Kit
SYBR® green PZR master mix	Sigma
β-Merkaptoetanol	Sigma

### 2.3 Çalışmalarda Kullanılan Araç-Gereçler

Tablo 2.2: Çalışmalarda kullanılan araç-gereçler.

Araç-Gereçler	Model
-80°C derin ultralow freezer	Sanyo, Japonya
96 kuyulu plaka okuyucu spektrofotometre	Bio-Tek
Buz makinesi	Fiocchetti Frigoriferi Scientifici, İtalya
Buzdolabı	Profilo, Türkiye
Çalkalamalı inkübatör	Shel-Lab, USA
CO <sub>2</sub> 'li inkübatör	Nuair
Elektroforez	Apelex, İngiltere
Elektroforez güç kaynağı	Consort, İngiltere

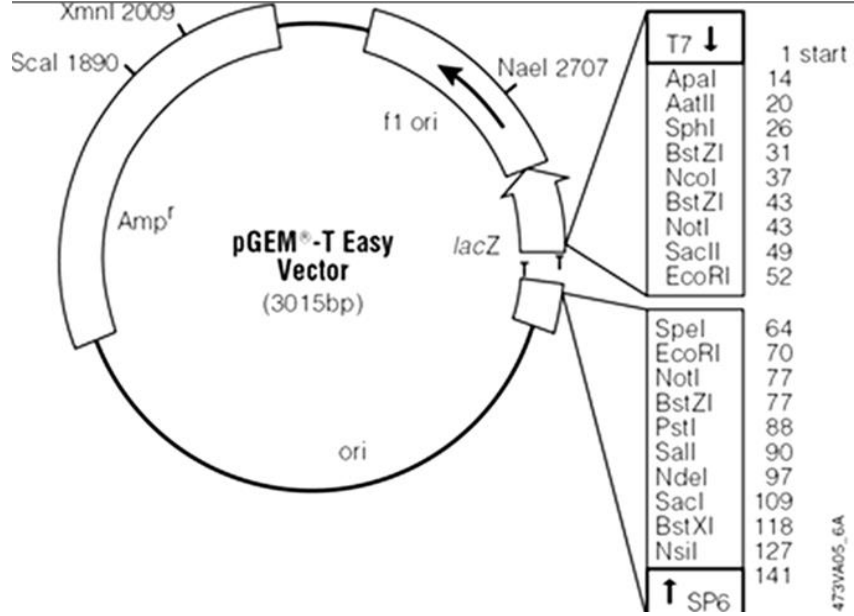
Tablo 2.2: (devam).

Elektronik tartı	Sartorius, Almanya
Etüv	WTB, German, Nüve, Türkiye
Hassas terazi	Sartorius
Horizontal çalkalayıcı	GFL, Almanya
İnverted mikroskop	Nikon
Isı kontrollü çalkalamalı etüv	GFL, Almanya
Isıtıcı blok	FALC, İtalya
Isıtmalı manyetik karıştırıcı	Velp Scientifica, İspanya
Jel görüntüleme sistemi	Bioimaging Systems
Laminar air flow	Telstar BIOII, İspanya
Light cyler 485	Roche Diagnostics
Luminometre	Thermo
Mikro santrifüj	Sigma Laborzentrifugen, Germany
Otoklav	Hirayama, Japonya
Otomatik pipetler	Finnpipette
pH metre	WTW, Almanya
PZR cihazı	Thermo
Qubit	Invitrogen
Saf su cihazı	Destilasyon 3.1 (Comecta Sa)
Santrifüj	Hettich Zentrifugen, Germany
Sıcak su banyosu	Elektro-mag, Türkiye
Thermo cyler	Techne Progene, İngiltere
UV visible spektrofotometre	Heios $\alpha$ (Unicam), Metro lab
Vorteks	Elektro-mag, Türkiye

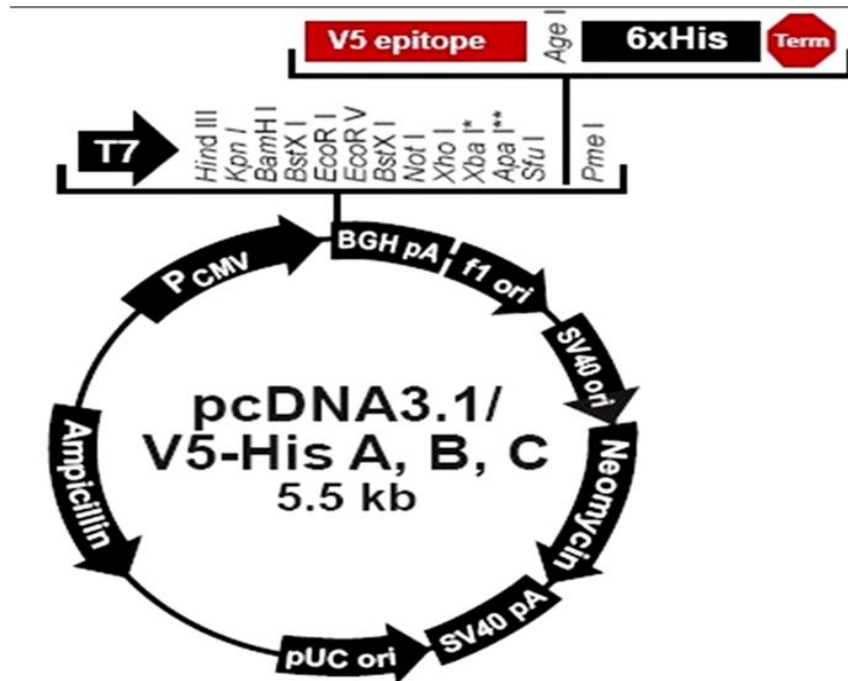
#### 2.4 Çalışmalarda Kullanılan Vektörler

Gen klonlaması için öncelikle pGEM-T Easy vektör sistemi kullanıldı (Şekil 2.1). Daha sonra ökaryotik hücrelerdeki ekspresyon düzeylerinin gözlenmesi amacıyla alt klonlama basamağı gerçekleştirildi. Alt klonlama çalışmasında ökaryotik pcDNA 3.1 V<sub>5</sub> His A, B, C vektör sistemi kullanıldı (Şekil 2.2).

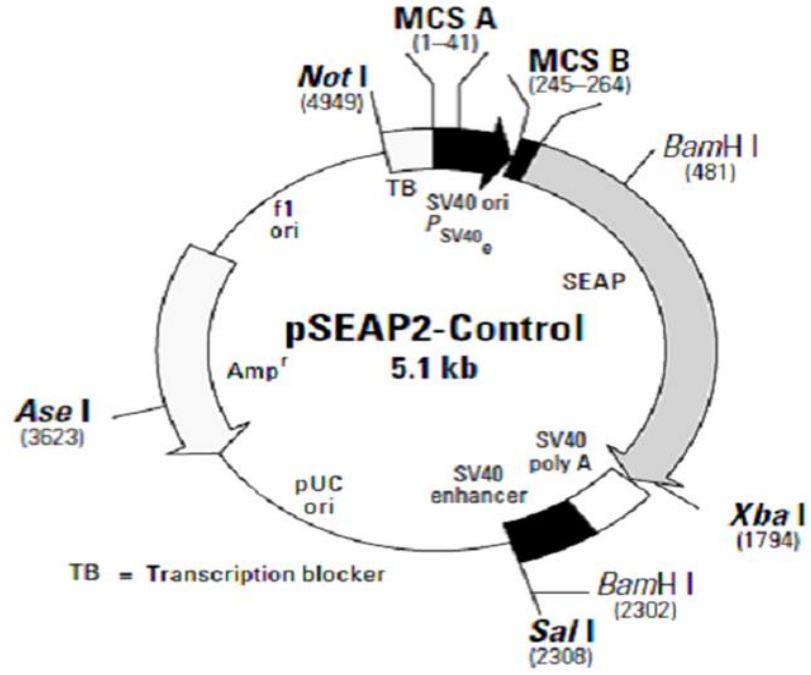
Transfeksiyon çalışmalarının normalizasyonu ve kontrolü amacıyla pSEAP2 kontrol vektörü kullanıldı (Şekil 2.3).



Şekil 2.1: pGEM-T Easy (Promega) vektör haritası ve klonlama bölgeleri.



Şekil 2.2: pcDNA 3.1 V<sub>5</sub> His A, B, C (Fermentas) vektör haritası ve klonlama bölgeleri.



Şekil 2.3: pSEAP2 kontrol (Clontech) vektör haritası.

## 2.5 DNA Çalışmaları ile İlgili Teknikler

### 2.5.1 ADAMTS2 Klonlama Primerlerinin Tasarlanması

Primer tasarımı için öncelikle insan ADAMTS2 genine ait muhtemel gen bölgesi “NCBI” gen bankasında bulunan kayıtlardan yararlanılarak belirlendi. Primerler tasarlanırken saç tokası analizi, T<sub>m</sub> analizi, % GC analizi ve NCBI-blast analizleri yapıldı.

Tablo 2.3: ADAMTS2 klonlama primerleri ve özellikleri.

ADAMTS2 Primerleri	Primer Dizileri
ADAMTS2 Forward	5' <u>GAATGGATCCGCCGGCGGGAGC</u> '3
ADAMTS2 Reverse	5'TCAGGCGATCCACCTACCTTGCC'3

### 2.5.2 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

50 µL son hacimde polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) gerçekleştirildi. Reaksiyon ürünleri olarak enhancer reaksiyon ürünleri (Betain, 7 Deaza GTP, DMSO) ve diğer PZR bileşenleri (Tablo 2.4) kullanıldı.

İstenilen DNA bantları için çeşitli PZR optimizasyonları (gradient PZR) uygulandı. PZR sonuçlarının görüntülenmesi amacıyla agaroz jel elektroforezinde yürütülerek sonuçlar kaydedildi.

**Tablo 2.4:** PZR ürünleri ve miktarları.

PZR Bileşenleri ve Son Konsantrasyonları	Miktarları
Kalıp DNA...3 µg	6 µl
Forward primer...100 ng/µl	1 µl
Reverse primer...100 ng/µl	1 µl
dNTP karışımı...200 mM	1 µl
MgCl <sub>2</sub> ...1 mM, 2 mM ve 3 mM	2 µl, 4 µl, 6 µl
Taq buffer (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, pH 9.0, % 1 (v/v) Triton X-100)...1X	5 µl
Taq DNA polimeraz...1 U/µl	1 µl

**Tablo 2.5:** PZR sıcaklık gradientleri.

Döngü Sayısı	Segment	Sıcaklık	Süre
1	Başlangıç Denatürasyonu	94°C	3 dk
35	Denatürasyon	94°C	1 dk
	Bağlanma Sıcaklığı (Gradient)	58°C	1 dk
		60°C	
		64°C	
		66°C	
Uzama	72°C	2 dk	
1	Final Uzama	72°C	5 dk

### 2.5.2.1 Agaroz Jel Elektroforezi

**Tablo 2.6:** Agaroz jel için hazırlanan solüsyonlar.

Solüsyonlar	Hazırlanışı
0,5 M EDTA (pH: 8)	186,1 g disodyum etilendiaminat etraasetat tartılır. Üzerine bir miktar steril su eklenir. Manyetik karıştırıcıda çözünmesi sağlanır. Tamamen çözüldükten sonra pH metre ile pH 8'e ayarlanır. Solüsyonun hacmi 1 lt olacak şekilde steril saf su eklenir ve otoklavlanır.
5 X/L TBE tamponu (pH: 8)	54 g Tris Base, 27,5 g Boric asid, 20 ml 0,5 M'lık EDTA tartılır ve üzerine bir miktar steril saf su eklenerek karıştırılıp çözünmesi beklenir. Tamamen çözüldükten sonra pH metre ile pH 8'e ayarlanır. Solüsyonun hacmi 1 lt olacak şekilde steril saf su eklenir ve otoklavlanarak steril edilir.
0,5 X/L TBE tamponu (pH: 8)	100 ml 5 X TBE tamponuna 900 ml saf su karıştırılarak hazırlanmış olur.
Et-Br stok solüsyonu	100 mg/ml olacak şekilde steril saf su ile hazırlanır. Koyu renkli ışık geçirmeyen bir şişede saklanır.
% 0.8'lik agaroz jel	0.8 g agaroz tartılır ve 100 ml TBE içerisinde ısıtıcıda kaynatılarak çözülür. 40-45°C'ye ulaşıldıktan sonra Et-Br eklenerek tanka dökülür.
DNA ladder 500 µl DNA ladder	100 µl DNA ladder (1 hacim), 200 µl loading dye (2 hacim), 200 µl steril distile suda (2 hacim) çözülür.

PZR sonucu oluşan DNA bantlarını görüntülemek amacıyla agaroz jel elektroforezi kullanıldı. DNA elektroforezi için yatay jeller hazırlandı ve örnekler jele yüklenerek 0,5 X/L TBE elektroferez tamponunda 90 volt elektrik akımı ile yaklaşık 45 dakika yürütüldü. Çalışmalarda plazmit DNA'lar için % 0,8 konsantrasyonda, ekspresyon çalışmalarında ise % 1'lik konsantrasyonda agaroz jeller kullanıldı. 0,5 X TBE içinde agaroz kaynatıldı ve ılınması beklendi. Ilık hale gelen jele etidyum bromürden 0,5 µg/ml olacak şekilde ilave edildi. Jel katılaştıktan sonra jelin kuyularına DNA örnekleri ile yürütme tamponu (Fermentas 6 X loading dye; bromofenol boya, su ve sakkoroz karşıtı tampon) eklenerek yürütme işlemi



gerçekleştirildi. Elektroforezde ayrılan DNA parçalarının büyüklüğünü belirlemek için 1 kb DNA ladder (Fermentas) kullanıldı ve kullanılan marker ile DNA büyüklükleri karşılaştırıldı. Elektroforez sonuçları UVP jel görüntüleme sisteminde görüntülenerek DNA görüntüleri kaydedildi.

### 2.5.2.2 DNA Örneklerinin Agaroz Jelden Saflaştırılması

İstenilen DNA bantları bisturi yardımıyla UV transilluminatör üzerinde agaroz jelden kesildi. DNA jel ekstraksiyon kiti (Thermo Scientific-GeneJET Gel Extraction Kit) kullanıldı ve kit protokolüne göre DNA saflaştırıldı. Saflaştırılan DNA'nın jelden kazanıldığını kontrol etmek amacıyla DNA'nın az bir miktarı jelde yürütüldü ve saflaştırıldığı doğrulandı. DNA miktarının ve temizliğinin kontrolü için 260 nm ve 280 nm dalga boyundaki absorbansları alındı.

### 2.5.2.3 DNA Miktar Tayini

İzole edilen plazmitler steril dH<sub>2</sub>O ile 40 kat sulandırıldı. Plazmitlerin miktar ve saflıkları 260 nm ve 280 nm'deki absorbansları spektrofotometrik ölçümler ile hesaplandı. Spektrofotometrede ölçüm alabilmek için kuvarz küvetlere kör değer için 200 µL dH<sub>2</sub>O, DNA ölçümleri için ölçülmek istenen plazmit DNA'dan 5 µL ve üzerine 195 µL dH<sub>2</sub>O konuldu. Elde edilen absorbans değerlerinin miktar ve saflıklarının değerlendirilmesi için aşağıdaki formüller kullanıldı.

Spektrofotometrik DNA miktar tayini:

$$\text{DNA miktarı} = A_{260} \times \text{Sulandırma Katsayısı} \times 50 \text{ ng}/\mu\text{L}$$

$$\text{Saflık} = A_{260} / A_{280}$$

### 2.5.3 PZR Ürünlerinin T:A Stratejisi ile Klonlanması

PZR sonucu çoğaltılan DNA bölgesi, pGEMT-Easy vektörüne (promega) klonlandı. Klonlama vektörün öngördüğü protokol şekline uygun olarak gerçekleştirildi (Tablo 2.7).

**Tablo 2.7:** Ligasyon koşulları.

Ligasyon Bileşenleri	Miktarı
İnsert DNA (Jelden geri kazanılan DNA)	9 µL
pGEM-T Easy vektör	4 µL
T4 ligaz buffer	2 µL
T4 DNA ligaz	1 µL
dH <sub>2</sub> O	4 µl
Son hacim	20 µL
+4°C’de bir gece inkübasyon	

Ligasyon ürünleri bir gece bekledikten sonra *E.coli* hücre soyundan olan XL-1 blue ve DH5α kompetant hücrelerine transforme edildi. Transformasyon ürünlerinin seçilmesi için mavi-beyaz koloni yöntemi uygulandı. Seçim için ampisilin antibiyotiği içeren LB agar besiyerlerine 20 µL X-Gal (stok 50 mg/ml) ve 100 µL IPTG (100 mM stok) yayıldı. 37°C’deki inkübatörde üremeleri için bir gece bekletildi.

### 2.5.4 Ökaryotik pcDNA 3.1 V<sub>5</sub> His A, B, C Vektörüne Alt Klonlama

Klonlanan DNA parçasının pGEM-T Easy’den ökaryotik vektör olan pcDNA 3.1 V<sub>5</sub> His A’ya aktarılması için aşağıdaki basamaklar gerçekleştirildi.

- i. EcoRI restriksiyon endonükleaz enzimi ile kesim yapılarak pGEMT-Easy vektöründe klonlu DNA parçası vektörden çıkartıldı.
- ii. EcoRI restriksiyon endonükleaz enzim kesimi ile halkasal boş vektör olan pcDNA 3.1 V<sub>5</sub> His A vektörünün uçları kesildi.
- iii. pcDNA 3.1 V<sub>5</sub> His A vektörünün uçlarının tekrar birleşmemesi amacıyla defosforilizasyon işlemi uygulandı.

- iv. pGEMT-Easy'den çıkartılan DNA parçasının defosforile olan pcDNA 3.1 V<sub>5</sub> His A vektörüne ligasyonu gerçekleştirildi.

#### 2.5.4.1 Kesim Koşulları

Kesim işlemleri pGEMT-Easy vektörü, DNA parçası ve pcDNA 3.1 V<sub>5</sub> His A vektörü kesim bölgelerine dikkat edilerek restriksiyon enzimleri içerisinde en uygun olan EcoRI enzimi seçildi.

**Tablo 2.8:** EcoRI ile restriksiyon kesim koşulları.

Kesim İçeriği	EcoRI ile pGEMT-Easy vektöründen genin çıkartılması	EcoRI ile pcDNA 3.1 V <sub>5</sub> His A vektörü kesimi
DNA/Vektör miktarı (1 µg)	7 µl	4 µl
EcoRI enzimi	1	1 µl
EcoRI Buffer	4 µl	4 µl
dH <sub>2</sub> O	28 µl	31 µl
37 °C'de 4 saat bekletildi		

Kesim sonrasında agaroz jele yüklenerek kesim ürünleri kontrol edildi. Thermo Scientific-GeneJET Gel Extraction kiti ile agaroz jelden kesim ürünleri geri kazanıldı.

#### 2.5.4.2 Defosforilizasyon

Fosfataz enzimi fosforik asit monoesterlerini, fosfat iyonunu ve serbest hidroksil gruplarını parçalar ve buna defosforilizasyon denir. Ligasyonda, DNA ligazın birbirine yakın nükleotidleri arasında fosfodiester bağı oluşumunu katalizleyebilmesi için bir nükleotidin 5' ucunda fosfat grubu, diğer nükleotidin 3' ucunda ise hidroksil grubunun bulunması gerekir. Tek enzim kesimi yapılarak lineer hale getirilen plazmitin uçlarının tekrar birleşmesini ya da kendi üzerinde katlanmasını engellemek amacıyla, her iki 5' ucunda bulunan fosfatların uzaklaştırılması gerekir ve böylece klonlanacak DNA'nın 5' ucunda bulunan fosfat

molekülleri ile plazmitin 3' ucunda bulunan hidroksil grupları ligasyona girebilir [23].

Tablo 2.8'de gösterildiği gibi His A vektörünün EcoRI ile kesimi sonrasında vektörün uçları kırıldı ve halkasal yapısını kaybedip lineer hale geldi. Daha sonra vektörün uçlarının yeniden birleşmemesi amacıyla fosfataz enzimi kullanılarak defosforilizasyon gerçekleştirildi (Tablo 2.9).

**Tablo 2.9:** Defosforilizasyon koşulları.

Defosforilazasyon Koşulları	Miktarı
EcoRI rest. enzimi ile kesilmiş insert DNA	33 µl
10 X Reaksiyon Buffer	4 µl
Alkalen Fosfataz	1 µl
Son hacim	38 µl
37°C'de 30 dk inkübasyona bırakıldı ve sonra 75°C'de 5 dk enzim inaktivasyonu sağlandı.	

### 2.5.5 ADAMTS2'nin His A vektörüne Klonlanması

ADAMTS2 geninin His A'nın içine ligasyonu için ligasyon koşulları belirlendi (Tablo 2.10). Bir gece ligasyona bırakılan ürünler ertesi gün XL-1 Blue kompetant hücrelerine transforme edildi. Transformasyon ürünleri antibiyotikli LB agarda tek koloni düşücek şekilde ekildi ve bir gece 37°C inkübatörde üremeleri sağlandı.

**Tablo 2.10:** ADAMTS2'nin His A vektörüne ligasyon koşulları.

Ligasyon Bileşenleri	Miktarı
İnsert DNA (Jelden geri kazanılan DNA)	5 µL
His A vektör	1 µL
T4 ligaz buffer	2 µL
T4 DNA ligaz	1 µL
dH <sub>2</sub> O	11 µl
Son hacim	20 µL
+4°C'de bir gece inkübasyon	

## 2.6 Bakteri Çalışmaları İle İlgili Teknikler

### 2.6.1 Çalışmalarda Kullanılan Bakteri Soyları

**Tablo 2.11:** Klonlama ve stok amaçlı kullanılan *E. coli* hücre soyları ve özellikleri.

<i>E.coli</i> Hücre Soyu	Özelliği
DH5α kompetantı	(SupE44Δ lacU169 [(Φ80 LacZ ΔM15)] hsdR17recA1 endA1 gyrA96 thr-1 rI A1)
XL-1 blue kompetantı	(recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacIqZΔM15 Tn10 (Tetr)])

### 2.6.2 Bakteriyel Kültür Ortamı

**Tablo 2.12:** Bakteri sıvı ve katı üreme ortamları ve hazırlanışları.

Bakteri Besiyerleri	Hazırlanışı
LB Agar	Ticari firmalardan temin edilen toz şeklindeki LB agar, firmanın önerdiği şekilde 1lt saf suya 35 g agar eklenerek hazırlanır ve steril edilmek üzere otoklavlanır.
LB Broth	Ticari firmalardan temin edilen toz şeklindeki LB Broth, firmanın önerdiği şekilde 1lt saf suya 20 g broth eklenerek hazırlanır ve steril edilmek üzere otoklavlanır.

### 2.6.3 Bakterilerin Seçilmesinde Kullanılan Antibiyotik

**Tablo 2.13:** Bakteri çalışmalarında kullanılan antibiyotiğin hazırlanışı.

Antibiyotik	Hazırlanışı
Ampisilin Stok Solüsyonu	100 mg/ml olacak şekilde steril safsu ile hazırlanır. 0,22 mikronluk filtreden süzülerek steril edilir. -20°C'de saklanır.

#### 2.6.4 Kompetant Hücre Hazırlanması

**Tablo 2.14:** Kompetant hücre için kullanılan bileşikler.

Kimyasal bileşikler	Son Konsantrasyon
1 M CaCl <sub>2</sub>	100 mM
% 99 Gliserol	% 40

Kompetant hücre yapım aşamalarına geçmeden önce kullanılacak tüm cam malzemeler, teflon tüpler ve uçlar otoklavda steril edilerek ön hazırlık tamamlandı.

Kompetant hale getirilecek olan *E.coli* hücreleri LB agar içeren petrilere tek koloni ekimi yapıldı ve 37°C’de bir gece inkübasyona bırakıldı. Oluşan tek koloniden öze yardımıyla alınan hücreler 10 ml LB medyuma aşılandı ve 37°C’de çalkalamalı etüvde bir gece inkübe edildi. Sonra daha büyük hacimde inkübasyon amaçlı 250 ml steril erlene 100 ml LB medyuma konuldu. Hazırlanan bu besiyerine ön kültür inoküle edildi. 37°C’de çalkalamalı etüvde inkübasyona bırakıldı ve OD<sub>600</sub>’nin 0,5-0,6 aralığında olmasına dikkat edildi. Bakteri süspansiyonu 5 dakika 3000 rpm’de 4°C’de santrifüj edildi. Süpernatant pipetle alındı ve başlangıç hacminin yarısı kadar 0,1 M CaCl<sub>2</sub> solüsyonunu eklendi ve dikkatlice pipetaj yapılarak pelletin çözünmesi sağlandı. Daha sonra 25 dakika buz üzerinde inkübe edildi. İnkübasyon sonunda 5 dakika 3000 rpm’de 4°C’de santrifüj yapıldı. Süpernatant uzaklaştırıldı ve pellet başlangıç hacminin 1/10’u kadar tekrar 0,1 M CaCl<sub>2</sub> ile çözüldü. 1 ile 4 saat arasında buz üzerinde bekletildi. Daha sonra 1:1 oranında % 40 steril gliserol ilave edildi karıştırıldı. Buz üzerinde bekletilen ependorflara 200 µl olacak şekilde alikot yapıldı ve etiketlenerek -80°C’deki derin dondurucuda saklandı.

#### 2.6.5 Transformasyon

Kompetant hücreler -80°C’den çıkartılarak buza konuldu ve çözünmesi beklendi. Daha sonra kompetant hücre havuzundan 50 µl hücre alındı ve 5 µl ligasyon reaksiyonu ile bir tüpte birleştirilerek buzda 40 dakika inkübe edildi. Süre bitiminde 42°C’ye ayarlanmış su banyosunda 90 saniye ısı şoku uygulandı. Isı şokunu takiben 2 dakika tekrar buzda bekletildi. Sonrasında LB medyumdan ya da SOC medyumdan 950 µl eklendi ve 1,5 saat 37°C’de çalkalamalı inkübatöre

bırakıldı. Transformasyon kültürünün yaklaşık 150-200 µl'si ampisilin içeren LB agarlı petriye yayıldı. Artan transformasyon kültürü ise 3000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilip 100 µl LB medyumda çözüldü ve ampisilin içeren LB agarlı diğer bir petriye yayıldı. Daha sonra petriler ters çevrilerek 37°C'deki inkübatörde bir gece inkübe edildi. Oluşan kolonilerin rekombinant olup olmadığı bu kolonilerden izole edilen plazmitlerle restriksiyon endonükleaz enzimi ile kontrol kesimi yapılarak ve plazmitlerin dizilemeye gönderilmesiyle belirlendi.

### **2.6.6 Gliserol Stok Hazırlama**

Ampisilin içeren LB medyuma tek koloniden ekim yapılarak ön kültür hazırlandı. Bek alevi yanında steril ependorflara % 30'luk steril gliserolden ve ön kültürden 1:1 oranında eklendi. Ependorflardaki stok etiketlenerek -80°C'de kullanılmaya hazır bir şekilde saklandı.

### **2.6.7 Küçük Ölçekli Plazmit DNA İzolasyonu (Miniprep)**

Son konsantrasyonu 100 µg/ml ampisilin içeren 10 ml LB medyuma transformasyon ürünleri ekildi ve bir gece çalkalamalı etüvde 37°C 200 rpm'de inkübe edildi. Kültür 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj yapıldı ve bakteri pelletleri elde edildi. Plazmit izolasyonu için Thermo Scientific-GeneJET Plasmid Miniprep kiti kullanıldı ve kitin ön gördüğü protokole göre pelletlerden plazmit DNA'lar elde edildi. Plazmitlerin miktar ve saflık tayinleri spektrofotometrik ölçümler ile belirlendi.

### **2.6.8 Büyük Ölçekli Plazmit DNA İzolasyonu (Maxiprep)**

İzolasyon basamaklarına ön hazırlık olarak kullanılacak bütün cam malzemeler ve bakteri LB medyum otoklavlanarak steril edildi.

Son konsantrasyonu 100 µg/ml ampisilin içeren 10 ml LB medyuma tek koloni ekimi gerçekleştirildi ve bir gece çalkalamalı etüvde 37°C 200 rpm'de inkübe edildi. İnkübasyon sonunda başlangıç kültürü 1/500-1/1000 arasında, 100 µg/ml

ampisilin içeren LB medyumda dilue edildi. Yüksek kopyalı plazmitler için 100 ml LB medyum, düşük kopyalı olanlar için 250 ml LB medyum kullanıldı. 37°C’de 12-16 saat aralığında 200 rpm’de inkübe edilerek bakterilerin üremesi sağlandı. Bakteriler yeterli yoğunluğa ulaştıktan sonra 15 dakika +4°C’de 6000 rpm’de santrifüj edildi. Bakteri pelletlerinden plazmit izole etmek için Thermo Scientific-GeneJET Plasmid Maxiprep kiti kullanıldı ve kitin ön gördüğü protokole göre yüksek saflıkta ve miktarda plazmitler elde edildi. Plazmitlerin miktar ve saflık tayinleri için spektrofotometrik ölçümler yapıldı.

## 2.7 Hücre Kültürü Çalışmaları ile İlgili Teknikler

### 2.7.1 Hücre Kültürü Çalışmalarında Kullanılan Solüsyonların Hazırlanması

Hücre kültürü çalışmalarının gerçekleştirilebilmesi için öncelikle Tablo 2.15’deki gibi belirli solüsyonlar hazırlandı.

**Tablo 2.15:** Hücre kültüründe kullanılan solüsyonlar ve hazırlanışı.

Solüsyonlar	Hazırlanışı
PBS (Fosfat tuz tamponu)	100 ml’ye bir adet PBS tableti eklendi ve tabletin çözülmesi sağlandı. 121°C’de 20 dakika otoklavlanarak steril edildi.
Tripsin-EDTA Solüsyonu	0,5 mM EDTA ve % 0,05 Tripsin 1 X PBS içerisinde çözüldü. Daha sonra 121°C’de 20 dakika otoklavlanarak steril edildi.
FCS (Fetal Sığır Serumu)	Fetal sığır serumu stoğu 56°C’de 1 saat ısı ile inaktive edildi ve -20°C’de saklandı.
DMEM (Dulbecco’s Modified Eagles Medium)	DMEM içine son konsantrasyonu 0,2 mM olacak şekilde L-glutamin ve son konsantrasyonu % 10 olacak şekilde FCS eklendi.



### 2.7.2 Hücre Kültüründe Kullanılan Ökaryotik Hücre Hatları

Yüksek lisans tez süresince DNA ve RNA düzeyinde gerçekleştirilen deneysel çalışmalarda kullanılan ökaryotik hücre hatları Tablo 2.16’da gösterilmiştir.

**Tablo 2.16:** Hücre kültüründe çalışılan hücre hatları.

Hücre Hatları	
Saos-2 ve MG-63	İnsan kemik karsinomu
PC-3 ve DU-145	İnsan prostat karsinomu
MCF-7	İnsan meme karsinomu
HT29 ve Colo-205	İnsan kolon karsinomu
MKN-45	İnsan gastrik karsinomu
K-562	İnsan kronik myeloid lösemi hücresi
Panc-1 ve Mia PaCa-2	İnsan pankreas karsinomu
Huvec	İnsan umbilikal ven endotel hücresi

### 2.7.3 Hücre Hatlarının Açılması

Uzun dönemde  $-80^{\circ}\text{C}$ ’de saklanan hücre hatlarının büyütülmesi için  $-80^{\circ}\text{C}$ ’den hücreler çıkartıldı ve  $37^{\circ}\text{C}$ ’deki su banyosunda çözünmesi için beklendi. Daha sonra % 10’luk FCS içeren medyuma alındı ve 5 dakika 1000 rpm’de santrifüj edilerek çöktürüldü. Santrifüj sonrasında süpernatantlar uzaklaştırıldı, oluşan hücre pelletleri taze medyum ile süspanse haline getirildi ve flasklara ekimleri yapıldı. Flasklar etiketlenerek % 5  $\text{CO}_2$  içeren  $37^{\circ}\text{C}$ ’deki inkübatöre konuldu.

### 2.7.4 Hücre Hatlarının Büyütülmesi

0,2 mM L-glutamin içeren % 10 FCS’li medyumda hücrelerin doluluk oranına göre düzenli olarak hücrelerin pasajları gerçekleştirildi.

### **2.7.5 Hücre Hatlarının Pasajlanması**

Hücreler buldukları yüzeyi % 80-90 oranında kapladıklarında flaskların içerisindeki medyum uzaklaştırıldı. Hücreler steril PBS ile yıkandı. Hücrelerin yüzeyden kaldırılabilmesi için Tripsin-EDTA ile tripsinizasyon işlemi yapıldı. Hücreler yüzeyden ayrılınca tripsinizasyonu sona erdirmek amacıyla % 10'luk FCS içeren taze medyum eklendi ve 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek hücreler çöktürüldü. Süpernatant kısım uzaklaştırıldı, pellet taze medyum ile çözüldü ve flasklara ekim yapıldı. Flasklar etiketlenerek % 5 CO<sub>2</sub> içeren 37°C'deki inkübatöre konuldu.

### **2.7.6 Hücrelerin Dondurulması ve Saklanması**

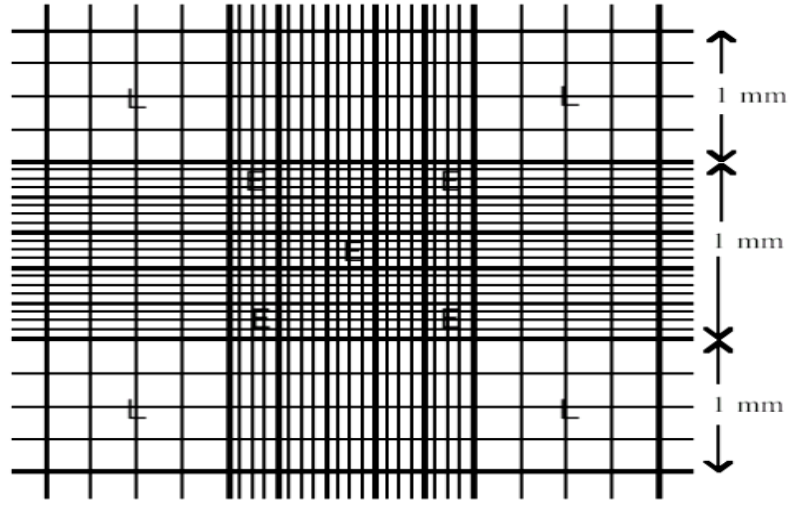
Hücrelerin bulunduğu flasklardaki medyum uzaklaştırıldı. Sonrasında hücreler steril PBS ile yıkandı ve Tripsin-EDTA ile tripsinizasyon işlemi yapıldı. Hücreler yüzeyden ayrıldığında tripsinizasyon işlemi sona erdirmek amacıyla % 10'luk FCS içeren medyum eklendi ve 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj yapılarak hücreler çöktürüldü. Üstteki süpernatant kısım uzaklaştırıldı. Çökelti halindeki hücreler % 10'luk DMSO (Dimethyl Sulfoxide) içeren FCS ile dikkatlice çözüldü ve kroviyal tüplere konularak etiketlendi. Kroviyal tüplere konulan hücreler -80°C derin dondurucuda saklandı.

## **2.8 Transkripsiyonel Aktivite Çalışmaları ile İlgili Teknikler**

### **2.8.1 Canlı Hücrelerin Belirlenmesi ve Hücre Sayımı**

Toplam hücre süspansiyonunun milimetresindeki hücre sayısını hesaplamak için, 1mm<sup>2</sup>'lik alana ve 0.1 mm derinliğine sahip, üzeri 25 küçük birim kareye ayrılmış thoma lamı (Şekil 2.4) kullanıldı. Bu sayede hücrelerin toplam hacmi hesaplanabildi. Canlı ve ölü hücreleri ayırt edebilmek için hücre süspansiyonundan ve tripan mavi solüsyonundan 1:1 oranında eklendi ve hücrelerin boya ile muamele olması için yaklaşık 3-5 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Ölü hücreler mavi

boyanırken canlı olan hücreler boyanmadı ve boyanmayan canlı hücreler tek tek sayıldı.



Şekil 2.4: Thoma lamı.

Süspansiyonun mililitresindeki toplam hücre sayısı aşağıdaki formülle bulunur:

$$\text{Toplam canlı hücre sayısı/ml} = \text{hemositometre sayım sonucu} \times 2 \times 10^4$$

### 2.8.2 Kalsiyum-Fosfat Presipitasyon Tekniği ile Transfeksiyon

Tablo 2.17: Transfeksiyon çözeltileri.

Solüsyonlar	İçeriği
2 mM CaCl <sub>2</sub>	14,7 g CaCl <sub>2</sub> tartılır ve distile su ile son hacim 50 ml'ye tamamlanır ve steril olması için otoklavlanır. Daha sonra filtre edilerek +4°C'de muhafaza edildi.
2 X Hepes (pH : 7,05-7,12)	1,6 g NaCl, 0,04 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 1,3 g Hepes tartılır ve saf su ile 100 ml'ye tamamlanır. pH'ı ayarlanır ve otoklav yapılır. Filtre edilerek -20°C'de saklandı.

### **2.8.2.1 Geçici Transfeksiyon**

Transfeksiyon uygulamak için seçilen hücreler kültür ortamında büyütüldü. Yeterli sayıya ulaşan hücrelerin transfeksiyonu için hücreler tripsinizasyon ile kaldırılıp thoma lamında sayıldı. Transfeksiyon için 6 kuyulu plakalar kullanıldı. 6 kuyulu plakalara 2 ml medyum içerisine 500.000 hücre düşecek şekilde hücreler ekildi ve bir gece hücrelerin yüzeye tutanması için bekletildi. Transfekte edilecek büyük ölçekli DNA plazmiti, 2 M CaCl<sub>2</sub> solüsyonu, ve dH<sub>2</sub>O eklenerek son hacim 90 µl olacak şekilde karışım hazırlandı. Karışımın üzerine 90 µl 2 X HEPES kabarcıklar oluşturarak damla damla eklendi ve presipitasyonun oluşması amacıyla yarım saat bekletildi. Presipitasyon oluşuktan sonra karışım her bir kuyucuğa dikkatlice damla damla şeklinde eklendi. Hücreler % 5 CO<sub>2</sub> içeren 37°C'deki inkübatörde 6 saat bekletildi. 6 saat sonra hücre medyumları uzaklaştırıldı. Hücreler steril PBS ile yıkandı ve taze medyum eklendi. 24., 48. ve 72. saatlerde salınan alkalın fosfat aktivitesi luminometre ile ölçüldü.

### **2.8.3 pSEAP2 Aktivitesinin Ölçümü**

Transfeksiyonun kontrolü için pSEAP2 aktivitesine bakılmak üzere 24., 48. ve 72. saatlerde deney gruplarının medyumlarından bir miktar ependorflara ayrıldı. Ayrılan medyumların pSEAP2 aktivitesini ölçmek için 5 µl hücre medyumunu 384 kuyulu plakalara konuldu. 1 X dilüsyon tamponundan 15 µl medyumların üzerine eklendi. 65°C'de 30 dakika bekletildi ve sonra 2-3 dakika buz üzerinde soğutuldu. Buzdan alındı ve oda sıcaklığına gelmesi sağlandı. pSEAP2 substrat solüsyonundan her bir örneğe 20 µl olacak şekilde eklendi ve örnekler 40 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Süre bitiminde sonuçlar luminometrede okutularak istatistiksel analizleri Microsoft Excel programı ile yapıldı.

### **2.8.4 Koloni Oluşum Testi**

6 kuyulu plakalara Saos-2 hücreleri ekildi ve bir gece yüzeye tutunması için bekletildi. Bir gün sonra hiçbir şey uygulanmamış kontrol hücre grupları ve ADAMTS2 geni transfekte hücre grupları içeren deney basamağı oluşturuldu. 10 gün boyunca deney gruplarının ortamı iki günde bir taze medyum ile değiştirildi ve 10.

günün sonunda deney gruplarının medyumları uzaklaştırıldı. Hücreleri fikse etmek için 10 dakika hücreler soğuk metanol ile muamele edildi. Daha sonra hücreleri görüntüleyebilmek amacıyla kristal viyole ile 15 dakika muamele edildi. Boyanan koloniler kontrol grupları ile karşılaştırılarak görüntüleri kaydedildi.

## 2.9 Hipoksiya Çalışmaları ile İlgili Teknikler

### 2.9.1 CoCl<sub>2</sub> Konsantrasyon Çalışmaları

ADAMTS2'nin farklı hücre hatlarındaki ekspresyonları belirlendi. Ekspresyon sonuçlarına göre seçilen hücre hatlarında normoksik ve hipoksik koşullar incelendi. İlk olarak hipoksik koşul oluşturabilmek için hücelere uygulanacak kobalt klorür (CoCl<sub>2</sub>) konsantrasyonunun belirlenmesi amacıyla farklı konsantrasyon aralıkları uygulandı. En uygun konsantrasyon miktarı seçilerek hipoksik koşul oluşturuldu.

### 2.9.2 MTT (3-(4, 5-dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) Testi

**Tablo 2.18:** MTT solüsyonu ve hazırlanışı.

MTT Solüsyonu
Toz halinde temin edilen MTT son konsantrasyonu 0,5 mg/ml olacak şekilde steril PBS içinde bir gece boyunca magnetik karıştırıcıda karıştırılarak hazırlanır. 0,22 mikron filtre ile steril edilir ve kullanılmak üzere 2-8°C'de saklanır. MTT testinde oluşan formazan kristallerini çözmek için kullanılan izopropanol son konsantrasyonu 0,004 M HCl içerecek şekilde hazırlanır.

Hücre proliferasyonu, canlılığı ve sitotoksosite ölçümü için kullanılan bir yöntemdir ve bu test canlı hücrelerdeki tetrazolium tuzu olan MTT'yi formazan kristallerine dönüştürür.

Hücrelerde normoksik ve hipoksik koşullar denendikten sonra hücrelerdeki sitotoksik etkinin belirlenmesi amacıyla hücelere MTT uygulandı. Bu yöntemle göre

96'lık plakalara ekilen hücelere son konsantrasyonu 0,5 mg/ml olan 20 µl MTT solüsyonu uygulandı ve sonra 37°C'de 4 saat % 5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatörde bekletildi. İnkübasyon sonunda medyum uzaklaştırıldı ve 96'lık plakaların altında oluşan kristaller 200 µl 0,004 M HCl içeren izopropanol ile çözüldü. Daha sonra spektrofotometrede 550 nm dalga boyunda absorpsanları alındı. Spektrofotometrenin vermiş olduğu absorpsan değerlerinin istatistiksel analizleri Microsoft excel programı ile gerçekleştirildi.

### **2.9.3 Farklı Hücre Hatlarında Hipoksiya Çalışmaları**

Belirlenen CoCl<sub>2</sub> konsantrasyonunda farklı hücre hatları 25 cm<sup>2</sup>'lik flasklara 2.000.000 hücre olacak şekilde ekildi. Hücrelerin bir gece flask yüzeylerine tutunması beklendi. 24, 48 ve 72 saat hiçbir şey uygulanmamış kontrol grupları olarak normoksiya deneyi ve 24, 48 ve 72 saat CoCl<sub>2</sub> uygulanan hipoksiya deneyi oluşturuldu. Daha sonra hipoksik etkinin incelenmesi için sırasıyla 24., 48. ve 72. saatlerde hücre pelletleri alındı. Hücre pelletlerinden RNA izole edildi. İzole edilen RNA'ların saflık ve miktarı belirlendikten sonra RT-PZR ile cDNA sentezi gerçekleştirildi. cDNA'lar kullanılarak gerçek zamanlı PZR (q-PZR) gerçekleştirildi ve mRNA ekspresyon düzeyleri incelendi.

## **2.10 RNA Çalışmaları ile İlgili Teknikler**

### **2.10.1 Farklı Hücre Pelletlerinden RNA İzolasyonu**

ADAMTS2 geninin hangi hücre hatlarında ekspre olduğunu belirlemek amacıyla hücre kültüründe büyütülen farklı hücre hatlarından pelletler oluşturuldu. Bu pelletlerden RNA izole edilene kadar -80°C dondurucuda saklandı.

RNA izole etmek üzere -80°C'deki örnekler buz üzerine alınarak dikkatlice çözüldü. Thermo Scientific-GeneJET RNA purification kiti kullanılarak kitin ön gördüğü protokole uygun RNA'lar izole edildi. RNA örneklerinin miktar tayini spektrofotometrik ölçümlerle belirlendi.

### 2.10.2 RNA Miktar Tayini

İzole edilen RNA'ların miktar ve saflık tayinleri spektrofotometrede 260 nm ve 280 nm'de ölçüldü. Ölçüm için kuvartz küvetin bir kuyusuna kör değer için 200 µL dH<sub>2</sub>O, diğer kuyularına 5 µl ölçülmesi istenen RNA ve üzerine 195 µL dH<sub>2</sub>O konuldu. Sonuçların değerlendirilmesi için aşağıdaki formüller kullanıldı.

Spektrofotometrik RNA miktar tayini:

$$\text{RNA miktarı} = A_{260} \times \text{Sulandırma Katsayısı} \times 40 \text{ ng}/\mu\text{L}$$
$$\text{Saflık} = A_{260} / A_{280}$$

### 2.10.3 RNA Jel Elektroforezi

**Tablo 2.19:** FA jel elektroforez tamponu.

FA jel tamponu	Stok Solüsyonu	Son Konsantrasyon (10X)
MOPS (pH:7)	1 M	0,2 M
EDTA (pH:8)	0,5 M	0,05 M
NaAc	1M	0,01M
Tampon DEPC'li su ile hazırlandı. pH: 7,0'ye ayarlandı ve otoklavlanarak steril edildi.		

İzole edilen RNA örneklerinin jel elektroforezinde yürütülmeden önce jel hazırlamada kullanılacak malzemelerin RNaz enziminden arındırılması gerekir. Bu amaçla elektroforez ve jel hazırlama aparatları % 0,5'lik SDS ile yıkandıktan sonra RNaz içeren DEPC'li su ile muamele edildi. Etanol ile yıkandı ve sonra kurumaya bırakıldı.

5 ml 10 X FA jel tampon, 0,5 g agaroz ve 50 ml DEPC'li su mikrodalgada kaynatıldı. Soğuduktan sonra 900 µL % 37'lik (12,3 M) formaldehit ve 1 µL (10 mg/ml) etidyum bromür eklenerek kasete döküldü. Jel katılaştıktan sonra kaset 1 X FA jel tamponu ile dolu tanka yerleştirildi. 5 µL RNA örneği ve 3 µL 2 X yükleme boyası 65°C'de 5-10 dakika bekletildi ve buzda soğutulduktan sonra kuyulara yüklenerek elektroforezde yürütülerek RNA görüntüleri alındı.

#### 2.10.4 cDNA Sentezi (RT-PZR)

cDNA sentezi için 1 µg RNA örnekleri kullanılarak Reverse transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PZR) gerçekleştirildi. RT-PZR aşağıda gösterilen Tablo 2.20'deki gibi her bir RNA örneğine uygulandı.

**Tablo 2.20:** RT-PZR için kullanılan cDNA bileşenleri.

cDNA Bileşenleri	Miktarı
RNA kalıp...1 µg	1 µl
Oligo dT...0,5 µg	1 µl
dH <sub>2</sub> O	Son hacime tamamlanacak şekilde
65°C'de 5 dakika inkübasyon	
5 X Reaksiyon Tamponu...1 X	4 µl
Ribolock RNaz inhibitörü...25 U/µl	0.5 µl
10mM dNTPmix...1 mM	2 µl
M-MuLV Reverse Transkriptaz...40 U/µl	1 µl
Son Hacim	20 µl
42°C 'de 1saat inkübasyon	
70°C 'de 10dk enzim inaktivasyonu	

#### 2.10.5 Gerçek Zamanlı PZR (q-PZR) ve Ekspresyon Çalışmaları

mRNA ekspresyon çalışmalarında özgül olmayan floresan işaretli problardan “cyber green” probu kullanıldı ve gerçek zamanlı PZR (q-PZR) gerçekleştirildi. Cyber green probu, denatüre DNA ve çoğaltılması istenen gen primerleri ile reaksiyon gerçekleştirildi. q-PZR prensibinde uygun bağlanma sıcaklığında primerler DNA dizisine bağlanır ve DNA zincirleri uzar ve çift zincirli hale gelir. Çift zincirli DNA oluştuğunda çift zincire bağlanan cyber green miktarı artar. Buna bağlı olarak yayılan floresans miktarındaki artış gözlenir.

q-PZR çalışmaları için Light Cycler 485 (Roche Diagnostic) cihazı kullanıldı. 100 ng/µl forward ve reverse primerlerinden 0,5'er µl, 1 µg olacak şekilde 1 µl hacimde cDNA, 5 µl SYBR® Green PZR Master Mix ve 3 µl dH<sub>2</sub>O kullanılarak son



hacim 10 µl olacak şekilde q-PZR gerçekleştirildi. Her bir cDNA üç tekrarlı çalışıldı. mRNA çalışmalarında istenen genlerin ekspresyon düzeylerinin incelenmesi amacıyla primerler kullanıldı (Tablo 2.21) ve bu primerler için ortak bağlanma sıcaklıkları (Tablo 2.22) belirlendi. Sonrasında Microsoft Excel programında analiz edildi.

**Tablo 2.21:** Ekspresyon çalışmalarında kullanılan primerler ve dizileri.

<b>ADAMTS2 Ekspresyon Primerleri</b>	<b>Primer Dizileri</b>
ADAMTS2 Forward	5'CTGTGGCGACGAGGTGCG'3
ADAMTS2 Reverse	5'GGTGCACACATAGTCCCGTCC'3
<b>β2M Primerleri</b>	<b>Primer Dizileri</b>
β2M Forward	5'TTTCTGGCCTGGAGGCTATC'3
β2M Reverse	5'CATGTCTCCATCCCACTTAACT'3
<b>Hif-1 α Primerleri</b>	<b>Primer Dizileri</b>
Hif-1 α Forward	5'CCACCTATGACCTGCTTGGT'3
Hif-1 α Reverse	5'TGTCCTGTGGTGACTTGTCC'3
<b>Kol1A1 Primerleri</b>	<b>Primer Dizileri</b>
Kol1A1 Forward	5'CTAGACATGTTTCAGCTTTGTG'3
Kol1A1 Reverse	5'GTTGTCGCAGACGCAGATCCG'3
<b>Kol2A1 Primerleri</b>	<b>Primer Dizileri</b>
Kol2A1 Forward	5'GGCAGCAAAGTTCCACCAAGA'3
Kol2A1 Reverse	5'TCGGAGAGTGCTGCTCCATCT'3
<b>Kol3A1 Primerleri</b>	<b>Primer Dizileri</b>
Kol3A1 Forward	5'AGCTGGCTACTTCTCGCTCTG'3
Kol3A1 Reverse	5'GTTCTGAGGACCAGTAGG GCA'3

**Tablo 2.22:** q-PZR döngü koşulları.

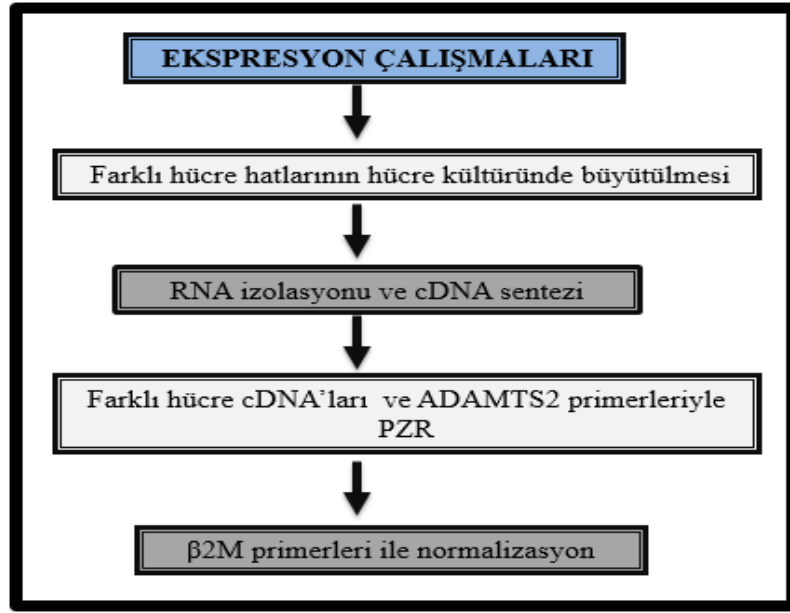
Segment	Döngü Sayısı	Sıcaklık	Süre
1	1	95°C	5 dk
2	25	95°C	30 sn
		60°C	1 dk
		72 °C	2 dk
3	1	72 °C	8 dk

#### **2.10.5.1 q-PZR Sonuçların Değerlendirilmesi ve İstatistiksel Analizleri**

Gerçek zamanlı PZR sonuçları Livak metoduna göre değerlendirildi. ADAMTS2 geni için elde edilen Ct değerlerini normalize etmek amacıyla internal kontrol gen olan insan  $\beta$ 2 Mikroglobulinin Ct ortalamasından çıkartıldı. Elde edilen değerler 2 tabanında kuvveti alındı. Kat mRNA türünde sonuç elde etmek için kontrol grupları kendisine bölünerek “1” birim olarak kabul edildi ve daha sonra ilgili saatlerde çalışılan deney sonuçları kontrol değerine bölündü. Veriler  $p \leq 0,05$  olduğunda istatistiksel olarak anlamlı olarak kabul edildi.

### 3. BULGULAR

#### 3.1 Farklı Hücre Hatlarında ADAMTS2 Ekspresyonunun Belirlenmesi

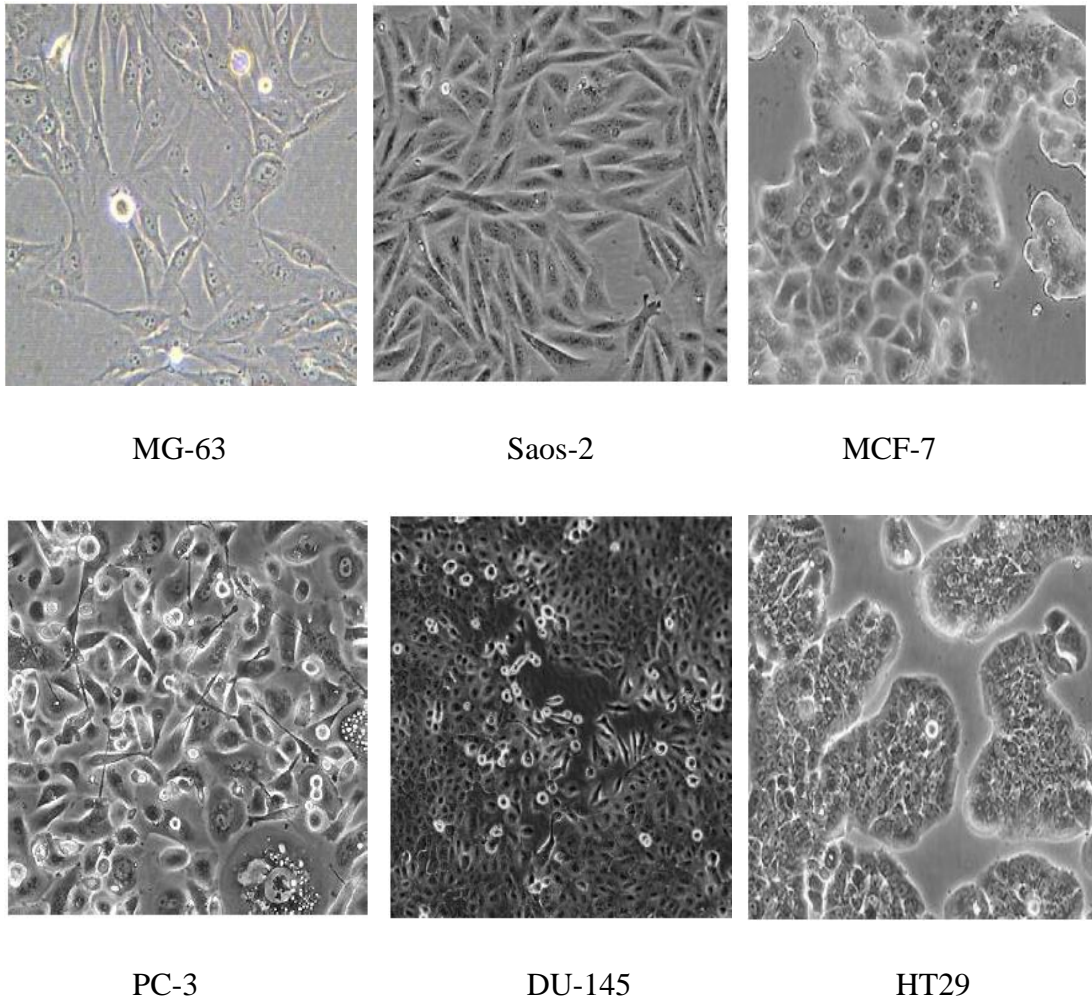


Şekil 3.1: ADAMTS2 ekspresyon çalışmalarının akış diyagramı.

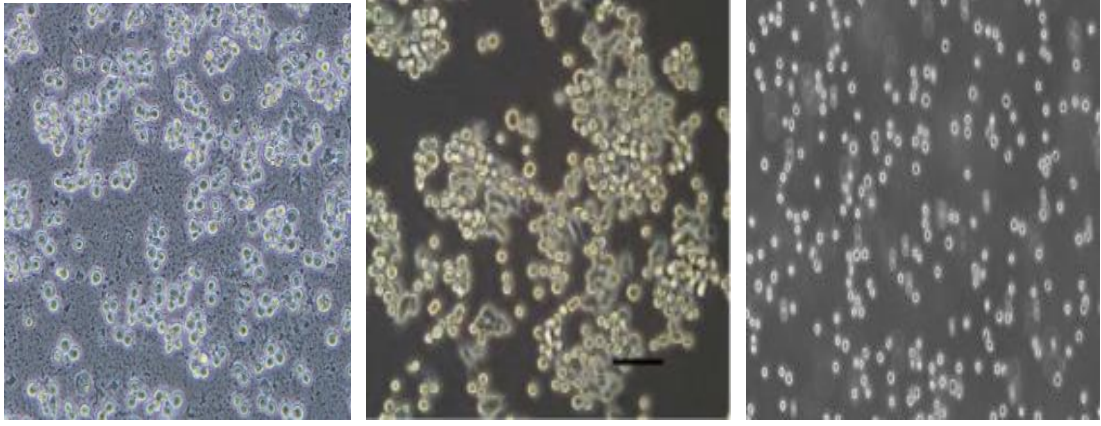
ADAMTS2 gen ekspresyon seviyelerinin belirlenmesi için bölüm 2.9'da anlatıldığı gibi farklı hücre hatları (bkz. şekil 3.2) hücre kültürü ortamında 37°C % 5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatörde büyütüldü. Daha sonra hücreler tripsinizasyon işlemi ile kaldırılarak hücre pelletleri alındı ve bölüm 2.10.1'de anlatıldığı şekilde RNA izolasyonları yapıldı. Miktar ve saflıklarının belirlenmesi için spektrofotometrik ölçümleri yapıldı. Bölüm 2.10.3'teki gibi RNA'lar FA jelde yürütülerek görüntüleri kaydedildi. Bölüm 2.10.4'te anlatıldığı üzere RNA'lardan 1 µg olacak şekilde cDNA sentezi RT-PZR ile gerçekleştirildi. Elde edilen cDNA'lar kalıp olarak kullanıldı. ADAMTS2 genine spesifik ekspresyon primerleri (NM\_021599) ve ekspresyon düzeylerinin yüksek ya da düşük olduğunu karşılaştırabilmek amacıyla internal kontrol olarak β2M primerleri kullanıldı. β2M geni, insan hücrelerinde sürekli olarak ekspre olan bir genidir. Primer bilgilerine Tablo 2.21'den ulaşılabilir.

Ekspresyon profillerinin belirlenmesi amacıyla 1 µg cDNA, ilgili gene ait primerlerden 100 ng, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 mM dNTP, 1 X *Taq* Buffer ve 1 U/µl *Taq* DNA polimeraz enzimi kullanılarak PZR gerçekleştirildi (Tablo 2.22’de PZR döğü koşulları verilmiştir). PZR ürünleri agaroz jel elektroforezinde yürütüldü. UVP görüntüleme sistemi ile görüntüler kaydedildi. Elektroforez sonucunda ADAMTS2’nin farklı hücrelerdeki ekspresyon seviyeleri İmageJ programı ile densitometrik olarak analiz edildi.

Şekil 3.1’de gösterildiği üzere hücre kültürü çalışmalarında kanser hücre hatlarından MG-63, Saos-2, MCF-7, PC-3, DU-145, HT-29, Colo-205, MKN-45, K-562, Panc-1 ve Mia PaCa-2, normal hücre hatlarından ise Huvec ile ekspresyon çalışmaları gerçekleştirildi.



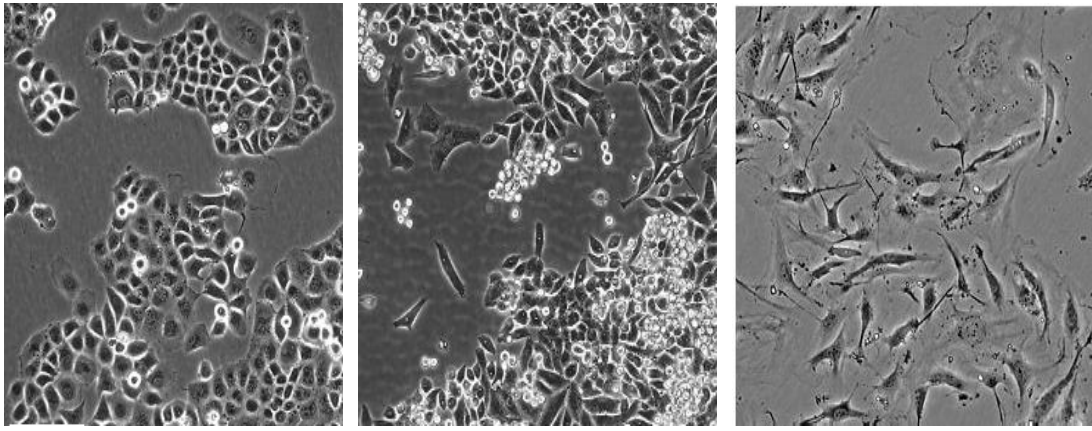
**Şekil 3.2:** Farklı hücre hatlarının mikroskoptaki morfolojik görüntüleri.



K-562

MKN-45

Colo-205

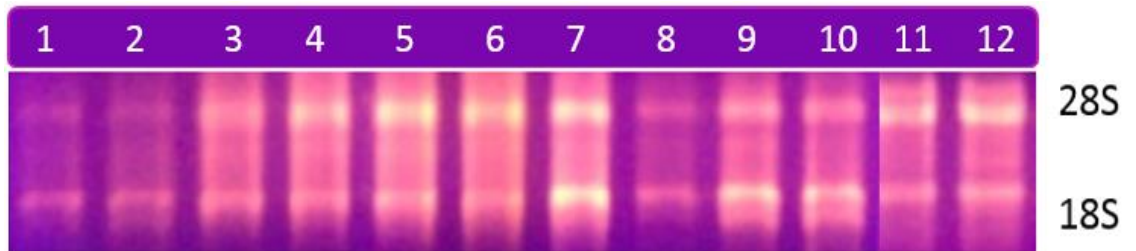


Panc-1

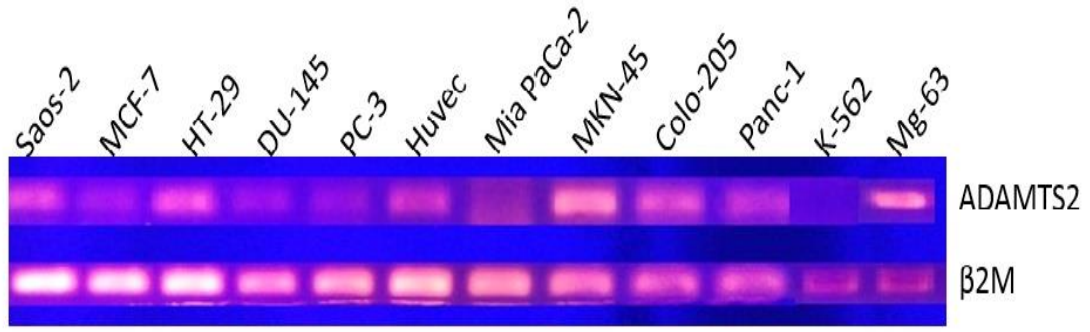
Mia PaCa-2

Huvec

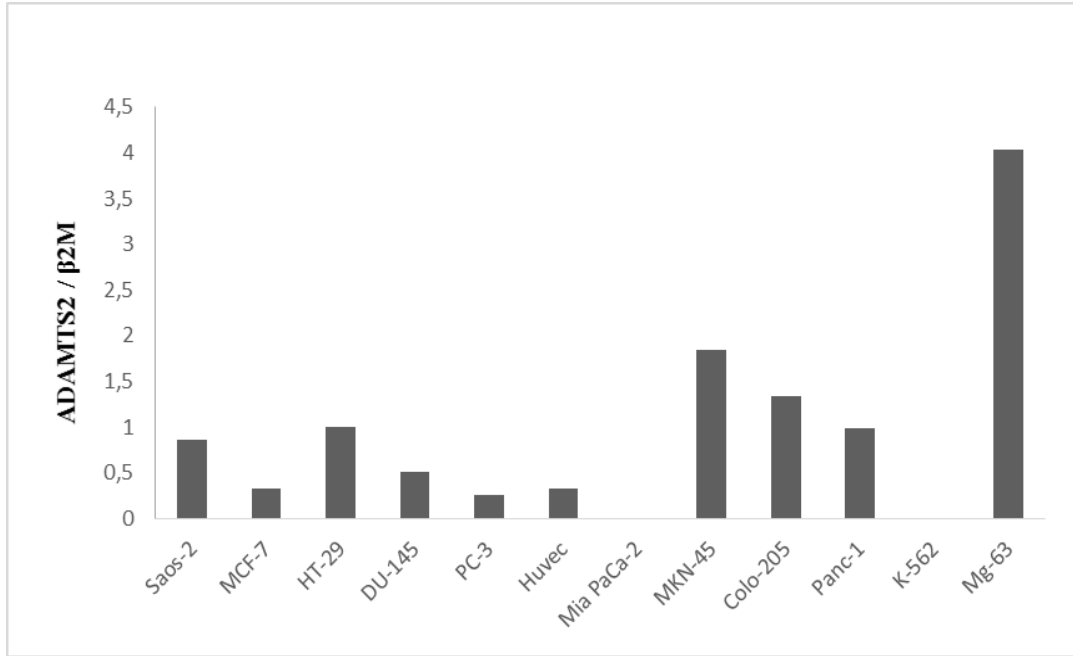
Şekil 3.2: (devam).



**Şekil 3.3:** Farklı hücre hatlarındaki RNA örneklerinin FA jel elektroforez görüntüleri; 1. MG-63, 2. Saos-2, 3. MCF-7, 4. PC-3, 5. DU-145, 6. HT29, 7. K-562, 8. MKN-45, 9. Colo-205, 10. Panc-1, 11. Mia PaCa-2, 12. Huvec.



**Şekil 3.4:** Farklı hücre hatlarında ekspresyon çalışmalarının agaroz jel elektroforezindeki görüntüleri.

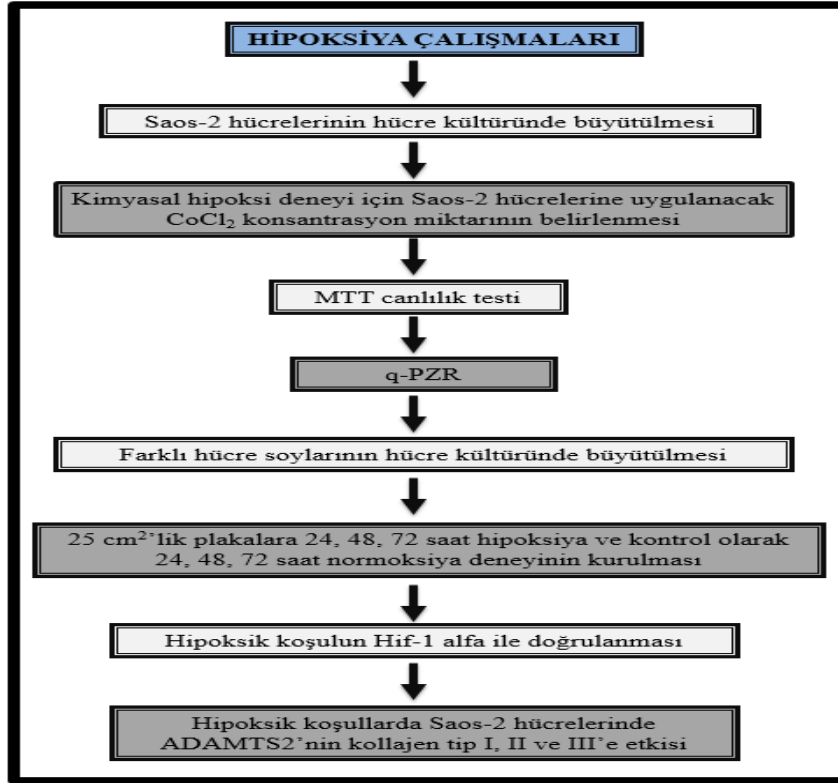


**Şekil 3.5:** Farklı hücre hatlarındaki ADAMTS2 ekspresyonunun densitometrik analizi.

Şekil 3.4'teki agaroz jel görüntüsü ve Şekil 3.5'teki densitometrik analizler sonucunda ADAMTS2 en çok MG-63 hücresinde, en az Huvec hücresinde ekspre olduğu, Mia PaCa-2 ve K-562 hücrelerinde ise tespit edilebilir düzeyde ekspre olmadığı belirlendi.



### 3.2 Farklı Hücre Hatlarında ADAMTS2'nin Hipoksik Regülasyonunun Belirlenmesi



Şekil 3.6: Hipoksiya çalışmalarının akış diyagramı.

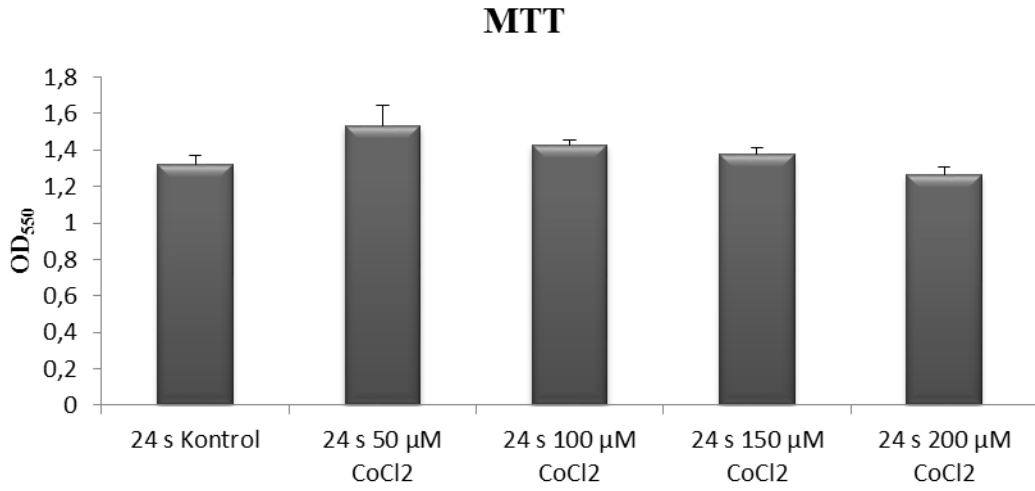
#### 3.2.1 Hipoksiya Deneyi İçin CoCl<sub>2</sub> Konsantrasyon Miktarının Belirlenmesi

Saos-2 hücrelerinde ADAMTS2 yüksek ifade olduğu ekspresyon çalışmalarında (bölüm 3.1) belirlendi ve ADAMTS2 gen çalışmalarında model hücre olarak Saos-2 hücreleri seçildi. Bu nedenle hipoksiya çalışmaları için konsantrasyon miktarının belirlenmesinde Saos-2 hücreleri kullanıldı. Saos-2 hücreleri, bölüm 2.7'de anlatıldığı gibi hücre kültürü ortamında 37°C % 5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatörde büyütüldü. CoCl<sub>2</sub> konsantrasyonlarının Saos-2 hücrelerine etkisini belirlemek amacıyla MTT testi ve gerçek zamanlı PZR gerçekleştirilmiştir.

##### 3.2.1.1 MTT Testi

96'lık plakalardaki her bir kuyuya 200 µl medyum içine 50.000 olacak şekilde Saos-2 hücreleri sayılarak ekildi. Hücrelerin bir gece yüzeye tutunması

beklendi. Bir gün sonra 96'lık plakalardaki hücelere farklı konsantrasyonlarda  $\text{CoCl}_2$  solüsyonu eklendi. 50  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$ , 150  $\mu\text{M}$ , 200  $\mu\text{M}$   $\text{CoCl}_2$  uygulanması sonucu hangi konsantrasyonların hücelerin canlılık faaliyetleri için normal olduğunu ve hangi konsantrasyonların sitotoksik etkisi olduğunu analiz edebilmek için MTT testi uygulandı. MTT solüsyonu hücelere bölüm 2.9.2'de anlatıldığı şekilde gerçekleştirildi. MTT sonuçları için spektrofotometrik ölçümler yapıldı ve elde edilen veriler Microsoft Excel programında analiz edildi.



**Şekil 3.7:** Saos-2 hücelerine farklı konsantrasyonlarda uygulanan  $\text{CoCl}_2$ 'nin hücelere etkisi.

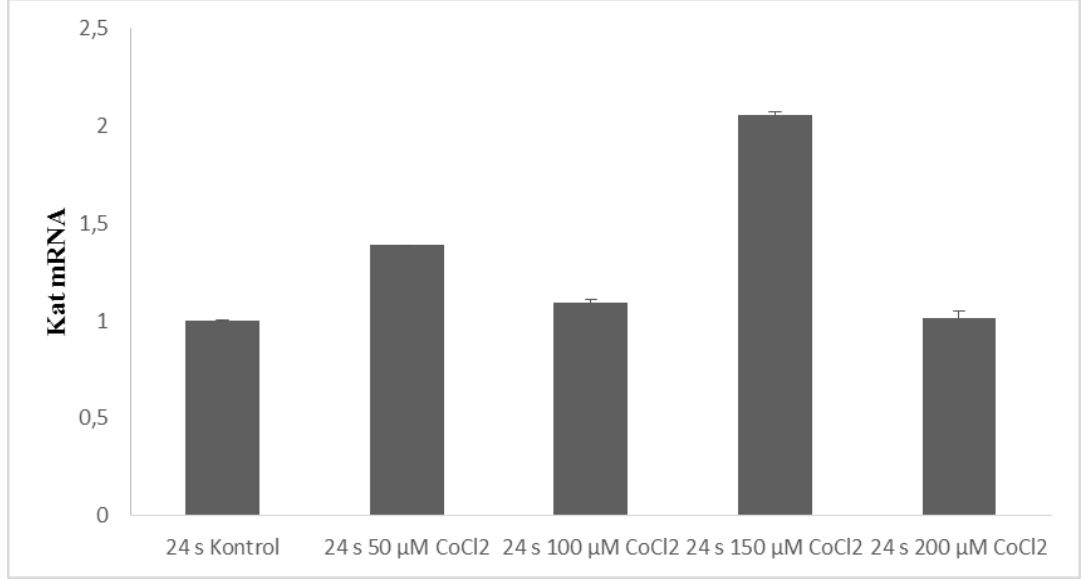
MTT sonuçları dikkate alındığında 150 ve 200  $\mu\text{M}$   $\text{CoCl}_2$  uygulamalarının herhangi bir sitotoksik etkisi gözlemlenmemiştir. Bu konsantrasyonların hangisinin hipoksiyaya cevap oluşturduğunu belirlemek amacıyla q-PZR gerçekleştirilmiştir.

### 3.2.1.2 q-PZR

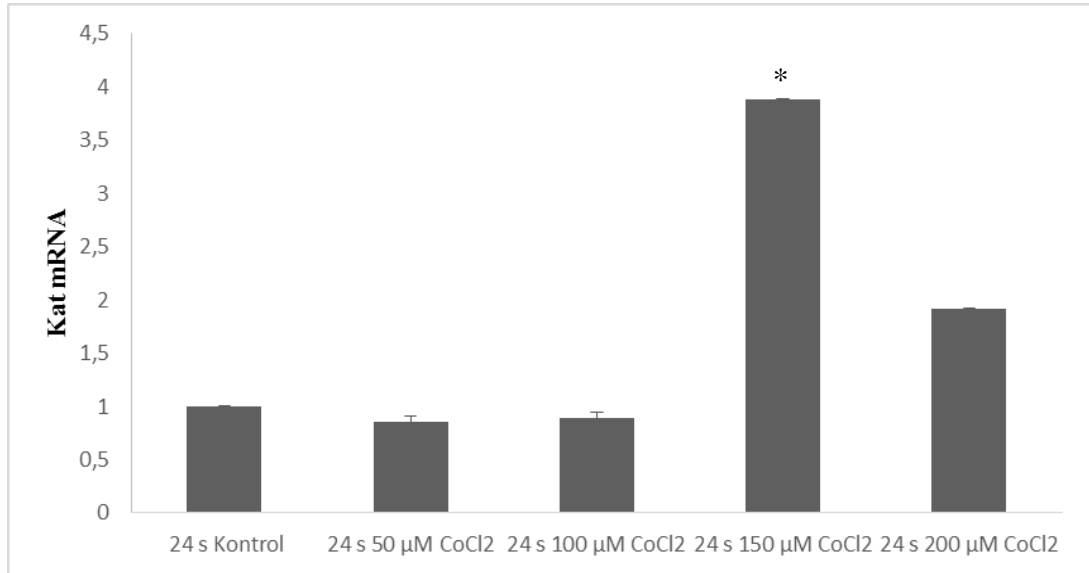
25  $\text{cm}^2$ 'lik flaklara 5 ml medyum içerisine 2.000.000 olacak şekilde Saos-2 hüceleri ekildi. Hücelerin bir gece yüzeye tutunması beklendi. Bir gün sonra hipoksiya plakalarının hücre medyumlarına farklı konsantrasyonlarda  $\text{CoCl}_2$  eklenerek 24 saat hipoksiya grubu ve 24 saat kontrol grubu oluşturuldu. Daha sonra hüceler tripsinizasyon ile kaldırılarak pellet haline getirildi. Pelletlerden bölüm 2.10.1'deki gibi RNA izole edildi. Bölüm 2.10.4'teki gibi RNA'lardan 1  $\mu\text{g}$  olacak şekilde cDNA sentezi gerçekleştirildi. cDNA'lar, ADAMTS2,  $\beta 2\text{M}$  ve Hif-1  $\alpha$



primerleri kullanılarak  $\text{CoCl}_2$  konsantrasyonlarının mRNA düzeyinde Saos-2 hücrelerine etkisi belirlendi.



**Şekil 3.8:** Saos-2 hücrelerinde hipoksiyanın Hif-1  $\alpha$  ile doğrulanması.



**Şekil 3.9:** Saos-2 hücrelerinde 24 saat  $\text{CoCl}_2$ 'nin ADAMTS2 üzerine etkisi.

Öncelikle 150  $\mu\text{M}$   $\text{CoCl}_2$ 'nin Saos-2 hücrelerinde hipoksik yanıtı yüksek seviyede oluşturduğu Hif-1  $\alpha$  seviyesi ile tespit edilmiştir. q-PZR sonucunda elde

edilen verilerin istatistiksel analizinde 150  $\mu\text{M}$   $\text{CoCl}_2$ 'nin Saos-2 hücrelerinde ADAMTS2'nin ifadesini arttırdığı bulunmuştur. Netice olarak hem MTT sonuçları hem de q-PZR analiz sonuçları dikkate alındığında hipoksiya çalışmalarında 150  $\mu\text{M}$   $\text{CoCl}_2$  kullanılmasının uygun olduğu belirlenmiştir.

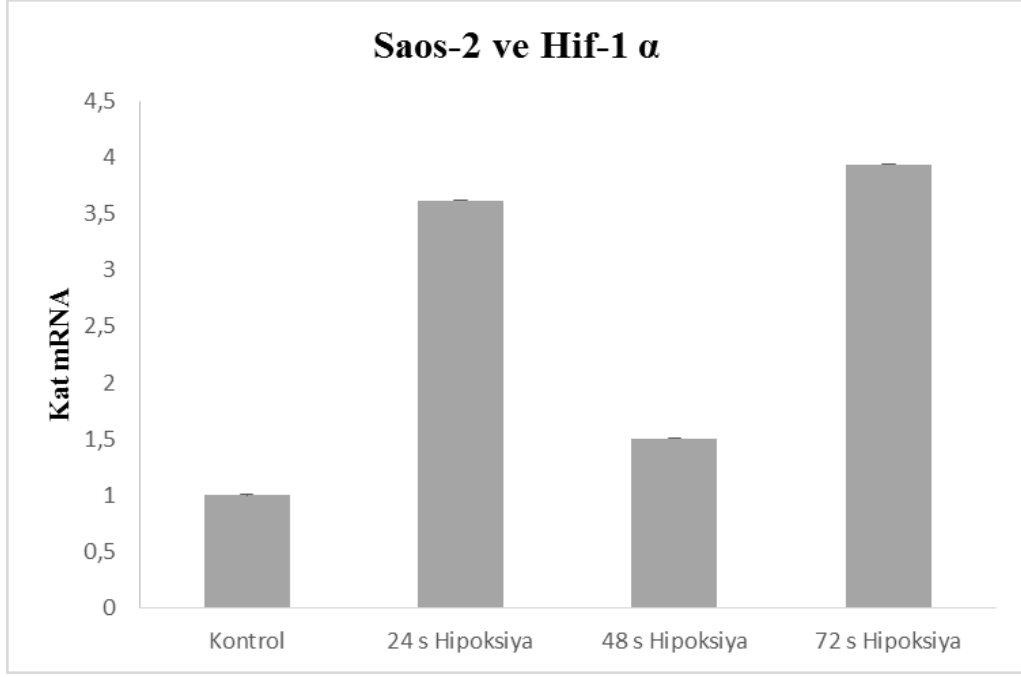
### **3.2.2 Farklı Hücrelerde Hipoksiya Deneyi**

Hipoksiya için farklı hücre hatları bölüm 2.7'deki gibi hücre kültürü ortamında 37°C % 5  $\text{CO}_2$  içeren inkübatörde büyütüldü ve deney kurulacak sayıya ulaşan hücreler sayılarak 2.000.000 hücre olacak şekilde 25  $\text{cm}^2$ 'lik flasklarda 5 ml medyum içerisine ekimleri yapıldı. Hücrelerin bir gece yüzeye tutunması beklendi. Bir gün sonra hipoksiya plakalarının hücre medyumlarına 150  $\mu\text{M}$   $\text{CoCl}_2$  eklenerek 24, 48, 72 saat hipoksik ortam oluşturuldu. Kontrol grupları olan 24, 48, 72 saat normoksiya plakalarına hiçbir şey uygulanmadı. q-PZR ile ADAMTS2'nin hücre hatlarındaki 24, 48 ve 72 saat normal ve hipoksik koşullarındaki ekspresyonları incelendi.

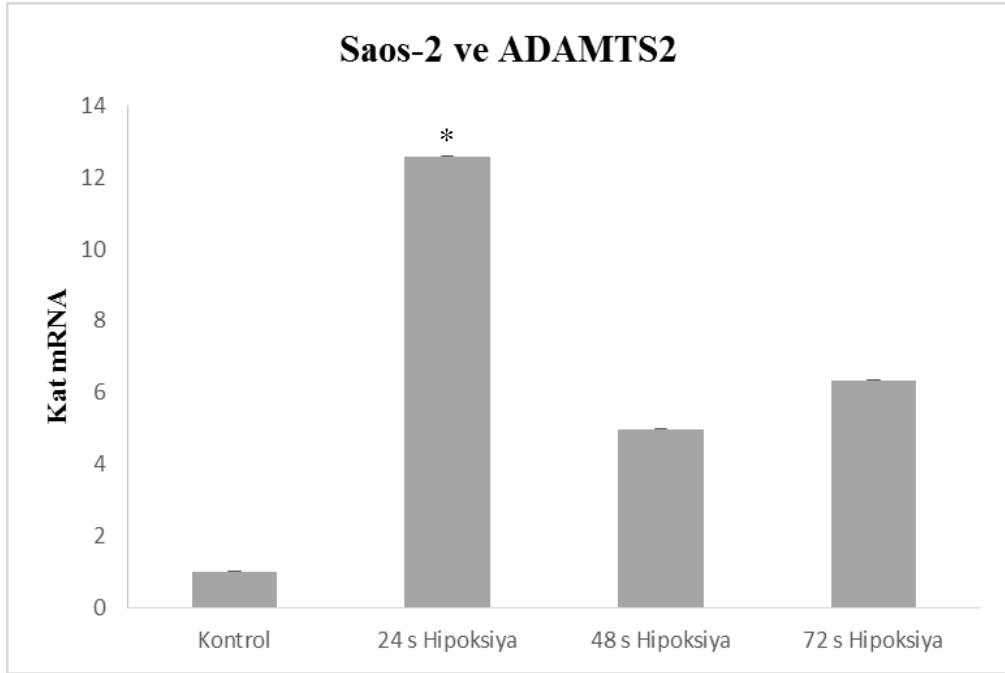
### **3.2.3 Hipoksik Koşulların Hif-1 $\alpha$ ile Doğrulanması**

24., 48. ve 72. saatlerde hücreler tripsinizasyon ile kaldırıldı ve hücreler pellet haline getirildi. Pelletlerden bölüm 2.10.1'de anlatıldığı şekilde RNA izolasyonu gerçekleştirildi. RNA'ların miktar ve saflıkları tespit edildi ve bölüm 2.10.4'teki gibi RNA'lardan 1  $\mu\text{g}$  olacak şekilde cDNA sentezi gerçekleştirildi. q-PZR için elde edilen cDNA'lar 1  $\mu\text{l}$ , 1mM  $\text{MgCl}_2$  ve 0,5  $\mu\text{L}$  100 ng Hif-1  $\alpha$ , ADAMTS2 ve  $\beta 2\text{M}$  primerleri kullanılarak PZR şartları optimize edildi. q-PZR için Tablo 2.21'de kullanılan primerler, Tablo 2.22'deki PZR döngü koşulları verilmiştir. Hipoksiyanın oluşup oluşmadığı elde edilen Hif-1  $\alpha$  sonuçları,  $\beta 2\text{M}$  sonuçları ile karşılaştırılarak kontrol edildi.

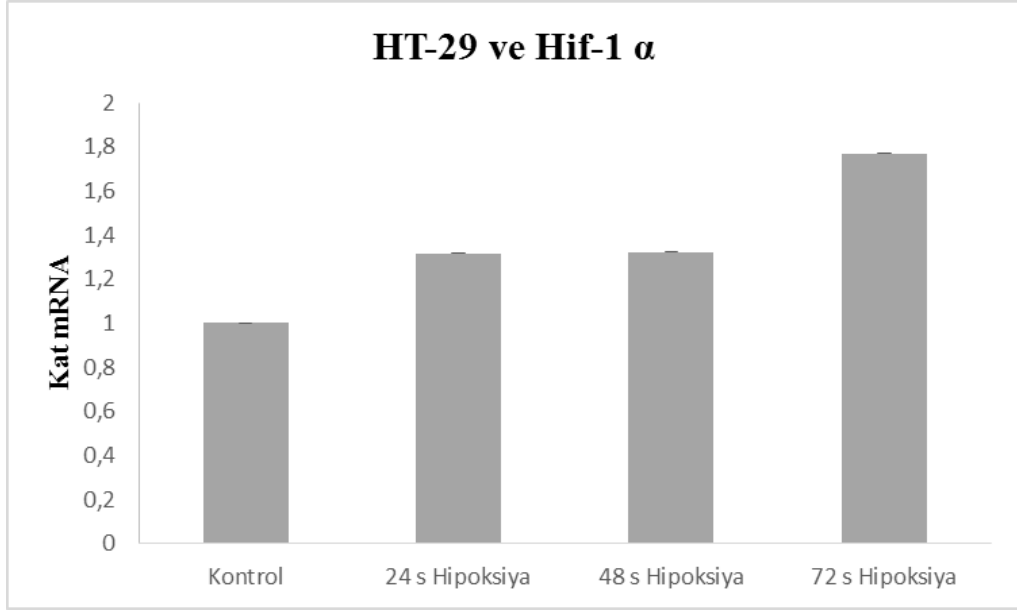
Farklı hücrelerle yapılan hipoksiya çalışmalarının istatistiksel sonuçlarına göre, Saos-2, PC-3, DU-145, MCF-7, HT-29 hücrelerinde yapılan hipoksiya çalışmalarında Saos-2 ve MCF-7 hücrelerinde 24 saat hipoksiya gruplarında kontrol grubuna ve 48 ile 72 saatlere göre artış olduğu belirlenmiştir.



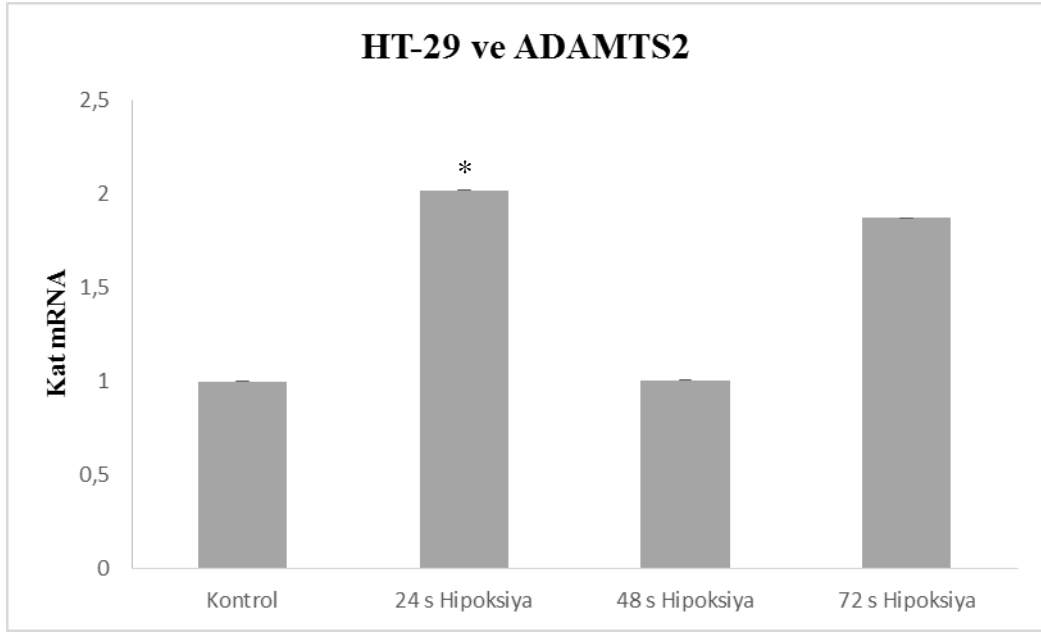
**Şekil 3.10:** Saos-2 hücrelerinde Hif-1  $\alpha$  ile hipoksiyanın doğrulanması.



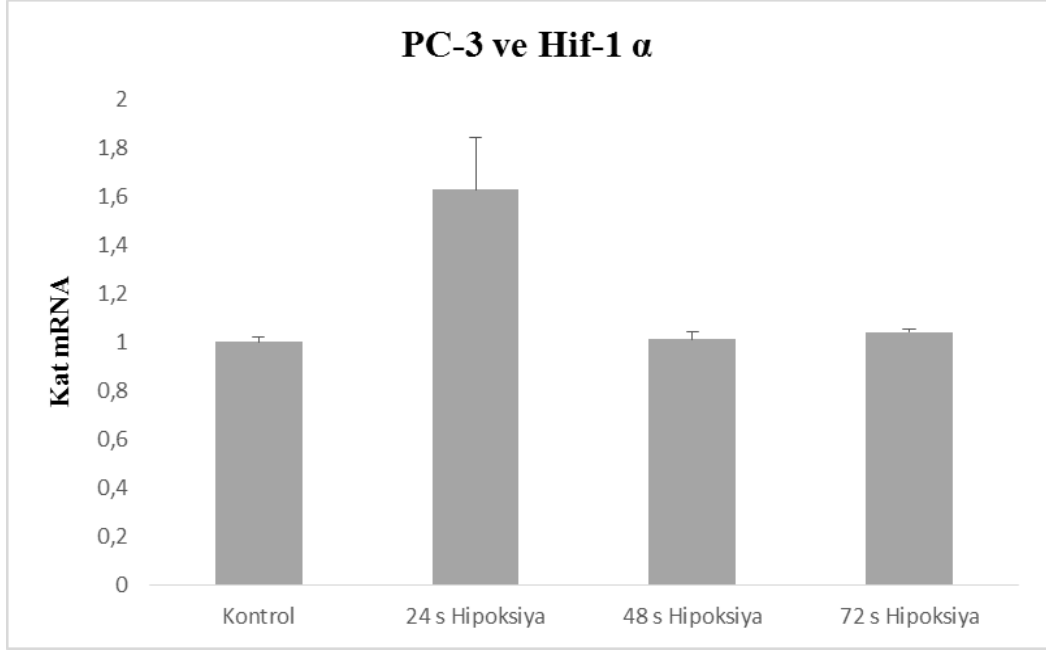
**Şekil 3.11:** Hipoksik koşullarda Saos-2 hücrelerinde ADAMTS2 ekspresyonu.



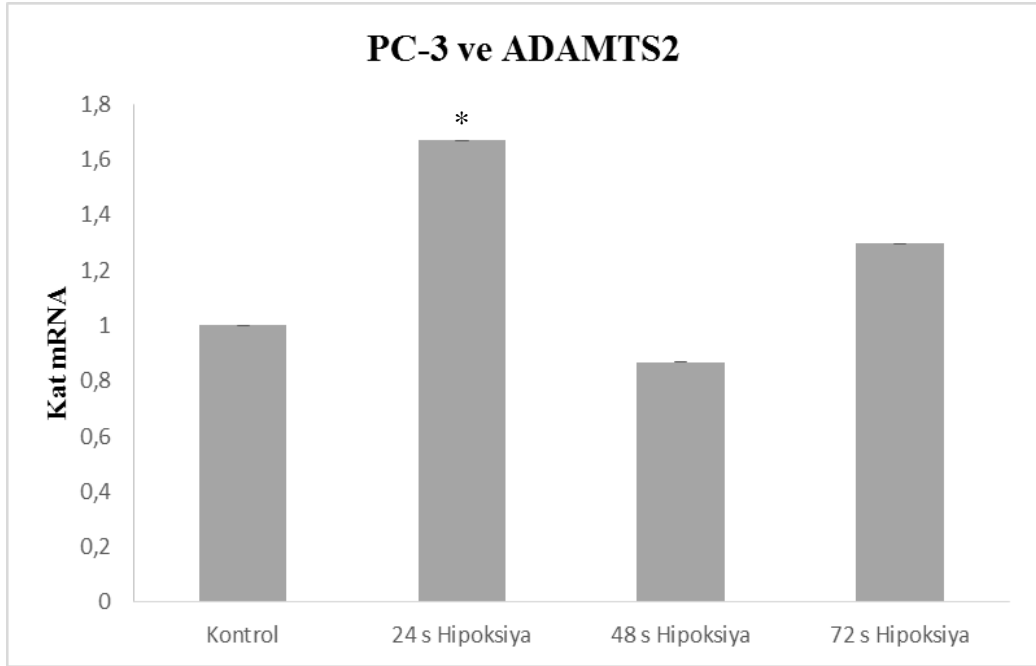
**Şekil 3.12:** HT-29 hücrelerinde Hif-1  $\alpha$  ile hipoksiyanın doğrulanması.



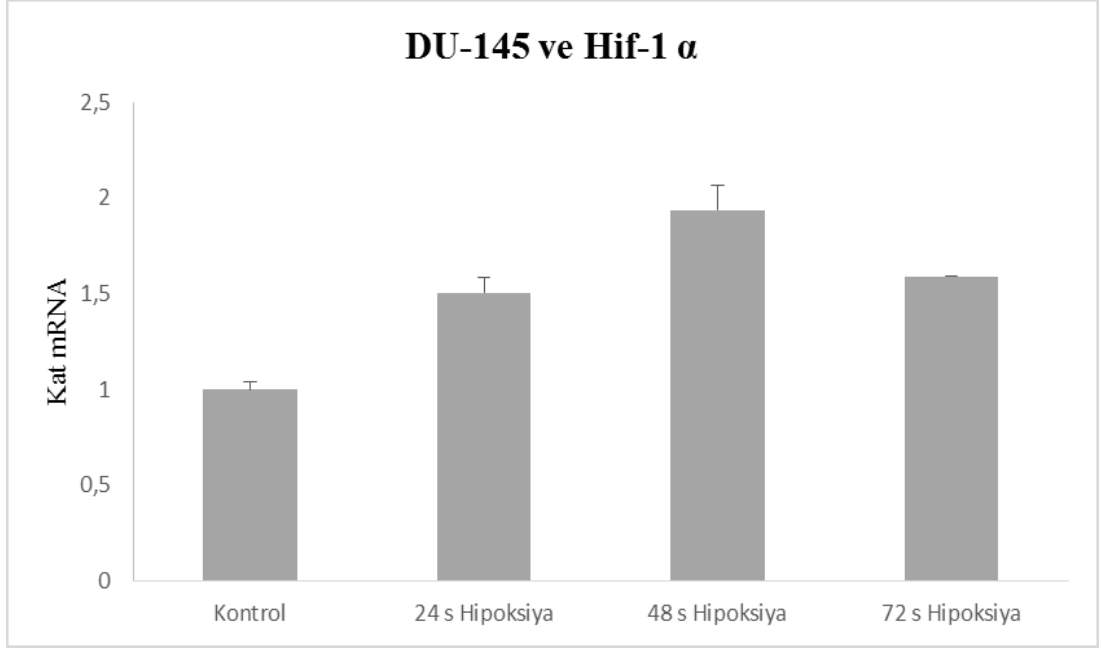
**Şekil 3.13:** Hipoksik koşullarda HT-29 hücrelerinde ADAMTS2 ekspresyonu.



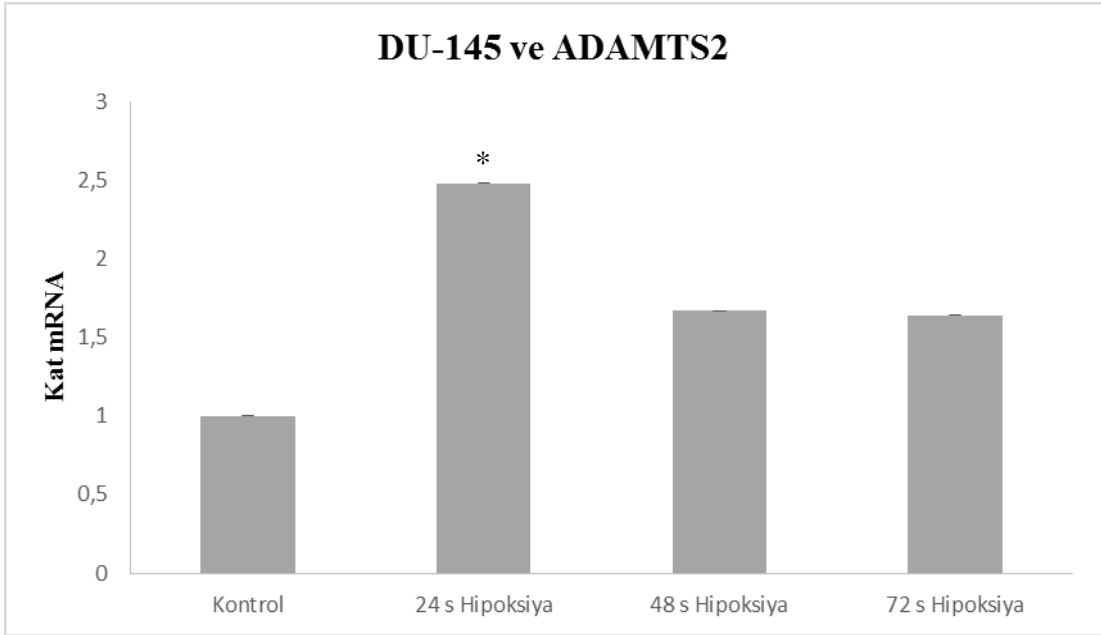
**Şekil 3.14:** PC-3 hücrelerinde Hif-1  $\alpha$  ile hipoksiyanın doğrulanması.



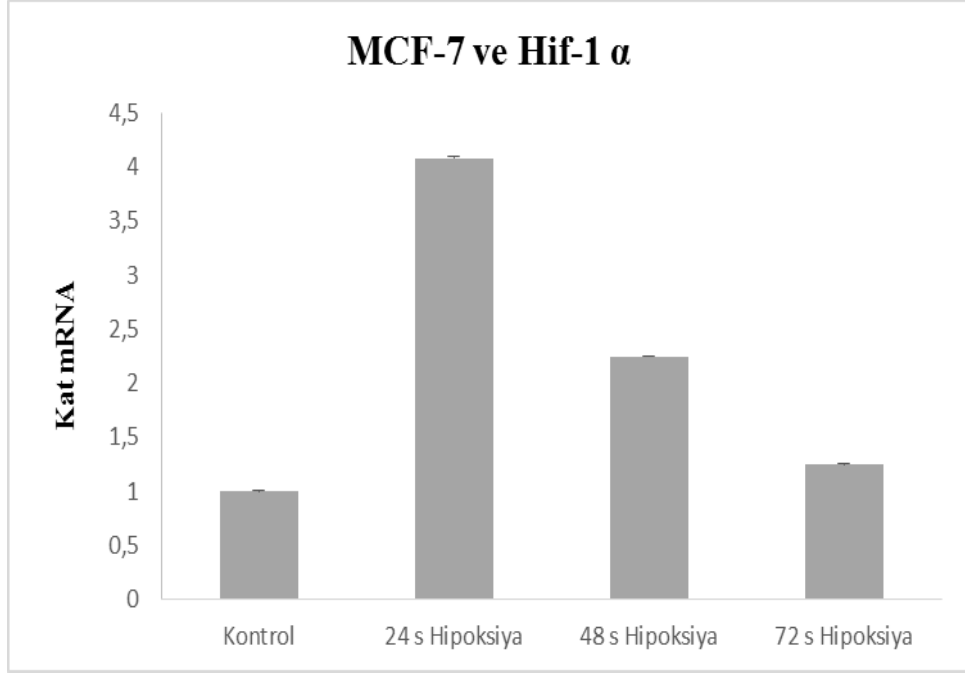
**Şekil 3.15:** Hipoksik koşullarda PC-3 hücrelerinde ADAMTS2 ekspresyonu.



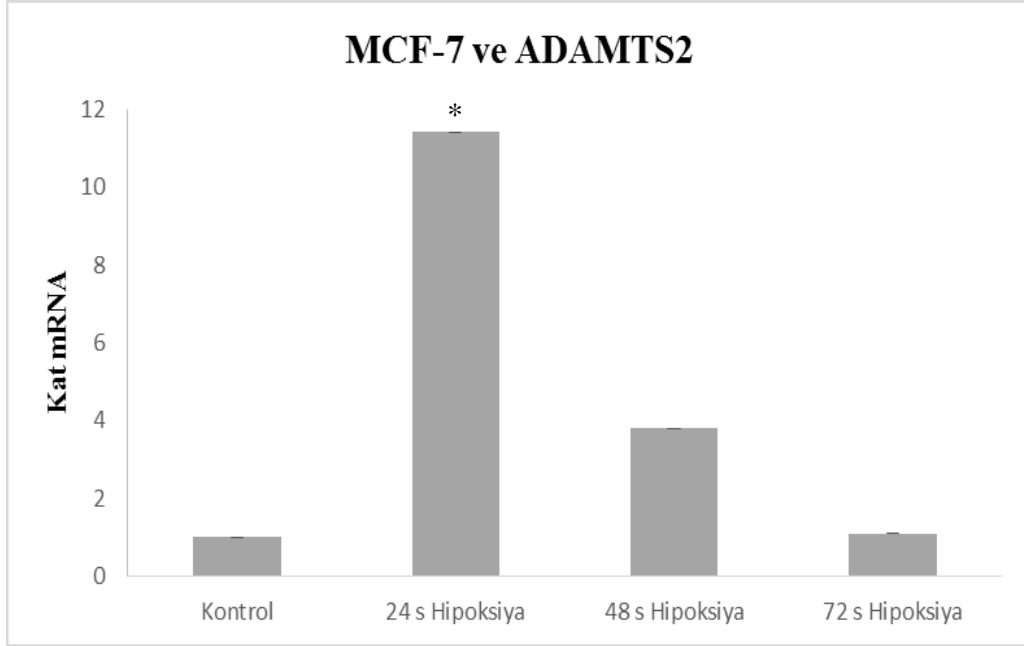
**Şekil 3.16:** DU-145 hücrelerinde Hif-1  $\alpha$  ile hipoksiyanın doğrulanması.



**Şekil 3.17:** Hipoksik koşullarda DU-145 hücrelerinde ADAMTS2 ekspresyonu.



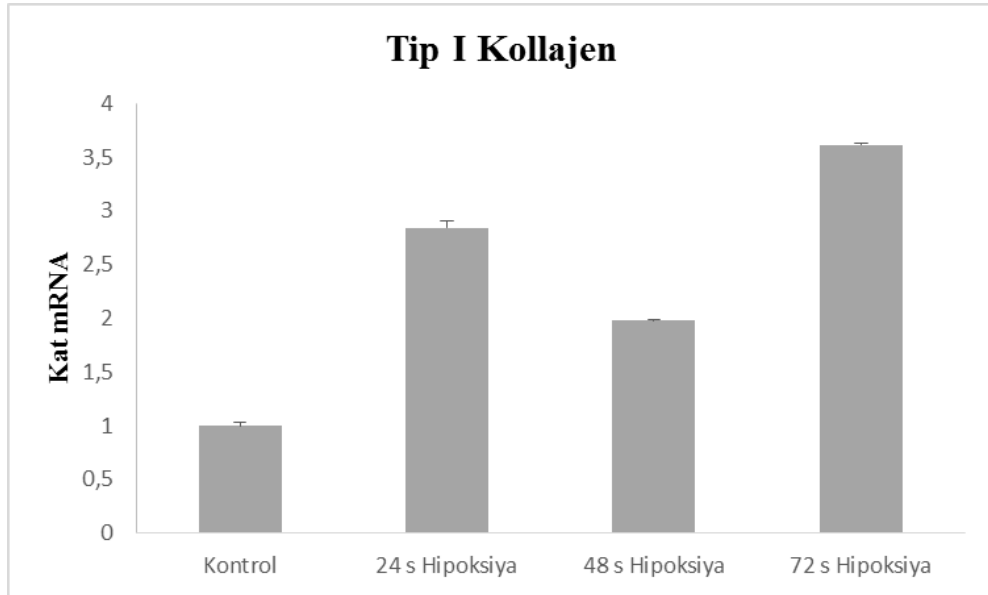
**Şekil 3.18:** MCF-7 hücrelerinde Hif-1  $\alpha$  ile hipoksiyanın doğrulanması.



**Şekil 3.19:** Hipoksik koşullarda MCF-7 hücrelerinde ADAMTS2 ekspresyonu.

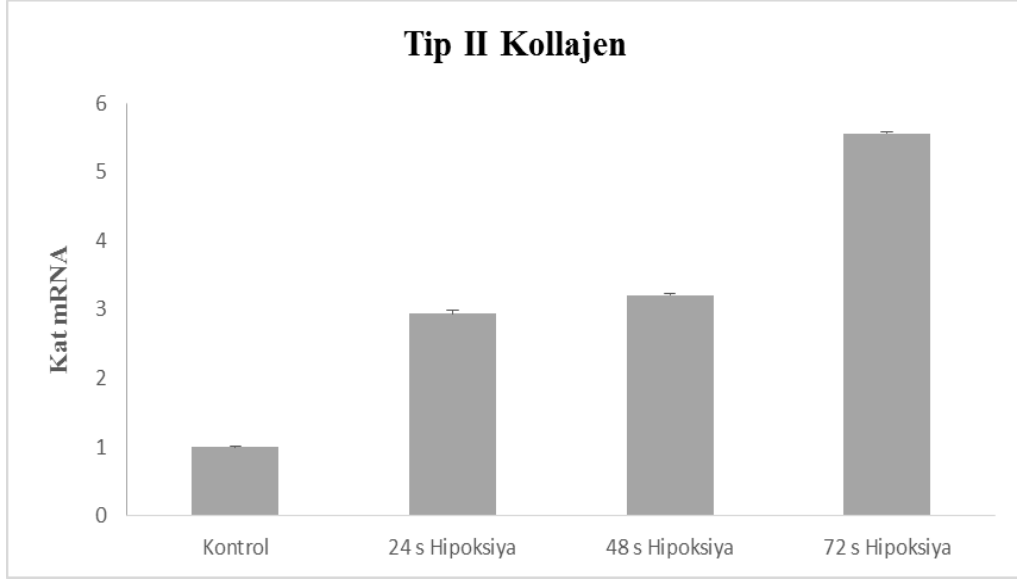
### 3.3 Saos-2 Hipoksik Koşullarda Saos-2 Hücrelerinde ADAMTS2'nin Kollajen Tip I, II ve III'e Etkisi

Saos-2 hücreleri hücre kültürü ortamında 37°C % 5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatörde büyütüldü ve yeterli sayıya ulaşan hücreler sayılarak 2.000.000 hücre olacak şekilde 6 adet 25 cm<sup>2</sup>'lik flasklarda 5 ml medyum içerisine 24, 48 ve 72 saat hipoksiya ve normoksiya için ekimleri yapıldı. Hücrelerin bir gece yüzeye tutunması beklendi. Bir gün sonra hipoksiya flasklarının hücre medyumlarına 150 µM CoCl<sub>2</sub> eklenerek 24, 48, 72 saat hipoksik ortam oluşturuldu. Kontrol grupları olan 24, 48, 72 saat normoksiya flaskalarına hiçbir şey uygulanmadı. 24., 48. ve 72. saatlerdeki deney grupları tripsinizasyon işlemi ile kaldırıldı ve hücrelerden pelletler alındı. Pelletlerden bölüm 2.10.1'deki gibi RNA izole edildi ve bölüm 2.10.4'teki gibi RNA'lardan 1 µg olacak şekilde cDNA sentezlendi. cDNA'lar ile Tablo 2.21'deki gibi hazırlanan ADAMTS2, Kol1A1, Kol2A1, Kol3A1, Hif-1 α ve β2M primerler kullanılarak, Tablo 2.22'deki gibi PZR döngü koşulları ile q-PZR gerçekleştirildi. Elde edilen verilerin istatistiksel analizleri yapıldı.

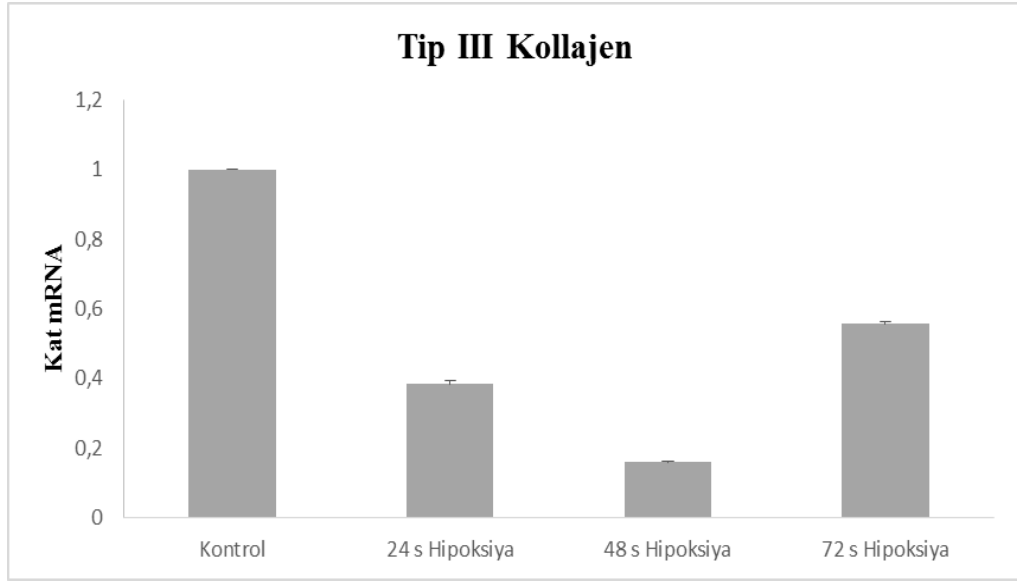


Şekil 3.20: Hipoksiyanın tip I kollajene etkisi.





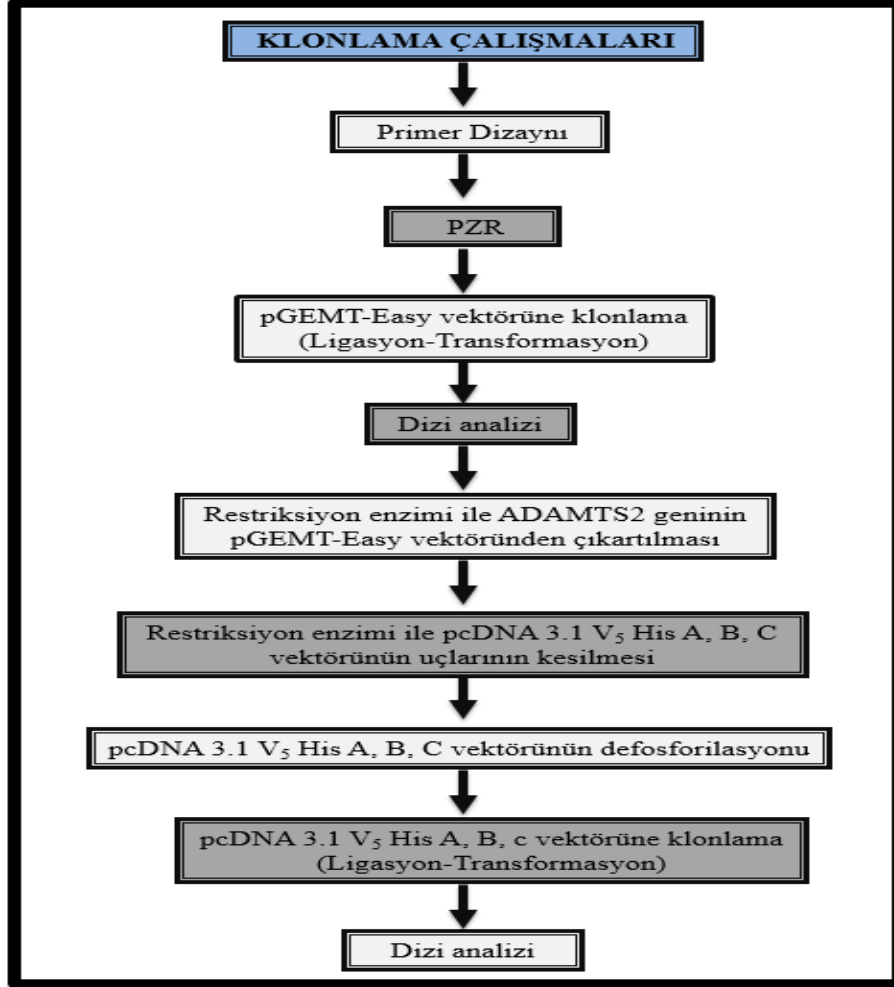
**Şekil 3.21:** Hipoksiyanın tip II kollajene etkisi.



**Şekil 3.22:** Hipoksiyanın tip III kollajene etkisi.

Sonuç olarak Saos-2 hücrelerinde gerçekleştirilen 24, 48 ve 72 saat hipoksiya sonucunda Hif-1  $\alpha$ 'nın tip I ve II kollajenleri aktive ettiği ancak tip III kollajeni inhibe ettiği görülmüştür.

### 3.4 İnsan ADAMTS2 Geninin Klonlanması



Şekil 3.23: ADAMTS2 klonlama çalışmalarının akış diyagramı.

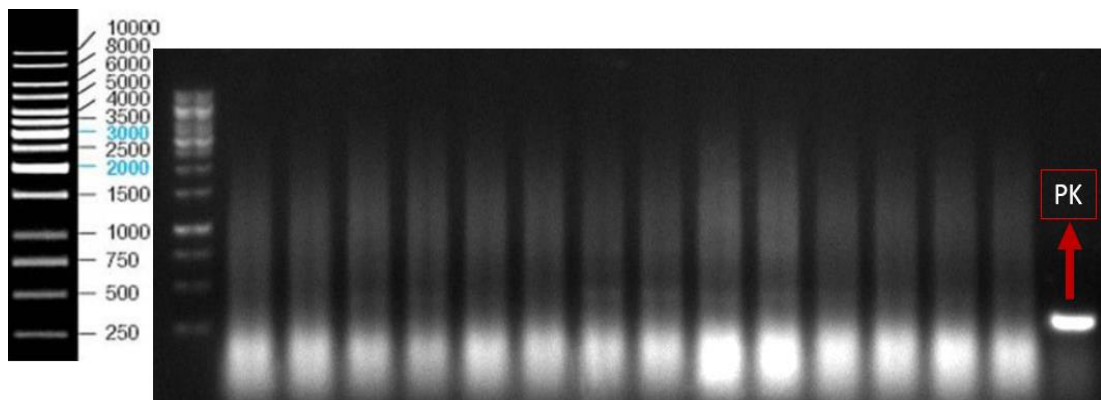
#### 3.4.1 ADAMTS2 Klonlama Primerlerinin Tasarlanması

ADAMTS2 geni primerlerinin tasarımı için “www.ncbi.nlm.nih.gov”, “www.idtdna.com” ve “www.restrictionmapper.org” adreslerinden yararlanıldı. Tasarlanan primerlerin saç tokası yapısı oluşturmamasına, forward ve reverse primerlerin Tm sıcaklıklarına ve % GC oranına dikkat edildi. Tasarlanan primerler databanklarda bulunan DNA sekansları ile “www.ncbi.nlm.nih.gov/blast” adresinden yararlanılarak insan ADAMTS2 geni ile en yüksek benzerliği gösterdiği tespit edildi. ADAMTS2 klonlama primerleri Tablo 2.3’te gösterildiği gibi dizayn edilmiştir.

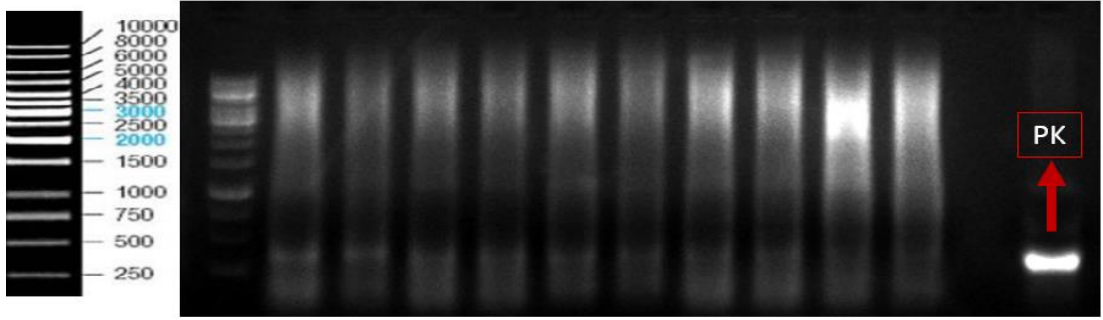
### 3.4.2 ADAMTS2 Geninin PZR Yöntemi ile Çoğaltılması

ADAMTS2 geni yüksek GC oranına sahip olduğu için birçok PZR denemeleri gerçekleştirilmiş ancak başarılı olunamamıştır. Bu nedenle PZR bileşenleri ve PZR döngü koşulları için optimizasyonlar oluşturulmuştur. PZR denemeleri aşağıda basamaklar halinde anlatılmış ve şekiller ile gösterilmiştir.

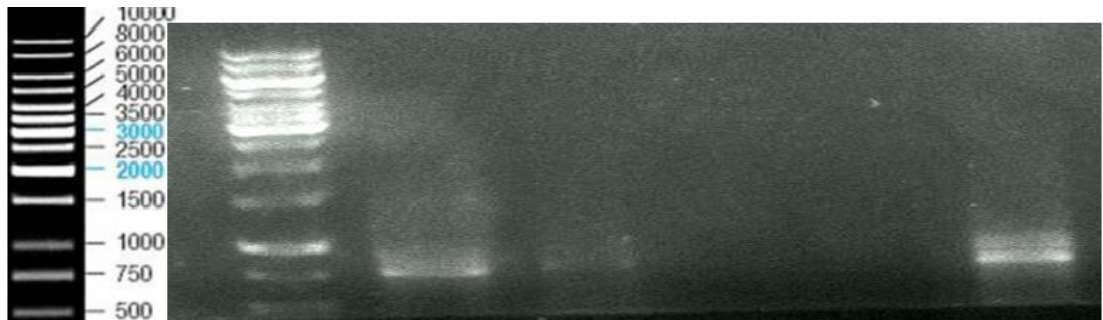
- i. Farklı hücre cDNA'ları (HT-29, MCF-7, DU-145, PC-3, Huvec) kalıp olarak kullanılarak gradient PZR gerçekleştirildi (Şekil 3.24). **“Sonuç: Negatif”**
- ii. ADAMTS2 geni en yüksek MG-63 hücrelerinde ekspresyon çalışmaları (Şekil 3.5) gösterilmiştir. Bu nedenle klonlama çalışmaları için 1 µg MG-63 cDNA'sı kalıp olarak kullanılarak gradient PZR gerçekleştirildi (Şekil 3.25). **“Sonuç: Negatif”**
- iii. cDNA kalıp miktarı artırılıp 3 µg MG-63 cDNA'sı kullanılarak gradient PZR gerçekleştirildi (Şekil 3.26). **“Sonuç: Negatif”**
- iv. MgCl<sub>2</sub> konsantrasyonu optimizasyonu yapıldı. 1 mM, 2 mM ve 3 mM son konsantrasyonda MgCl<sub>2</sub> miktarları ile gradient PZR gerçekleştirildi (Şekil 3.27). **“Sonuç: Negatif”**
- v. En son PZR çalışmalarında kullanılan kuvvetlendirici reaksiyon bileşenleri (Betain, 7 Deaza GTP, DMSO) kullanıldı. Tablo 2.4'teki gibi MG-63 cDNA kalıbı 3 µg olacak şekilde ve Tablo 2.5'teki sıcaklık ve döngü koşulları ile PZR gerçekleştirildi (Şekil 3.28). **“Sonuç: Pozitif”**



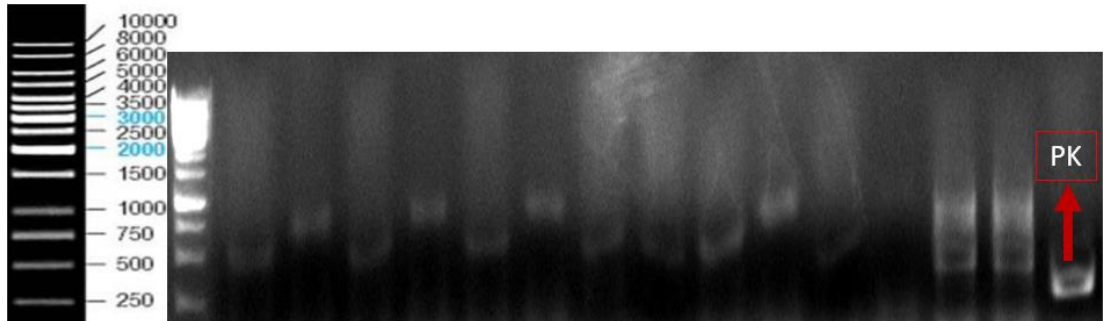
Şekil 3.24: PZR sonucu I (**Sonuç: Negatif**).



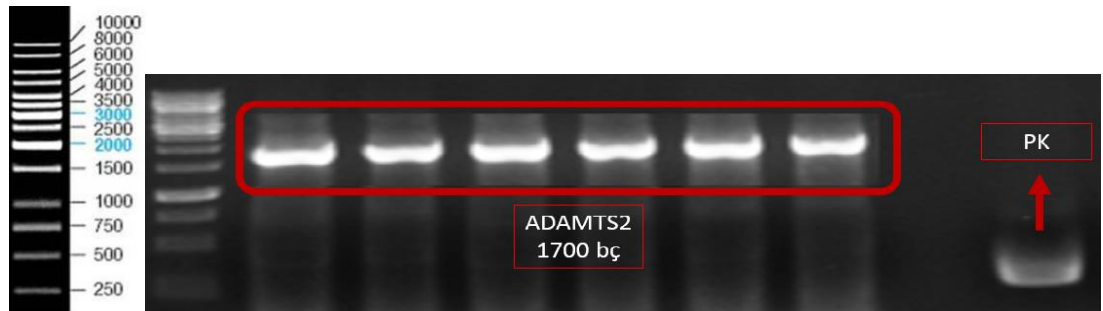
Şekil 3.25: PZR sonucu II (Sonuç: Negatif).



Şekil 3.26: PZR sonucu III (Sonuç: Negatif).



Şekil 3.27: PZR sonucu IV (Sonuç: Negatif).

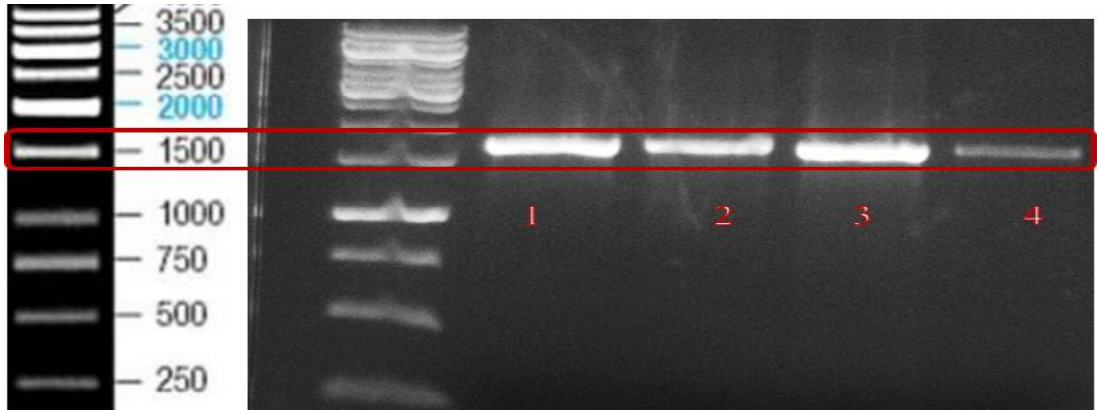


Şekil 3.28: PZR sonucu V (Sonuç: Pozitif).

Şekil 3.28’de gösterildiği üzere PZR bileşenlerinin miktarında ve PZR döngü koşullarında çeşitli optimizasyonlar yapıldı. En son uygun koşulların sağlandığı PZR gerçekleştirildi ve PZR ürünleri bölüm 2.5.2.1’de anlatıldığı gibi hazırlanan agaroz jele yüklendi ve jel elektroforezinde yürütüldü. UVP görüntüleme sistemi ile sonuçlar görüntüledi. Sonuçta 1700 baz çifti (bç) büyüklüğündeki ADAMTS2 geninin çoğaltılması başarılı.

### 3.4.3 pGEMT-Easy Vektör Sistemine Klonlama

1700 bç’lik ADAMTS2 geni PZR yöntemi ile çoğaltıldığı agaroz jel elektroforez sonucunda görüldü (Şekil 3.28’de ADAMTS2 DNA bantları işaretlenmiştir). Daha sonra bölüm 2.5.2.2 anlatıldığı gibi ADAMTS2 DNA’sı agaroz jelden saflaştırıldı. Saflaştırıldığı düşünülen DNA parçasının az bir miktarı tekrar jele yüklenerek yürütüldü ve görüntüleri kaydedildi (Şekil 3.29).



**Şekil 3.29:** Agaroz jelden saflaştırılan ADAMTS2 insert; 1., 2. ve 3. bant: 1. elüzyon insert, 4.bant: 2. elüzyon insert.

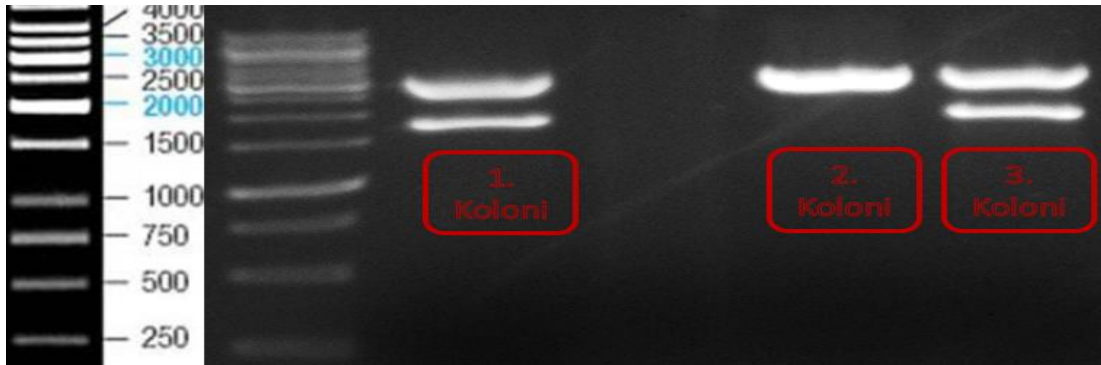
Şekil 3.29’da görüldüğü gibi ADAMTS2 DNA’sı, agaroz jelden başarı ile geri kazanıldı. ADAMTS2’nin ligasyonu bölüm 2.5.3’te anlatıldığı gibi pGEMT-Easy vektörüne T:A klonlama stratejisi ile gerçekleştirildi. Tablo 2.7’deki ligasyon koşulları uygulandı.

### 3.4.3.1 Kompetant Hücelere Transformasyon

pGEMT-Easy vektörüne ligasyonu yapıldığı düşünülen ligasyon ürünü bölüm 2.6.4'teki şekilde hazırlanan DH5 $\alpha$  ve XL-1 blue kompetant hücelere bölüm 2.6.5'te anlatıldığı gibi transforme edildi. Ampisilin antibiyotiği içeren petrilere 20  $\mu$ L X-Gal (stok 50 mg/ml) ve 100  $\mu$ L IPTG (100 mM stok) yayılarak mavi-beyaz koloni seçimi yapıldı.

### 3.4.3.2 pGEMT-Easy Vektörüne Yapılan Ligasyonun Kontrolü

Antibiyotikli ortamda kolonilerden seçim yapılarak plazmit izolasyonu bölüm 2.6.7'deki gibi gerçekleştirildi. Daha sonra saflaştırılan plazmit DNA'ların ADAMTS2 genini içerip içermediğini kontrol etmek amacıyla restriksiyon endonükleaz enzim stratejisi ile plazmitler kesildi (Şekil 3.30) ve geni içeren plazmitler dizilemeye gönderildi.



**Şekil 3.30:** EcoRI enzimi ile pGEMT-Easy vektörüne ligasyonun kontrolü.

Şekil 3.30'da görüldüğü üzere 1. ve 3. kolonide öndeki bantta 1700 bp'lik ADAMTS2 geni ve arkadaki bantta ADAMTS2'nin klonlu olduğu pGEMT-Easy vektörü bulunmaktadır. 2. kolonide ise sadece vektör görülmektedir. Bu nedenle ADAMTS2 genini içeren 1.koloni ve 3. koloni dizilemeye gönderilmiştir.

### 3.4.3.3 Dizi Analizi

ADAMTS2'nin hem nükleotitlerinin hatasız olması hem de vektöre doğru oryantasyonda yerleşmesi gerekir. Çünkü herhangi bir mutasyon ya da ters oryantasyonda olması RNA ve protein ifadesinde farklılıklara yol açabilir ya da ifade olmamasına neden olabilir. Bu sebeplerle dizilemelerin ve dizilemelere göre analizlerin yapılması ekspresyon çalışmalarında önem arz etmektedir.

Klonlandığı düşünülen ADAMTS2 geninin dizi analizine gönderilmesi için 1. ve 3. kolonilerden 100 ng olacak şekilde plazmitler hazırlandı, Tablo 2.3'teki klonlama primerleri ve Tablo 3.1'deki dizileme primerleri 20 ng olacak şekilde hazırlandı ve dizilemeye gönderildi. 1700 bp büyüklüğündeki ADAMTS2 geninin tüm nükleotitlerinin daha iyi ve eksiksiz okunması için dizileme primerleri tasarlanmıştır (Tablo 3.1).

**Tablo 3.1:** ADAMTS2 dizileme primerleri.

ADAMTS2 Dizileme Primerleri	Dizisi
ADAMTS2 Forward	5'TGGCGCTCAGCAACTGCGAT3'
ADAMTS2 Reverse	5'AAGCCGTCCTCATGGTTCAG'3

Dizileme sonucu nükleotit dizileri internet ortamında NCBI-blast programı ile karşılaştırıldı. % 100 ADAMTS2 genine ait olduğu belirlendi (Şekil 3.31). Ancak 38. ve 786. nükleotitte değişiklik meydana geldiği görüldü. Bu nedenle tekrar dizilemeye gönderildi ancak burada da sonuç değişmediği ortaya çıktı. Bunun üzerine 2 nükleotitteki değişiklik ADAMTS2'de çerçeve kaymasına, stop kodunu oluşturup oluşturmadığına veya protein düzeyinde farklılıklara yol açıp açmadığına NCBI programından bakıldı. Neticide çerçeve kaymasına neden olmadığı, stop kodunu oluşturmadığı ve translasyonda farklılığa neden olmadığı belirlendi.





NCBI	661	CTCGGGGGCCACAGGCCCTGGACACAGGGCCCTCCCTGGACAGCCTGGACAGCCTCAGC	720
ADAMTS2	661	CTCGGGGGCCACAGGCCCTGGACACAGGGCCCTCCCTGGACAGCCTGGACAGCCTCAGC	720
NCBI	721	CGCGCCCTGGGCGTCTTAGAGGAGCACGCCAACAGCTCGAGGCGGAGGGCACGCAGGCAT	780
ADAMTS2	721	CGCGCCCTGGGCGTCTTAGAGGAGCACGCCAACAGCTCGAGGCGGAGGGCACGCAGGCAT	780
NCBI	781	GCTGCGGACGATGACTACAACATCGAGGTCTGCTGGGCGTGGATGACTCTGTGGTGCAG	840
ADAMTS2	781	GCTGCAGACGATGACTACAACATCGAGGTCTGCTGGGCGTGGATGACTCTGTGGTGCAG	840
NCBI	841	TTCCACGGGAAGGAGCACGTACAGAAGTACCTGCTGACACTCATGAACATTGTCAATGAA	900
ADAMTS2	841	TTCCACGGGAAGGAGCACGTACAGAAGTACCTGCTGACACTCATGAACATTGTCAATGAA	900
NCBI	901	ATCTACCATGACGAGTCTTGGGTGCCACATCAACGTGGTCTGGTGC GGATCATCCTC	960
ADAMTS2	901	ATCTACCATGACGAGTCTTGGGTGCCACATCAACGTGGTCTGGTGC GGATCATCCTC	960
NCBI	961	CTGAGCTATGGAAAGTCCATGAGCCTCATCGAGATCGGGAACCCCTCTCAGAGCCTGGAG	1020
ADAMTS2	961	CTGAGCTATGGAAAGTCCATGAGCCTCATCGAGATCGGGAACCCCTCTCAGAGCCTGGAG	1020
NCBI	1021	AATGTCTGCCGCTGGGCTACCTCCAGCAGAAGCCAGACACGGGCCACGATGAATACCAC	1080
ADAMTS2	1021	AATGTCTGCCGCTGGGCTACCTCCAGCAGAAGCCAGACACGGGCCACGATGAATACCAC	1080
NCBI	1081	GATCAGCCATCTTCTCACACGGCAGGACTTTGGGCTTCCGGCATGCAAGGCTATGCT	1140
ADAMTS2	1081	GATCAGCCATCTTCTCACACGGCAGGACTTTGGGCTTCCGGCATGCAAGGCTATGCT	1140
NCBI	1141	CCTGTCACCGGCATGTGCCATCCGGTCCGCAGCTGCACCCTGAACCATGAGGACGGCTTC	1200
ADAMTS2	1141	CCTGTCACCGGCATGTGCCATCCGGTCCGCAGCTGCACCCTGAACCATGAGGACGGCTTC	1200
NCBI	1201	TCCTCAGCGTTTGTGGTGGCCCATGAGACTGGCCACGTGCTGGGCATGGAGCACGACGGG	1260
ADAMTS2	1201	TCCTCAGCGTTTGTGGTGGCCCATGAGACTGGCCACGTGCTGGGCATGGAGCACGACGGG	1260

Şekil 3.31: (devam).

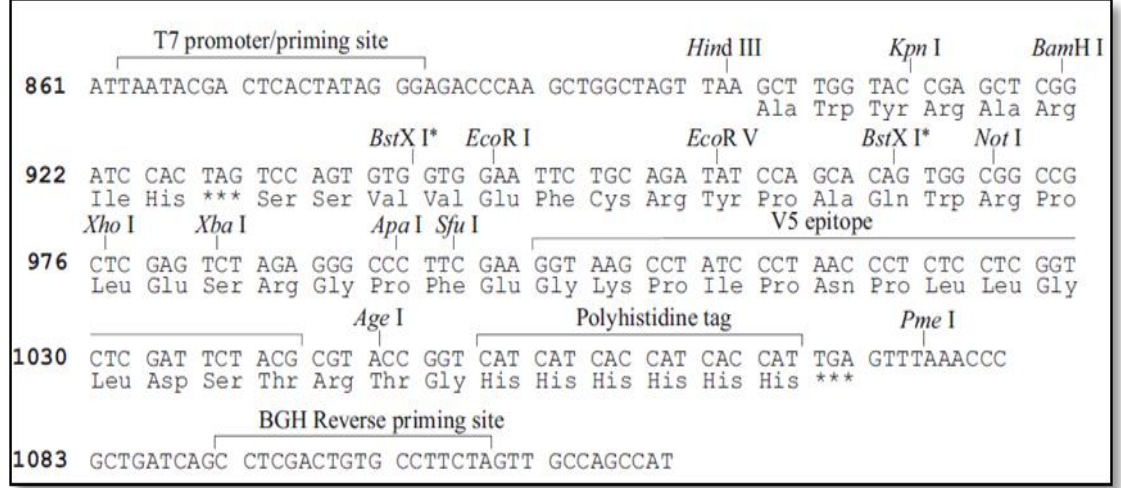
NCBI	1261	CAGGGCAACCGCTGTGGCGACGAGGTGCGGCTGGGCAGCATCATGGCGCCCTGGTGCAG	1320
ADAMTS2	1261	CAGGGCAACCGCTGTGGCGACGAGGTGCGGCTGGGCAGCATCATGGCGCCCTGGTGCAG	1320
NCBI	1321	GCCGCCTTCCACCGCTTCCACTGGTCCCGCTGCAGCCAGCAGGAGCTGAGCCGCTACCTG	1380
ADAMTS2	1321	GCCGCCTTCCACCGCTTCCACTGGTCCCGCTGCAGCCAGCAGGAGCTGAGCCGCTACCTG	1380
NCBI	1381	CACTCCTATGACTGCCTGCTGGATGACCCCTTCGCCACGACTGGCCGGCGCTGCCCCAG	1440
ADAMTS2	1381	CACTCCTATGACTGCCTGCTGGATGACCCCTTCGCCACGACTGGCCGGCGCTGCCCCAG	1440
NCBI	1441	CTCCGGGACTGCACTACTCCATGAACGAGCAATGCCGCTTTGACTTCGGCCTGGGCTAC	1500
ADAMTS2	1441	CTCCGGGACTGCACTACTCCATGAACGAGCAATGCCGCTTTGACTTCGGCCTGGGCTAC	1500
NCBI	1501	ATGATGTGCACGGCGTTCCGGACCTTTGACCCCTGCAAGCAGCTGTGGTGCAGCCATCCT	1560
ADAMTS2	1501	ATGATGTGCACGGCGTTCCGGACCTTTGACCCCTGCAAGCAGCTGTGGTGCAGCCATCCT	1560
NCBI	1561	GACAACCCCTACTTTTGCAAGACCAAGAAGGGGCCCCCTTGGACGGGACTATGTGTGCA	1620
ADAMTS2	1561	GACAACCCCTACTTTTGCAAGACCAAGAAGGGGCCCCCTTGGACGGGACTATGTGTGCA	1620
NCBI	1621	CCTGGCAAGTTCAGGCCGGCGCGGTGGCTCATGCCTGTTATCCCAGCACTTTGGGAGGC	1680
ADAMTS2	1621	CCTGGCAAGTTCAGGCCGGCGCGGTGGCTCATGCCTGTTATCCCAGCACTTTGGGAGGC	1680
NCBI	1681	CAAGGTAGGTGGATCGCCTGA	1701
ADAMTS2	1681	CAAGGTAGGTGGATCGCCTGA	1701

Şekil 3.31: (devam).

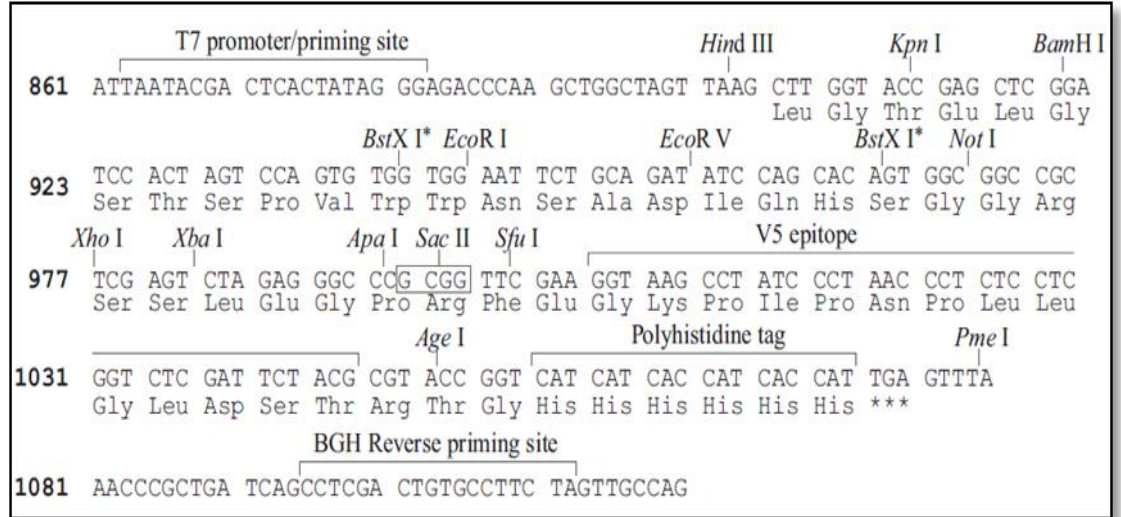
#### 3.4.4 pcDNA 3.1 V<sub>5</sub> His A, B, C Vektörüne Alt Klonlanma

pGEMT-Easy vektöründe klonlu olan ADAMTS2 DNA'sının ökaryotik hücrelerdeki ekspresyonlarını inceleyebilmek için ökaryotik bir vektör olan pcDNA 3.1 V<sub>5</sub> His A, B, C vektör sisteminden His A vektörüne klonlandı. His A, B ve C vektörleri karşılaştırıldığında kesim bölgelerindeki bazı restriksiyon endonükleaz

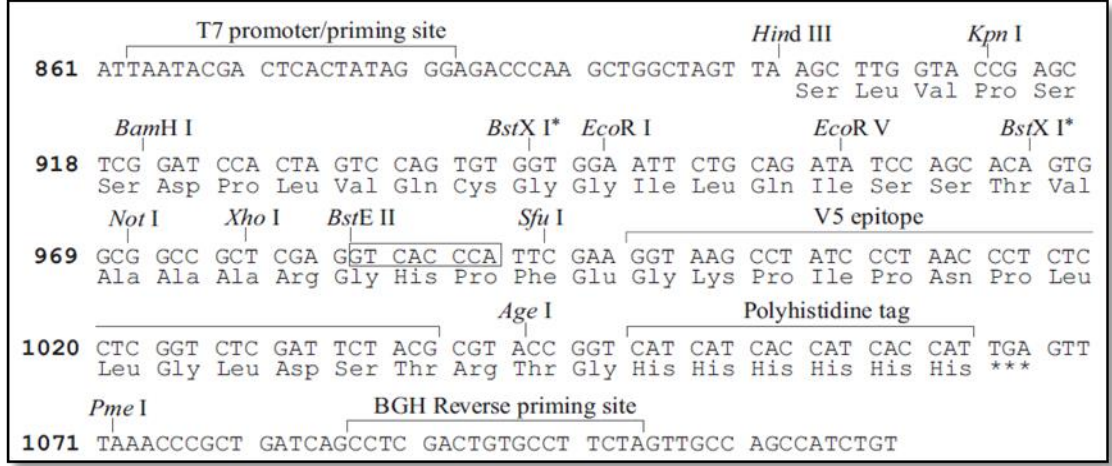
enzimlerdeki farklılık olduğu ortaya çıktı (Şekil 3.32, 3.33, 3.34). Hem vektör dizisinin hem de ADAMTS2 dizisinin enzim bölgelerinin uygunluğu dikkate alınarak His A vektörünün seçilmesine karar verildi. Daha sonra pGEMT-Easy'den His A vektörüne klonlama işlemleri bölüm 2.5.4.1'deki basamaklar halinde gerçekleştirildi.



Şekil 3.32: pcDNA 3.1 V<sub>5</sub> His A vektör klonlama bölgesi.



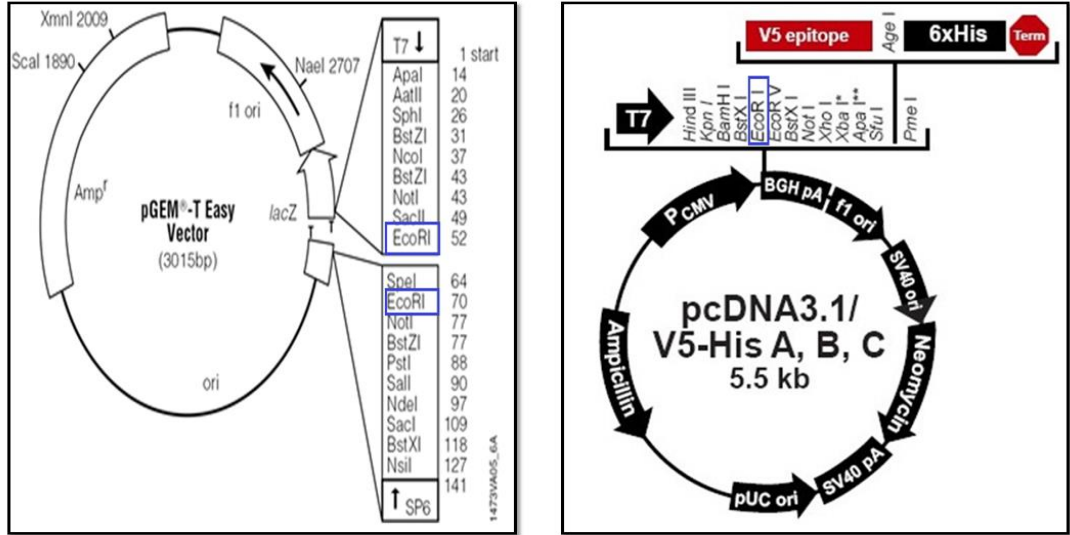
Şekil 3.33: pcDNA 3.1 V<sub>5</sub> His B vektör klonlama bölgesi.



Şekil 3.34: pcDNA 3.1 V<sub>5</sub> His C vektör klonlama bölgesi.

### 3.4.4.1 ADAMTS2 Geninin pGEMT-Easy Vektöründen Çıkarılması

ADAMTS2 geninin restriksiyon haritası (bkz. Ek-C) çıkarıldı. Restriksiyon haritasındaki hem ADAMTS2 gen dizisini kesmeyen hem de pGEMT-Easy vektörünün klonlama bölgesinde bulunan enzimler incelendi. Aynı zamanda seçilecek enzimin His A vektörünün klonlama bölgesine uyumlu olmasına dikkat edildi (Şekil 3.35).

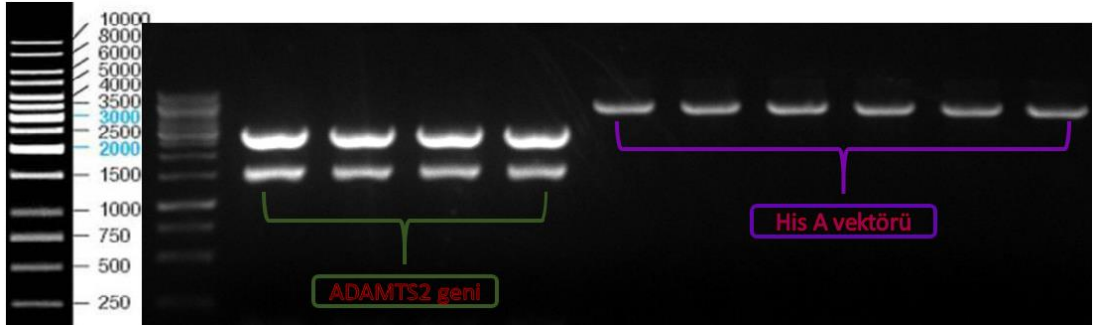


Şekil 3.35: pGEMT-Easy vektöründen His A vektörüne klonlamada tek enzim stratejisinde kullanılan EcoRI enziminin seçilmesi.

Netice olarak EcoRI enzimi seçildi ve Tablo 2.8'deki kesim koşulları ile ADAMTS2 geni pGEMT-Easy vektöründen kesilerek çıkartıldı.

#### 3.4.4.2 His A Vektörünün Kesilmesi ve Defosforilizasyonu

His A vektörü halkasal yapıda olan boş bir vektördür. Bu vektöre ligasyon gerçekleştirebilmek için vektörün klonlama bölgesinde bulunan enzimler ile kesilerek uçlarının açık hale gelmesi gerekir ve böylece istenilen geninin ligasyonu gerçekleştirilir. Bu doğrultuda ADAMTS2 geninin His A vektörüne klonlanması için vektörün uçlarının EcoRI enzimi ile kesimi gerçekleştirildi (Tablo 2.8).



**Şekil 3.36:** EcoRI enzimi ile pGEMT-Easy vektöründen çıkan ADAMTS2 geni ve klonlama bölgesindeki uçları kesilen His A vektörü.

Tek enzim ile kesildiği için açık olan iki ucun tekrar birleşmesi ya da yanlış katlanmalar yapması muhtemeldir. Bu nedenle fosfataz enzimi ile fosfat gruplarının çıkartılması (defosforilizasyon) sağlandı. Defosforilizasyon Tablo 2.9'da olduğu gibi gerçekleştirilmiştir.

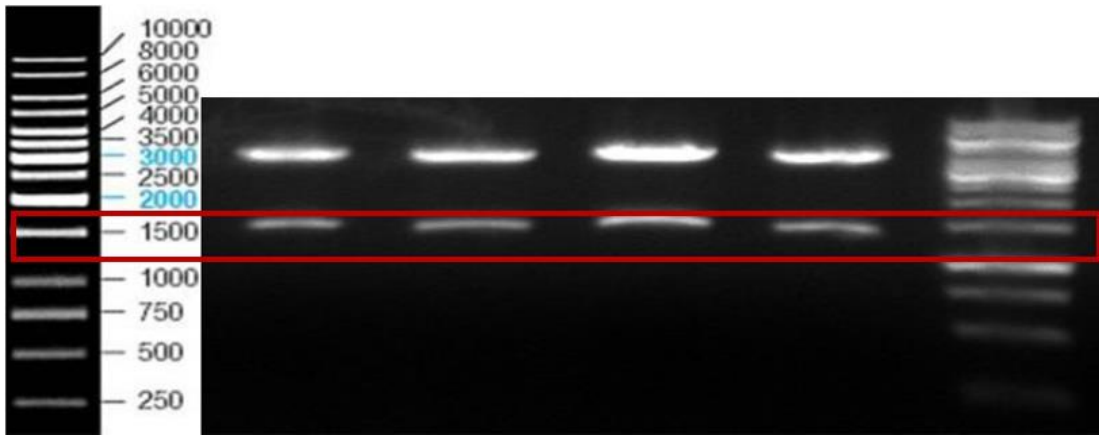
#### 3.4.4.3 His A Vektörüne Ligasyon

ADAMTS2 geninin His A vektörüne ligasyonu bölüm 2.5.5 Tablo 2.10'da anlatıldığı koşullarda gerçekleştirildi. Ligasyon ürünlerinin XL-1 Blue kompetant hücrelerine transformasyonu bölüm 2.6.5'te anlatıldığı şekilde gerçekleştirildi. Transformantlar ampisilinli LB agara tek koloni şeklinde ekildi ve 37°C inkübatörde bir gece üremeleri için bekletildi. Oluşan tek kolonilerden seçim yapılarak ampisilinli LB medyuma ekim yapıldı ve 37°C inkübatörde bir gece bekletildi. Bir gün sonra

üreyen kültür 4000 rpm’de 10 dakika santrifüj edilerek çöktürüldü ve daha sonra oluşan hücre pelletlerinden bölüm 2.6.7’deki gibi plazmit izole edildi. Plazmitlerin ADAMTS2 genini içerip içermediği restriksiyon endonükleaz enzimiyle kontrol kesim yapılarak belirlendi.

#### 3.4.4.4 His A Vektörüne Ligasyonun Kontrolü

Elde edilen plazmitlerin ADAMTS2 genini içerip içermediği EcoRI ile kontrol kesimi yapılarak belirlendi (Şekil 3.37).



Şekil 3.37: EcoRI ile His A vektörüne ligasyonun kontrolü.

#### 3.4.4.5 Dizi Analizi

İlk pGEMT-Easy vektörüne klonlanan ADAMTS2 geni doğrudan kesim enzimleri ile kesilerek ikinci bir vektöre atıldığı için nükleotit dizisinde herhangi bir değişiklik olmayacaktır ancak His A vektörüne hangi oryantasyonda klonlandığının belirlenmesi amacıyla dizilemeye gönderilmesi mecburidir. Bu nedenden dolayı klonlandığı düşünülen ADAMTS2 geninin dizi analizine gönderilmesi için kolonilerden 100 ng olacak şekilde plazmitler hazırlandı. Tablo 2.3’teki klonlama primerleri ve Tablo 3.1’deki dizileme primerleri 20 ng olacak şekilde hazırlandı ve dizilemeye gönderildi.

Dizileme sonuçları doğrultusunda yapılan analizler sonucu ADAMTS2’nin His A vektörüne doğru oryantasyonda klonlandığı ve NCBI-blast yöntemi ile % 100 ADAMTS2 geni olduğu belirlendi.

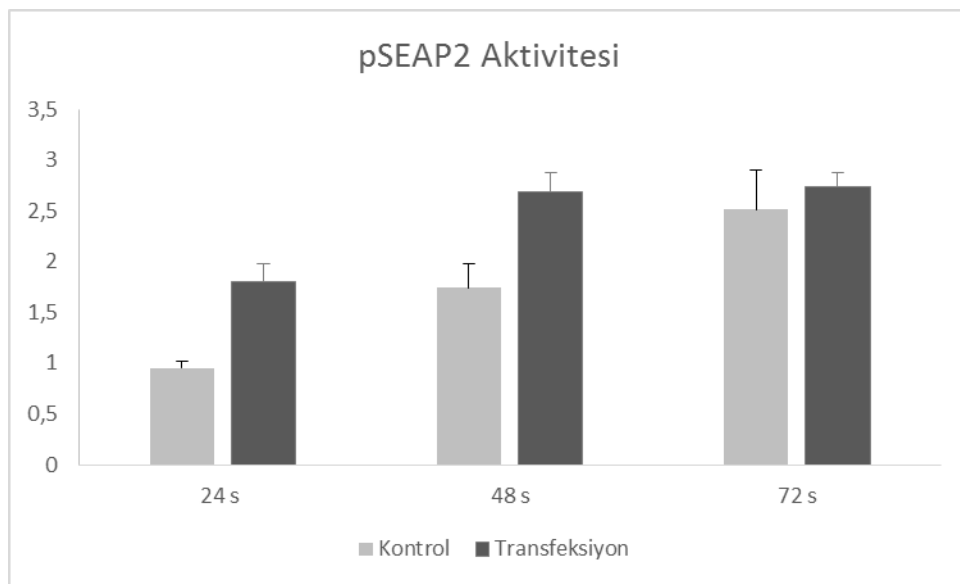
### 3.5 ADAMTS2 Geninin Geçici Transfeksiyonu

Klonlanması yapılan ADAMTS2'nin model olarak seçilen Saos-2 hücrelerindeki ekspresyonunu gözlemlemek amacıyla önce yüksek saflıkta ve yüksek yoğunlukta ADAMTS2 geni içeren DNA plazmitleri (maxiprep) elde edildi. DNA plazmitlerinin Saos-2 hücrelerine transfeksiyonu gerçekleştirildi. Geçici transfeksiyon için stratejiler aşağıdaki gibi gerçekleşmiştir.

- Lipofektamin kiti ile kitin ön gördüğü koşullarda geçici transfeksiyon denemeleri gerçekleştirildi. **“Sonuç: Negatif”**
- Fugen kiti ile kitin ön gördüğü koşullarda geçici transfeksiyon denemeleri gerçekleştirildi. **“Sonuç: Negatif”**
- Kalsiyum-fosfat tekniği ile geçici transfeksiyon denemeleri gerçekleştirildi. **“Sonuç: Pozitif”**

#### 3.5.1 Transfeksiyonun Kontrolü

Saos-2 hücrelerinde ADAMTS2'nin transfeksiyonun kontrolü için kontrol hücre gruplarından ve transfekte hücre gruplarından 24, 48 ve 72 saatlerde bir miktar medyum ependorflara ayrıldı. Bölüm 2.8.3'teki gibi medyumlardan pSEAP2 aktivitesi ölçüldü. Ölçüm sonucunda elde edilen değerlerin istatistiksel analizleri yapıldı (Şekil 3.38).



Şekil 3.38: Transfeksiyon sonucunda pSEAP2 aktivitesi.

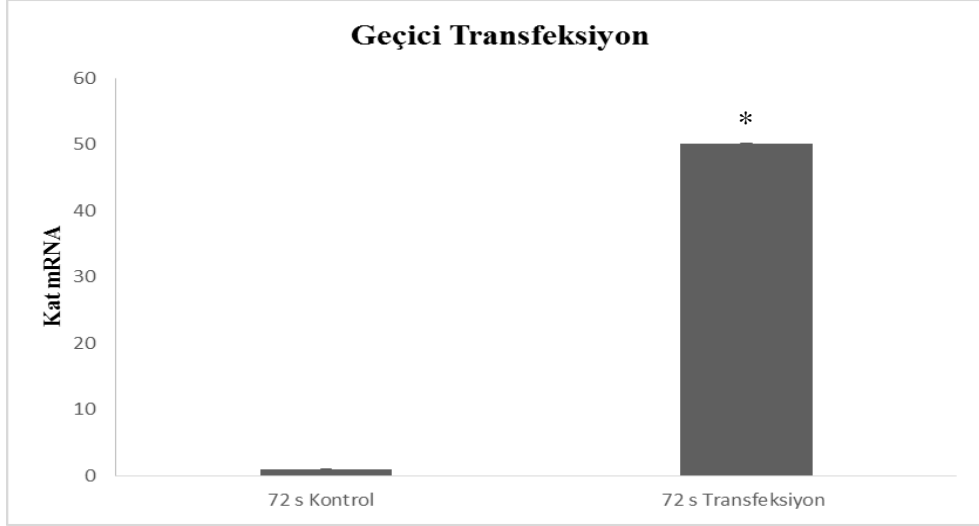


Ölçüm sonuçlarında kontrol grubuna göre transfeksiyon grubunun pSEAP2 aktivitesi daha yüksek çıkmıştır ayrıca 24, 48 ve 72 saatlerdeki transfeksiyon sonuçlarında doğrusal artış görülmüştür. Dolayısıyla pSEAP2 aktivite sonuçları, Soas-2 hücrelerinde kalsiyum-fosfat tekniği ile geçici transfeksiyonun gerçekleştiğini gösteren bir kanıt oluşturmuştur. Daha sonra transfeksiyonun ADAMTS2 geni üzerindeki etkisini belirlemek amacıyla q-PZR gerçekleştirilmiştir.

### **3.5.2 Kalsiyum-Fosfat Tekniği ile Geçici Transfeksiyon**

Model hücre olarak seçilen Saos-2 hücreleri bölüm 2.7’de anlatıldığı gibi hücre kültürü ortamında 37°C % 5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatörde büyütüldü. Yeterli büyüklüğe ulaşan hücreler tripsinizasyon ile yüzeyden kaldırıldı ve bölüm 2.8.1’deki gibi hücre sayımı gerçekleştirildi. Hücre sayısına göre bir kontrol grubu bir de transfeksiyon grubu olmak üzere 6’lık plakaya 5 ml medyum içerisine 2.000.000 hücre ekildi ve bir gece yüzeye tutunmaları için bekletildi. Ertesi gün hücreler bölüm 2.8.2’deki gibi koşullar uygulanarak geçici transfeksiyon gerçekleştirildi ve transfeksiyon etkisinin gözlenmesi için kontrol gruplarında ve transfeksiyon gruplarında 72 saatler kullanıldı. 72 saat sonunda hücreler tripsinizasyon ile kaldırılarak santrifüjde çöktürüldü ve hücre pelletleri haline getirildi. Daha sonra pelletlerden bölüm 2.10.1’deki gibi RNA izolasyonu gerçekleştirildi. Kontrol ve transfekte RNA’ların saflık ve miktar tayinleri belirlendi. Bölüm 2.10.4’te olduğu gibi RNA’lardan 1 µg olacak şekilde cDNA sentezi gerçekleştirildi. Sentezlenen cDNA’lar, ADAMTS2 ekspresyon primerleri ve β2M primerleri kullanılarak mRNA seviyelerine q-PZR tekniği ile bakıldı. Elde edilen verilerin istatistiksel analizleri yapıldı (Şekil 3.39).



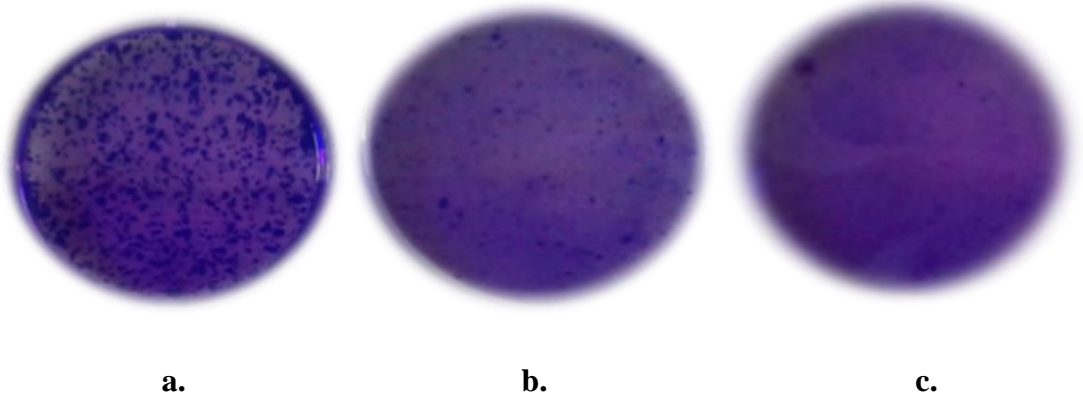


**Şekil 3.39:** Saos-2 hücrelerinde geçici transfeksiyonun ADAMTS2'ye mRNA düzeyinde etkisi.

İstatistiksel sonuçlarda kontrol hücre grubuna göre ADAMTS2 transfekte hücre grubunda 50 kat artış olduğu belirlendi.

### **3.5.3 ADAMTS2 Transfekte Edilen Saos-2 Hücrelerindeki Koloni Formasyonu**

Hücre kültürü ortamında büyütülen Saos-2 hücreleri sayılarak 6 kuyulu plakaların her bir kuyusuna 200 hücre olacak ekildi. 48 saat sonra 6 kuyulu plakalarda iki ayrı deney grubu oluşturuldu. Birinci deney grubu bir kuyu hiçbir şey uygulanmamış kontrol hücre ve bir kuyu ADAMTS2 geni içeren hücre bulunurken ikinci deney grubunda ise bir kuyu hiçbirşey uygulanmamış kontrol ve bir kuyu hipoksik koşul oluşturulmuş transfekte ADAMTS2 içeren hücre bulunmaktadır. ADAMTS2'nin transfeksiyonu için 10 µg ADAMTS2 DNA'sı kullanılarak kalsiyum-fosfat tekniği ile ADAMTS2 transfeksiyon grupları oluşturuldu. 10 gün boyunca deney gruplarının ortamı iki günde bir taze medyum ile değiştirildi ve 10. günün sonunda deney gruplarının medyumları uzaklaştırıldı, hücreler soğuk methanol ile 10 dakika boyunca muamele edilerek fiksasyonu sağlandı. Daha sonra hücreleri görüntüleyebilmek için kristal viyole ile 15 dakika muamele edildi. Kristal viyole ile boyanan kontrol ve deney gruplarının görüntüleri karşılaştırılarak değerlendirildi.



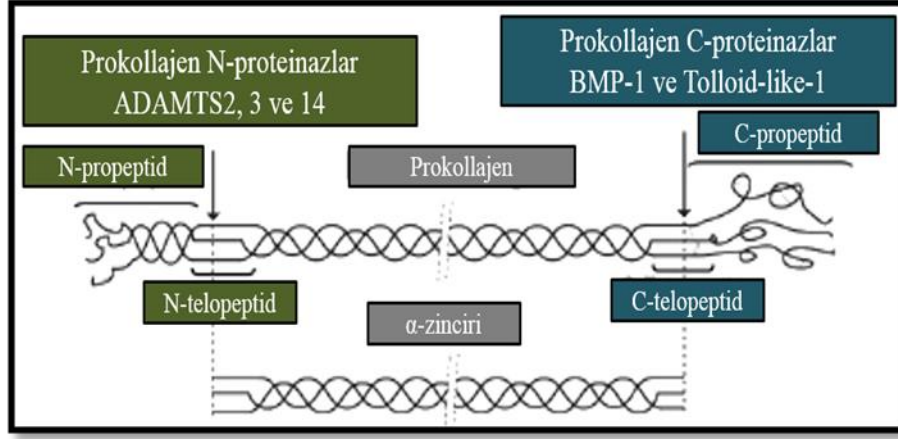
**Şekil 3.40:** Saos-2 hücrelerinde koloni oluşumu a. Kontrol grup, b. ADAMTS2 transfekte normoksiya, c. ADAMTS2 transfekte hipoksiya

Şekil 3.40 incelendiğinde transfekte normoksiya (ADAMTS2 ektopik üretilen normal koşullar) grubu ile transfekte hipoksiya grubu (ADAMTS2 ektopik üretilen hipoksik koşullar) karşılaştırıldığında koloni formasyonunun azaldığı tespit edilmiştir.

## 4. SONUÇ VE ÖNERİLER

Estrasellüler matriks, doku ve hücreleri hem bağlayıcı hem de destekleyici bir iskelet oluşturur. Ayrıca, bileşenleriyle aktive ettiği hücre-yüzey reseptörleri aracılığıyla dokular ve hücreler arasındaki iletişimi sağlar. ESM'nin temel bileşenlerinden birisi olan kollajen memelilerin vücut ağırlığının % 6'sını oluştururken bütün vücut proteinlerinin yaklaşık % 30'unu oluşturur. Üç polipeptit alt biriminin sarmal yapı oluşturacak şekilde düzenlenmesi kollajenlerin en temel özelliğidir. Polipeptit alt birimi olan  $\alpha$ -zincirleri ortak bir ekseninde kıvrılarak iplikçikleri, iplikçikler de bir araya gelerek kollajen liflerini meydana getirir. Bu iplik ve lifler deride ve tendonda düzenli, kıkırdakta gevşek, akciğerde düzensiz bir ağ yapısına sahiptir. Bunlara ek olarak kemik ve dişlerde fosfat kristalleri şeklinde düzenlenerek hücreler arası maddeye yerleşirler. Dokusal ve hücrel önemi yüksek olan kollajenlerin sentezlenmesi de bir o kadar önem arz etmektedir. Sentez sırasındaki kollajen tiplerinin ya da sentez için gerekli ara ürünlerin oluşmasındaki anomaliler sonucunda çeşitli mutasyonlar ve hastalıklar oluşabilir. Örneğin; marfan sendromu, menke sendromu, çeşitli tipte alport sendromu, fibrozis, knobloch ve pigment dağılım sendromları, bruck sendromu, epidermoliz bulloza, çeşitli distrofi hastalıkları.

Kollajenlerin sentezi sırasında birçok faktör görev alarak kompleks olaylar meydana gelir ve sonuçta muntazam kollajen fibrilleri oluşur. Kollajenler sentezlenirken ilk olarak öncül preprokollajenler meydana gelir ve sonrasında birçok modifikasyon geçirerek olgun kollajenler oluşur. Kollajen oluşumu sırasında meydana gelen önemli modifikasyonlardan propeptitlerin kesilmesi, prokollajen molekülünden N-terminal ve C-terminal bölgelerinin uzaklaştırılmasını sağlayarak tropokollajen molekülünü meydana getirir (Şekil 4.1). C-terminal bölgesini kesen izoenzimler, BMP-1 ve Tolloid-like-1 C-propeptidazlardır. C-propeptidaz izoenzimlerinin hataları sonucu oluşan hastalıklar tam olarak bilinmemektedir. N-terminal bölgesini kesen izoenzimler ise prokollajen N-propeptidazlar olan ADAMTS2, 3 ve 14'tür. N-protepeptidaz izoenzimlerin hataları sonucu birçok hastalık meydana gelir. Örneğin; EDS, dentin hastalıkları, Oİ.



**Şekil 4.1:** Prokollajenin N- ve C-terminal bölgelerinin kesilip çıkartılması.

Literatürde ADAMTS2 ile ilgili yapılan ekspresyon analizlerine bakıldığında insana ait normal dokularda aort, kemik, cilt, tendon, mesane, retina, böbrek, akciğer, barsak, karaciğer, iskelet kasında ve fibroblast hücrelerinde ekspre olduğu bulunmuştur [40]. Epitel karakterli A549 (insan adenokarsinomik alveoler epitel hücresi), Calu-3 (akciğer adenokarsinoması), fibroblast karakterli MRC-5 (insan fetal akciğer fibroblast hücreleri), BT-20 (meme bezi/göğüs karsinoması), WI-38 (insan fibroblast benzeri fetal akciğer hücresi) hücre hatlarında ADAMTS2 ifadesi gösterilmiştir. Göz retinal pigment epitel hücre modeli olan ARPE-19 ile yapılan çalışmalarda TNF- $\alpha$  stimülasyonu sonrasında ADAMTS2 mRNA ve protein düzeyinde artış olduğu aydınlatılmıştır. Yapılan bir başka çalışmada şaşırtıcı olarak ADAMTS2'nin glukokortikoidler tarafından uyarılan makrofajlar ve periferik kan monositleri tarafından aşırı ekspre edildiği belirlenmiştir. Bu hücrelerin prokollajen işleme sürecine dahil olma şansı az olmasına rağmen doğal savunma mekanizmasına ait birkaç molekül (C1q, fikolinler, MBL) üçlü sarmal kollajen benzeri domaine sahip olduğu bulunmuştur [41]. Çalışmamız kapsamında ADAMTS2 geninin farklı hücre Saos-2/MG-63 (insan kemik karsinomu), PC-3/DU-145 (insan prostat karsinomu), MCF-7 (insan meme karsinomu), HT29/Colo-205 (insan kolon karsinomu), MKN-45 (insan gastrik karsinomu), Panc-1/Mia PaCa-2 (insan pankreas karsinomu), K-562 (insan kronik myeloid lösemi hücresi) ve Huvec (insan umbilikal ven endotel hücresi) hatlarındaki ekspresyon profillerini belirleyebilmek amacıyla spesifik ADAMTS2 ve insan  $\beta$ 2M primerleri ile PZR gerçekleştirildi. PZR sonuçları agaroz jelde görüntülendi ve jel görüntülerinin

bilgisayar üzerinde İmageJ programı ile densitometrik analizi yapıldı. Analize göre ADAMTS2 en çok MG-63 hücresinde, en az ise Huvec hücresinde ekspre olduğu, Mia PaCa-2 ve K-562 hücrelerinde ise tespit edilebilir düzeyde ekspre olmadığı belirlendi.

N-propeptidaz izoenzimlerinden ADAMTS2, prokollajenlerin işlenmesinin yanı sıra anti-anjiyogenik aktivitesine de sahiptir. Anti-anjiyogenik özellik, çıplak farelerde yapılan bir çalışma ile gösterilmiştir. HEK hücreleri tarafından farelerde tümör oluşturulduktan sonra hücelere rekombinant ADAMTS2 transfekte edilmiş ve ADAMTS2'nin aşırı ifade edildiği zaman tümör oluşumunun hızla azaldığı görülmüştür. Bu sebeple tümör vaskülarizasyonu azalmış ve doğrudan anti-tümör ilişkili olduğu ispat edilmiştir. Ayrıca çalışmanın farklı bir basamağı olarak yapılan in vitro çalışmalarda, rekombinant ADAMTS2'nin hızlı bir şekilde endotel hücrelerin apoptozunu indüklediği görülmüştür [42].

Hipoksik regülasyon hücresel düzeyde çok sayıda genin ifadesini etkileyen bir süreçtir. Hücrelerde meydana gelen hipoksiya ile başta Hif-1 olmak üzere birçok gen aktive olur. Hif-1 hücresel oksijen konsantrasyonundaki değişimleri algılamadan ve yanıt oluşturmadan sorumludur. Tümör hücreleri hipoksiyaya yanıt olarak hücre çoğalması, hücre sağ kalımı ve anjiyogenez gibi moleküler programları uyarır. Hif-1 prostat, akciğer, meme, kolon, over, deri ve mide gibi birçok insan malign kanserlerinde aşırı ekspresyonu immunohistokimyasal analizler ile gösterilmiştir [43]. Bu doğrultuda ADAMTS2'nin kanserle ilişkisi ve anti-angiogenik özelliği dikkate alınarak ifade olduğu tespit edilen farklı kanser hücre hatlarında hipoksiya çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Hipoksiya için  $CoCl_2$  kullanılarak kimyasal hipoksiya modeli oluşturulmuş ve böylece Hif-1  $\alpha$ 'nın farklı kanser hücrelerindeki ADAMTS2 etkisi araştırılmıştır. Hipoksiya çalışmaları için hücre kültürü ortamında birçok kanser hücre hattında hipoksik koşul oluşturmak için 24, 48 ve 72 saat hipoksiya gruplarına 150  $\mu M$   $CoCl_2$  uygulanırken 24, 48 ve 72 saat normoksiya gruplarına hiçbir şey uygulanmamıştır. Hipoksiya çalışmaları mRNA seviyesinde incelenmiştir. Çalışmalar neticesinde DU-145, PC-3, HT-29, MCF-7 ve Saos-2 hücre hatlarında mRNA düzeyinde ADAMTS2 hipoksiyaya cevabı vermiştir. Ancak en yüksek hipoksik cevap Saos-2 ve MCF-7 hücrelerinde gözlenmiştir.

Literatür incelemeleri osteoblast hücrelerde (HOB) ve osteosarkoma hücrelerinde (MG-63 ve Saos-2) kollajen miktarlarının karakterize edildiğini göstermiştir. İncelemelerde tip I kollajen HOB ve Saos-2 hücrelerinde % 95'ten fazla, MG-63 hücrelerinde % 50-95 arasında bulunmakta; tip II kollajen HOB ve Saos-2 % 5'in altında, MG-63 hücrelerinde % 5-50 arasında bulunmakta; tip III kollajen ise HOB ve MG-63 hücrelerinde % 95'ten fazla, Saos-2 hücrelerinde % 5-50 arasında bulunmaktadır [44]. Bizim çalışmalarımızda da model olarak seçilen Saos-2 hücrelerinde kollajen tip I, II ve III'ün hipoksiyadaki etkisi araştırılmıştır. Bunun için hücre kültürü ortamında 24, 48 ve 72 saat hipoksiya ve normoksiya grupları oluşturulmuş ve kollajen tip I, II ve III'ün cevabı araştırılmıştır. Araştırmalar sonucu elde ettiğimiz verilere göre hipoksik koşullarda tip I ve II kollajenlerin ifadesi artarken, tip III kollajenin ise ifadesinin azaldığı tespit edilmiştir. Çalışmalar doğrultusunda hipoksik koşullarda ADAMTS2'nin ve kollajen tiplerinin mRNA seviyesindeki ekspresyonları belirlenmiştir. Bundan sonraki çalışmalarda aynı etkinin protein seviyesinde olup olmadığı teyit edilecektir.

ADAMTS2'nin ökaryotik hücrelerde ektopik ifadesinin kollajen biyosentezinde yaratacağı değişikliğin tespiti ve Saos-2 hücrelerinde koloni oluşumunun gözlenebilmesi için ADAMTS2 geni klonlanmıştır. Klonlama basamağı için öncelikle ADAMTS2'nin çoğaltılması amacıyla *Taq* polimeraz enzimi kullanılarak ve çeşitli optimizasyonlar gerçekleştirilerek PZR yapıldı. Birçok PZR denemesinden sonra ADAMTS2'nin çoğaltılması sağlandı. Çoğaltılan ADAMTS2'nin pGEMT-Easy vektörüne ligasyonu gerçekleştirildi ve kompetant hücrelere transformasyonu yapıldı. Elde edilen transformant ürünlerden saf plazmitler elde edildi ve plazmitlerin ADAMTS2 içerip içermediğinin kontrolü için ve nükleotit dizilerinin kontrolü için dizilemeye gönderildi. pGEMT-Easy vektörüne klonlandığı belirlenen ADAMTS2'nin ökaryotik vektör olan pcDNA 3.1 V5 His A, B, C vektör sistemi içerisinde His A vektörüne ligasyonu gerçekleştirilmek üzere alt klonlama basamağı uygulandı. His A vektörüne alt klonlama için ADAMTS2 geni pGEMT-Easy vektöründen çıkartıldı. His A vektörü ADAMTS2 genini almaya müsait hale getirilmek üzere vektörün klonlama bölgesinin uçları kesildi. His A vektörünün uçlarının birleşmemesi ya da yanlış katlanmalar yapmaması için fosfat grupları uzaklaştırıldı. En son olarak ADAMTS2 geninin His A vektörüne ligasyonu gerçekleştirildi. Ligasyon ürünlerinin kompetant hücrelere transformasyonu

gerçekleştirildi ve transformant ürünlerden saf plazmitler elde edildi. His A vektörüne klonlamanın gerçekleştiğini ispat edebilmek amacıyla dizilemeye gönderildi ve dizi analizleri ile ökaryotik vektör olan His A'ya doğru oryantasyonda klonlandığı belirlendi.

Klonlamadan sonra ökaryotik hücrelerde rekombinant ADAMTS2'nin ifadesinin belirlenmesi için model hücre olan Saos-2 hücrelerine geçici transfeksiyon gerçekleştirildi. Transfeksiyon mRNA düzeyinde q-PZR sonuçlarına göre değerlendirildi ve ADAMTS2'nin kontrol grubuna göre transfekte edildiği gruplarında 50 kat artış olduğu görüldü. Kanser hücrelerinde ADAMTS2'nin koloni formasyonunun belirlenmesi için rekombinant ADAMTS2 Saos-2 hücrelerine transfekte edildi ve kontrol gruplarına göre transfekte hücrelerin koloni oluşumu belirlendi. Transfekte normoksiya (ADAMTS2 ektopik üretilen normal koşullar) grubu ile transfekte hipoksiya grubu (ADAMTS2 ektopik üretilen hipoksik koşullar) karşılaştırıldığında koloni formasyonunun azaldığı tespit edildi.

Sonraki çalışmalarda genin hipoksik koşullara verdiği cevabın tespiti mRNA seviyesinde belirlendiğinden aynı etkinin bu kez ektopik olarak bol miktarda ifadesi gerçekleştirilen Saos-2 hücrelerinde yine hipoksik koşul oluşturularak artışın daha da artıp artmayacağı kontrol edilebilir. Ektopik ifade kalıcı hale getirildikten sonra koloni formasyon dışında hücresel düzeyde yaptığı etkilerin tespiti için hücrelerde çizme yöntemi uygulanarak oluşturulan boşluğu doldurma kapasitesi de test edilebilir. Ayrıca moleküler düzeyde ektopik ifadenin hücreleri götürdüğü yollar da(örneğin, apoptotik ya da metastatik yollar) araştırılabilir. Böylece tüm çalışmaların ve bizim elde ettiğimiz verilerle birlikte bu genin regülasyonu hakkında daha ayrıntılı mekanizmalar ortaya çıkartılabilir.

Sonuç olarak bu tez çalışması kapsamında ilk kez ADAMTS2 geninin hipoksik regülasyonu çalışılmış ve farklı hücre hatları model olarak kullanılarak hipoksik koşullardaki değişimi tespit edilmiştir. Ayrıca genin klonlanması ve ektopik ifadenin kemik karsinomundaki durumu da ilk kez incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar bundan sonra tarafımızdan yapılacak çalışmalara ve diğer bilim insanlarına bu genin hücresel işlemlerde üstlendiği rolü daha iyi anlayabilmek için yol gösterici olacaktır.

## 5. KAYNAKLAR

- [1] Brodsky, B. and Persikov, A. V., “Molecular structure of the collagen triple helix”, *Adv Protein Chem*, 70: 301-39, (2005).
- [2] Khun, K., Mayne, R. and Burgeson, R., “Structure and Function of Collagen Types”, *Academic Pres, FASEB J. S:2814-2*, (1987).
- [3] Robert, P., “Mecham Editor The Extracellular Matrix”, *An Overview Springer-Verlag Berlin Heidelberg*, (2011).
- [4] Lodish, H., Berk, A., Kalsner, C.A., Krieger, M., Scott, M.P., Bretscher, A., Ploegh, H. and Matsudaira P., “Moleküler hücre biyolojisi”, *Palme yayıncılık, W.H. Freeman and company, New York*, (2007).
- [5] Persikov, A.V. and. Brodsky, B., “Unstable molecules form stable tissues”, *Proc. Nat. Acad. Sci., Piscataway, NJ 08854*, (2002).
- [6] Rocks, N., Paulissen, G., El Hour, M., Quesada, F., Crahay, C., Gueders, M., Foidart, “ADAM-8, a metalloproteinase, drives acute allergen induced airway inflammation”, (2011).
- [7] Chou, C.W. and Chen, C.C., “HDAC inhibition upregulates the expression of angiostatic ADAMTS1”, *FEBS Letters*, 582, 4059–4065, (2008).
- [8] Kuno, K., Kanada, N., Nakashima, E., Fujiki, F., Ichimura, F. and Matsushima, K., “Molecular cloning af a gene encoding a new type of metalloproteinase-disintegrin family protein with thrombospondin motifs as an inflammation associated gene”, *The Journal of Biological Chemistry*, 272, 1, 556, (1997).
- [9] Sunay, F.B., Turkoglu, S.A. and Kockar, F., “ADAMTS Ailesi ve Anti-Anjiyogenetik ADAMTS1”, *Balıkesir Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Balıkesir*, (2011).



- [10] Kaushal, G.P., Shah, S.V., “The new kids on the block: ADAMTSs, potentially multifunctional metalloproteinases of the ADAM family”, *The Journal of Clinical Investigation*, 105, 10, 1335, (2000).
- [11] Jones, G.C. and Riley, G.P., “ADAMTS proteinases: a multi-domain, multi-functional family with roles in extracellular matrix turnover and arthritis”, *Arthritis Research and Therapy*, 7, 4, 160, (2005).
- [12] Colige, A., Vandenberghe, I., Thiry, M., Lambert, C.A., Van Beeumen, J. and Li S.W. et al., “Cloning and characterization of ADAMTS-14, a novel ADAMTS displaying high homology with ADAMTS-2 and ADAMTS-3”, *J Biol Chem*, 277:5756-66, (2002).
- [13] El Khoury, L., Posthumus, M., Collins, M., Handley, C.J., Cook, J. and Raleigh, S.M., “Polymorphic variation within the ADAMTS2, ADAMTS14, ADAMTS5, ADAM12 and TIMP2 genes and the risk of Achilles tendon pathology”, a genetic association study, *J Sci Med Sport.*, 16:493-8, (2013).
- [14] Kuno, K., Kanada, N., Nakashima, E., Fujiki, F., Ichimura, F. and Matsushima, K., “Molecular cloning of a gene encoding a new type of metalloproteinase-disintegrin family protein with thrombospondin motifs as an inflammation associated gene”, *J Biol Chem*, 272(1), 556-62, (1997).
- [15] Nagase, H. and Kashiwagi, M., “Aggrecanases and cartilage matrix degradation”, *Arthritis Res Ther*, 5(2), 94-103, (2003).
- [16] Akyol, S., Demircan, K., ve Armutçu, F., “Artritten Kansere Çok Fonksiyonlu Bir Gen Ailesi: Trombospondin Motifli Disintegrin Benzeri Matriks Metalloproteazlar”, DOI: 10.4328/JCAM.1207, (2012).
- [17] Somerville, R.P., Oblander, S.A. and Apte, S.S., “Matrix metalloproteinases: old dogs with new tricks”, *Genome Biol*, 4(6):216, (2003).
- [18] Gomis-Ruth, F.X., “Catalytic domain architecture of metzincin metalloproteases”, *J Biol Chem*, 284:15353–7, (2009).

- [19] Apte, S.S., “A disintegrin-like and metalloprotease (reprolysin-type) with thrombospondin type 1 motif (ADAMTS) superfamily: functions and mechanisms”, *J Biol Chem*, 284(46):31493-7, (2009).
- [20] Baenziger, N.L., Brodie, G.N. and Majerus, P.W., “A thrombin-sensitive protein of human platelet membrane”, *Proc Natl Acad Sci USA*, 68(1):240-3, (1971).
- [21] Tortorella, M.D., Malfait, F., Barve, R.A., Shieh, H.S. and Malfait, A.M., “A review of the ADAMTS family pharmaceutical targets of the future”, *Curr Pharm Des*, 15(20):2359-74, (2009).
- [22] Jones, G.C. and Riley, G.P., “ADAMTS proteinases: a multi-domain, multi-functional family with roles in extracellular matrix turnover and arthritis”. *Arthritis Res Ther*, 7(4):160-9, (2005).
- [23] Greenspan, D. and Wang, W.M., “Overview of ADAMTS Proteinases and ADAMTS 2”, (Hooper, N., Lendeckel, U.), *The ADAM Family of Proteases*, 4, Springer US, 261-282, (2005).
- [24] Alper M., “İnsan ADAMTS2 Geninin Transkripsiyonel Regülasyonu”, Doktora Tezi, Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Balıkesir, (2013).
- [25] Richard, K., Ines, D., Grant, N.W. and Dylan, R.E., “The ADAMTS (A Disintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin motifs) family”, (2015).
- [26] Cömertoğlu, İ., Sarıkaya, E., Demirel, M., Akyol, S. ve Demircan, K., “Role of ADAMTS Gene Family in Obstetrics and Gynecology”, *Derleme*, (2014).
- [27] Martin, E. and Shapiro, J.R., “Osteogenesis imperfecta: epidemiology and pathysiology”, *Curr Osteoporos Rep*, 5, s:91-97, (2007).
- [28] Bell, R.B. and White, R.P., “Osteogenesis imperfecta and orthognathic surgery: case report with long- term follow-up”, *Int J Adult Orthodon Orthognath Surg*, 15: 171-178, (2000).

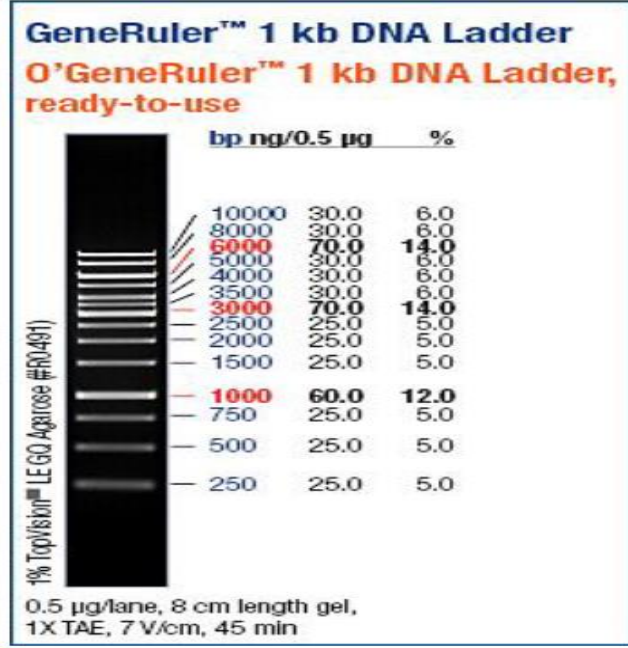
- [29] Bonaventure, J., Stanescu, R., Stanescu, V., Allain, J.C., Muriel, M.P. and Ginisty, D. et al., "Type II collagen defect in two sibs with the Goldblatt syndrome, a chondrodysplasia with dentinogenesis imperfecta, and joint laxity", *Am J Med Genet*, 44,s:738-53, (1992).
- [30] Kantaputra, P.N., "Appatently new osteodysplastic and primordial short stature with severe microdontia, opalescent tetth, and rootless molars in two", *Am J Med Genet*, 111,s:420-8, (2002).
- [31] Murayama, T., Iwatsubo, R., Akiyama, S., Amano, A. and Morisaki, I., "Familial hypophosphatemic vitamin D resistant rickets: dental findings and histologic study of teeth", *Oral Surg Oral Med Pathol Oral Radiol Endod*, 90, s:310-6, (2000).
- [32] Chefetz, I., Heller, R., Galli Galli-Tsinopoulou, A., Richard, G., Wollnik, B. and Indelman, M. et al., "A novel homozygous missense mutation in FGF23 causes Familial Tumoral Calcinosis associated with disseminated visceral calcification", *Hunt Genet*, 118(2),s:261-6, (2005)
- [33] Forestier, I.B., Berdal, A., Vinckier, F., Ravel, T., Fryns, J.P. and Verloes, A., "The genetic basis of inherited anomalies of teeth", Part 2: Syndromes with significant dental involvement, *Eur J Hum Genet*, 51,s:383-408, (2008).
- [34] Malagelada, C., Xifro, X., Minano, A., Sabria, J. and Alvarez, J.A., "Contribution of caspase-mediated apoptosis to the cell death caused by oxygen-glucose deprivation in cortical cell cultures", *Neurobiol Dis* 20:27-37, (2005).
- [35] Ouyang, Y.B., Xu, L. and Giffard, R.G., "Geldanamycin treatment reduces delayed CA I damage in mouse hippocampal organotypic cultures subjected to oxygen glucose deprivation", *Neurosci Lett* 380:229-233, (2005).
- [36] Semenza, G.L., "Surviving ischemia: adaptive responses mediated by hypoxia-inducible factor 1", *J Clin Invest*, 106:809- 812, (2000).
- [37] Arslan, N., "Resveratrolün Hipoksi- Reoksijenasyon İle İndüklenen In Vitro Endotel Hücresi Hasarına Etkisinin ve Nrf2'nin Olası Rolünün Araştırılması" doktora tezi, Dokuz Eylül Üniversitesi, DEU.HSI.PhD-2005970002, (2012).

- [38] Ermiş, E., “Normoksik Ve Hipoksik Koşullarda Kadmiyum Uygulamasının İnsan Hepatosit Hücre Dizisindeki Etkisinin Hipoksiya İndükleyici Faktör- 1 Alfa Vemidkin İle İlişkisi”, Y.lisans tezi, Ankara Üniversitesi (2011).
- [39] Maxwell, P.H., Pugh, C.W. and Ratcliffe, P.J., “Activation of the HIF pathway in cancer”, *Curr Opin Genet Dev*, 11:293-299, (2001).
- [40] Porter, S., Clark, I.M., Kevorkian, L., Edwards, D.R., “The ADAMTS metalloproteinases”, *Biochem J*, 386 (Pt 1), 15-27, (2005).
- [41] Hofer, T.P., Frankenberger, M., Mages, J., Lang, R., Meyer, P. and Hoffmann, R. et al., “Tissue-specific induction of ADAMTS2 in monocytes and macrophages by glucocorticoids”, *J Mol Med (Berl)*, 86:323–32, (2008).
- [42] Dubail, J., Kesteloot, F., Deroanne, C., Motte, P., Lambert, V., Rakic, J. M., Lapiere, C., Nusgens, B. and Colige, A., “ADAMTS-2 functions as anti-angiogenic and anti-tumoral molecule independently of its catalytic activity”, *Cell Mol Life Sci*, 67 (24), 4213-32, (2010).
- [43] Brusselmans, K., Bono, F., Maxwell, P., Dor Y, Dewerchin, M., Collen, D., Herbert, J.M. and Carmeliet, P., “Hypoxia-inducible factor 2- $\alpha$  (HIF-2 $\alpha$ ) is involved in the apoptotic response to hypoglycemia but not to hypoxia”, *J Biol Chem*, 276: 39192-39196, (2001).
- [44] Pautke, C., Schieker, M., Tischer T., Kolk, A., Neth, P., Mutschler, W. and Milz, S., “Characterization of Osteosarcoma Cell Lines MG-63, Saos-2 and U-2 OS in Comparison to Human Osteoblasts”, *Department of Oral and Maxillofacial Surgery*, 24: 3743-3748, (2004).

# **EKLER**

## 6. EKLER

### EK-A DNA Büyüklük Belirteci



Şekil A.1: DNA büyüklük belirteci (1 kb)

## EK-B ADAMTS2 cDNA Bilgileri

### **Homo sapiens ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif, 2 (ADAMTS2), transcript variant 2, mRNA**

LOCUS NM\_021599 2064 bp mRNA linear PRI 25-AUG-2013

DEFINITION Homo sapiens ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif, 2 (ADAMTS2), transcript variant 2, mRNA.

ACCESSION NM\_021599

VERSION NM\_021599.2 GI:301129193

KEYWORDS RefSeq.

SOURCE Homo sapiens (human)

ORGANISM [Homo sapiens](#)  
Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata;  
Euteleostomi;  
Mammalia; Eutheria; Euarchontoglires; Primates; Haplorrhini;  
Catarrhini; Hominidae; Homo.

REFERENCE 1 (bases 1 to 2064)

AUTHORS Arning,A., Hiersche,M., Witten,A., Kurlemann,G., Kurnik,K., Manner,D., Stoll,M. and Nowak-Gottl,U.

TITLE A genome-wide association study identifies a gene network of ADAMTS genes in the predisposition to pediatric stroke

JOURNAL Blood 120 (26), 5231-5236 (2012)

PUBMED [22990015](#)

REFERENCE 2 (bases 1 to 2064)

AUTHORS Lee,C.W., Hwang,I., Park,C.S., Lee,H., Park,D.W., Kang,S.J., Lee,S.W., Kim,Y.H., Park,S.W. and Park,S.J.

TITLE Expression of ADAMTS-2, -3, -13, and -14 in culprit coronary lesions in patients with acute myocardial infarction or stable angina

JOURNAL J. Thromb. Thrombolysis 33 (4), 362-370 (2012)

PUBMED [22205175](#)

REMARK GeneRIF: ADAMTS-2, -3, and -13 expression, but not that of ADAMTS-14, are increased in plaques causing AMI compared those associated with stable angina.

REFERENCE 3 (bases 1 to 2064)

AUTHORS Fox CS, Liu Y, White CC, Feitosa M, Smith AV, Heard-Costa N, Lohman K, Johnson AD, Foster MC, Greenawalt DM, Griffin P, Ding J, Newman AB, Tykavsky F, Miljkovic I, Kritchevsky SB, Launer L, Garcia M, Eiriksdottir G, Carr JJ, Gudnason V, Harris TB, Cupples LA and Borecki IB.

CONSORTIUM GIANT Consortium; MAGIC Consortium; GLGC Consortium

TITLE Genome-wide association for abdominal subcutaneous and visceral adipose reveals a novel locus for visceral fat in women

JOURNAL PLoS Genet. 8 (5), E1002695 (2012)

PUBMED [22589738](#)

REFERENCE 4 (bases 1 to 2064)

AUTHORS Dubail,J., Kesteloot,F., Deroanne,C., Motte,P., Lambert,V., Rakic,J.M., Lapiere,C., Nusgens,B. and Colige,A.

TITLE ADAMTS-2 functions as anti-angiogenic and anti-tumoral molecule independently of its catalytic activity

JOURNAL Cell. Mol. Life Sci. 67 (24), 4213-4232 (2010)

PUBMED [20574651](#)

REMARK GeneRIF: Data show that ADAMTS-2 is able to reduce proliferation of endothelial cells, and to induce their retraction and detachment from the substrate resulting in apoptosis.

REFERENCE 5 (bases 1 to 2064)

AUTHORS Colige,A., Ruggiero,F., Vandenberghe,I., Dubail,J., Kesteloot,F., Van Beeumen,J., Beschin,A., Brys,L., Lapiere,C.M. and Nusgens,B.

TITLE Domains and maturation processes that regulate the activity of

ADAMTS-2, a metalloproteinase cleaving the aminopropeptide of fibrillar procollagens types I-III and V  
 JOURNAL J. Biol. Chem. 280 (41), 34397-34408 (2005)  
 PUBMED [16046392](#)  
 REMARK GeneRIF: Determination of the processing, activity and cleavage specificity of the bovine ADAMTS2 protein.  
 REFERENCE 6 (bases 1 to 2064)  
 AUTHORS Tang,B.L.  
 TITLE ADAMTS: a novel family of extracellular matrix proteases  
 JOURNAL Int. J. Biochem. Cell Biol. 33 (1), 33-44 (2001)  
 PUBMED [11167130](#)  
 REMARK Review article  
 REFERENCE 7 (bases 1 to 2064)  
 AUTHORS Hurskainen,T.L., Hirohata,S., Seldin,M.F. and Apte,S.S.  
 TITLE ADAM-TS5, ADAM-TS6, and ADAM-TS7, novel members of a new family of zinc metalloproteinases. General features and genomic distribution of the ADAM-TS family  
 JOURNAL J. Biol. Chem. 274 (36), 25555-25563 (1999)  
 PUBMED [10464288](#)  
 REFERENCE 8 (bases 1 to 2064)  
 AUTHORS Colige,A., Sieron,A.L., Li,S.W., Schwarze,U., Petty,E., Wertelecki,W., Wilcox,W., Krakow,D., Cohn,D.H., Reardon,W., Byers,P.H., Lapiere,C.M., Prockop,D.J. and Nusgens,B.V.  
 TITLE Human Ehlers-Danlos syndrome type VII C and bovine dermatosparaxis are caused by mutations in the procollagen I N-proteinase gene  
 JOURNAL Am. J. Hum. Genet. 65 (2), 308-317 (1999)  
 PUBMED [10417273](#)  
 REFERENCE 9 (bases 1 to 2064)  
 AUTHORS Tang,B.L. and Hong,W.  
 TITLE ADAMTS: a novel family of proteases with an ADAM protease domain and thrombospondin 1 repeats  
 JOURNAL FEBS Lett. 445 (2-3), 223-225 (1999)  
 PUBMED [10094461](#)  
 REMARK Review article  
 REFERENCE 10 (bases 1 to 2064)  
 AUTHORS Reardon,W., Winter,R.M., Smith,L.T., Lake,B.D., Rossiter,M. and Baraitser,M.  
 TITLE The natural history of human dermatosparaxis (Ehlers-Danlos syndrome type VIIC)  
 JOURNAL Clin. Dysmorphol. 4 (1), 1-11 (1995)  
 PUBMED [7735500](#)  
 REMARK Review article  
 COMMENT REVIEWED [REFSEQ](#): This record has been curated by NCBI staff. The reference sequence was derived from [AK308213.1](#), [AC109479.3](#), [AC010216.8](#) and [BU629258.1](#).  
 On Jul 23, 2010 this sequence version replaced gi:[11038658](#).

Summary: This gene encodes a member of the ADAMTS (a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs) protein family.

Members of the family share several distinct protein modules, including a propeptide region, a metalloproteinase domain, a disintegrin-like domain, and a thrombospondin type 1 (TS) motif. Individual members of this family differ in the number of C-terminal TS motifs, and some have unique C-terminal domains.

The enzyme encoded by this gene excises the N-propeptide of type I, type II and type V procollagens. Mutations in this gene cause Ehlers-Danlos syndrome type VIIC, a recessively inherited connective-tissue disorder. Alternative splicing results in multiple transcript variants. [provided by RefSeq, Jul 2010].

Transcript Variant: This variant (2) lacks several exons and includes an alternate exon in the 3' coding region and 3' UTR,



and  
lacks  
TS

compared to variant 1. It encodes isoform 2, which is shorter  
has a distinct C-terminus, compared to isoform 1. Isoform 2  
C-terminal TS motifs, whereas isoform 1 contains four C-terminal  
motifs.

Gene

Publication Note: This RefSeq record includes a subset of the  
publications that are available for this gene. Please see the  
record to access additional publications.

##Evidence-Data-START##  
Transcript exon combination :: AK308213.1 [ECO:0000332]  
RNAseq introns :: mixed/partial sample support  
ERS025081, ERS025082

[ECO:0000350]

##Evidence-Data-END##  
COMPLETENESS: complete on the 3' end.

PRIMARY	REFSEQ_SPAN	PRIMARY_IDENTIFIER	PRIMARY_SPAN	COMP
	1-172	AK308213.1	1-172	
	173-328	AK308213.1	176-331	
	329-423	AC109479.3	73925-74019	
	424-1641	AK308213.1	427-1644	
	1642-1642	AC010216.8	32996-32996	
	1643-2023	AK308213.1	1646-2026	
	2024-2044	AK308213.1	2028-2048	
	2045-2064	BU629258.1	1-20	c

FEATURES

source Location/Qualifiers  
1..2064  
/organism="Homo sapiens"  
/mol\_type="mRNA"  
/db\_xref="taxon:9606"  
/chromosome="5"  
/map="5qter"

[gene](#) 1..2064  
/gene="ADAMTS2"  
/gene\_synonym="ADAM-TS2; ADAMTS-2; ADAMTS-3; NPI; PC I-

NP;  
PCI-NP; PCINP; PCPNI; PNPI"  
/note="ADAM metallopeptidase with thrombospondin type 1  
motif, 2"  
/db\_xref="GeneID:9509"  
/db\_xref="HGNC:218"  
/db\_xref="HPRD:05173"  
/db\_xref="MIM:604539"

[exon](#) 1..241  
/gene="ADAMTS2"  
/gene\_synonym="ADAM-TS2; ADAMTS-2; ADAMTS-3; NPI; PC I-

NP;  
PCI-NP; PCINP; PCPNI; PNPI"  
/inference="alignment:Splign:1.39.8"  
103..1803  
/gene="ADAMTS2"  
/gene\_synonym="ADAM-TS2; ADAMTS-2; ADAMTS-3; NPI; PC I-

[CDS](#)

NP;  
PCI-NP; PCINP; PCPNI; PNPI"  
/EC\_number="3.4.24.14"  
/note="isoform 2 preproprotein is encoded by transcript  
variant 2; procollagen I N-proteinase; a disintegrin-  
like  
and metalloprotease (reprolysin type) with  
thrombospondin  
type 1 motif, 2; a disintegrin and metalloproteinase  
with  
thrombospondin motifs 2; procollagen N-endopeptidase;  
procollagen I/II amino propeptide-processing enzyme"

```

/codon_start=1
/product="A disintegrin and metalloproteinase with
thrombospondin motifs 2 isoform 2 preproprotein"
/protein_id="NP_067610.1"
/db_xref="GI:11038659"
/db_xref="CCDS:CCDS34311.1"
/db_xref="GeneID:9509"
/db_xref="HGNC:218"
/db_xref="HPRD:05173"
/db_xref="MIM:604539"

/translation="MDPPAGAARRLLCPALLLLLLLLPPPLPPPPPPANARLAAAAD
PPGGPLGHGAERILAVPVRTDAQGRLVSHVVSAA TSRAGVRARRAAPVRTPSFPGGNE
EEPGSHLFYNVTVFGRDLHLRLRPNARLVAPGATMEWQGEKGTTRVEPLLGSCLYVGD
VAGLAEASSVALSNCDGLAGLIRMEEEFFIEPLEKGLAAQEAQGRVHVYRRPPTS
PPLGGPQALDTGASLDSLDSLSRALGVLEE HANSSRRRARRHAADDDYNIEVLLGVDD
SVVQFHGKEHVQKYLTL MNIVNEIYHDESLGAHINVVLVRIILLSYGKSM SLIEIGN
PSQSL ENVCRWAYLQQKPD TGHDEYHDHAI FLTRQDFG PSMQGYAPVTGMCHPVRSC
TLNHEDGFSSAFVVAHETGHV LGMEDGQGNRCGDEVRLG SIMAPLVQAAFHRFHWSR
CSQQELSRYLHSYDCLLDDPFAHDWPALPQLPGLHYSMNEQCRDFDFGLGYMMCTAFRT
FDPCQLWC SHPDNPYFCKTKKGPPLDGTMCAPGKFRPGAVAHACYPSTLGGQGRWIA
"
  sig_peptide      103..189
                   /gene="ADAMTS2"
                   /gene_synonym="ADAM-TS2; ADAMTS-2; ADAMTS-3; NPI; PC I-
NP;
                   PCI-NP; PCINP; PCPNI; PNPI"
                   /inference="COORDINATES: ab initio
prediction:SignalP:4.0"
  proprotein      190..1800
                   /gene="ADAMTS2"
                   /gene_synonym="ADAM-TS2; ADAMTS-2; ADAMTS-3; NPI; PC I-
NP;
                   PCI-NP; PCINP; PCPNI; PNPI"
                   /product="A disintegrin and metalloproteinase with
thrombospondin motifs 2 isoform 2 proprotein"
  mat_peptide     880..1800
                   /gene="ADAMTS2"
                   /gene_synonym="ADAM-TS2; ADAMTS-2; ADAMTS-3; NPI; PC I-
NP;
                   PCI-NP; PCINP; PCPNI; PNPI"
                   /product="A disintegrin and metalloproteinase with
thrombospondin motifs 2 isoform 2"
                   /note="The cleavage site to produce the mature peptide
is
  exon            242..636
                   inferred from the cow ortholog; PMID:16046392"
                   /gene="ADAMTS2"
                   /gene_synonym="ADAM-TS2; ADAMTS-2; ADAMTS-3; NPI; PC I-
NP;
                   PCI-NP; PCINP; PCPNI; PNPI"
                   /inference="alignment:Splign:1.39.8"
  exon            637..790
                   /gene="ADAMTS2"
                   /gene_synonym="ADAM-TS2; ADAMTS-2; ADAMTS-3; NPI; PC I-
NP;
                   PCI-NP; PCINP; PCPNI; PNPI"
                   /inference="alignment:Splign:1.39.8"
  exon            791..993

```

```

/ gene="ADAMTS2"
/ gene_synonym="ADAM-TS2; ADAMTS-2; ADAMTS-3; NPI; PC I-
NP;
PCI-NP; PCINP; PCPNI; PNPI"
/ inference="alignment:Splign:1.39.8"
  exon 994..1077
/ gene="ADAMTS2"
/ gene_synonym="ADAM-TS2; ADAMTS-2; ADAMTS-3; NPI; PC I-
NP;
PCI-NP; PCINP; PCPNI; PNPI"
/ inference="alignment:Splign:1.39.8"
  exon 1078..1234
/ gene="ADAMTS2"
/ gene_synonym="ADAM-TS2; ADAMTS-2; ADAMTS-3; NPI; PC I-
NP;
PCI-NP; PCINP; PCPNI; PNPI"
/ inference="alignment:Splign:1.39.8"
  exon 1235..1340
/ gene="ADAMTS2"
/ gene_synonym="ADAM-TS2; ADAMTS-2; ADAMTS-3; NPI; PC I-
NP;
PCI-NP; PCINP; PCPNI; PNPI"
/ inference="alignment:Splign:1.39.8"
  exon 1341..1484
/ gene="ADAMTS2"
/ gene_synonym="ADAM-TS2; ADAMTS-2; ADAMTS-3; NPI; PC I-
NP;
PCI-NP; PCINP; PCPNI; PNPI"
/ inference="alignment:Splign:1.39.8"
  exon 1485..1617
/ gene="ADAMTS2"
/ gene_synonym="ADAM-TS2; ADAMTS-2; ADAMTS-3; NPI; PC I-
NP;
PCI-NP; PCINP; PCPNI; PNPI"
/ inference="alignment:Splign:1.39.8"
  exon 1618..1731
/ gene="ADAMTS2"
/ gene_synonym="ADAM-TS2; ADAMTS-2; ADAMTS-3; NPI; PC I-
NP;
PCI-NP; PCINP; PCPNI; PNPI"
/ inference="alignment:Splign:1.39.8"
  exon 1732..2047
/ gene="ADAMTS2"
/ gene_synonym="ADAM-TS2; ADAMTS-2; ADAMTS-3; NPI; PC I-
NP;
PCI-NP; PCINP; PCPNI; PNPI"
/ inference="alignment:Splign:1.39.8"
  polyA signal 2022..2027
/ gene="ADAMTS2"
/ gene_synonym="ADAM-TS2; ADAMTS-2; ADAMTS-3; NPI; PC I-
NP;
PCI-NP; PCINP; PCPNI; PNPI"
  polyA signal 2028..2033
/ gene="ADAMTS2"
/ gene_synonym="ADAM-TS2; ADAMTS-2; ADAMTS-3; NPI; PC I-
NP;
PCI-NP; PCINP; PCPNI; PNPI"
  polyA site 2047
/ gene="ADAMTS2"
/ gene_synonym="ADAM-TS2; ADAMTS-2; ADAMTS-3; NPI; PC I-
NP;
PCI-NP; PCINP; PCPNI; PNPI"
ORIGIN      1700 BÇ
1 agctgcgggc ggctccagct gccccagat gtgggctggg cggtcgcgg ggaactttcg
61 cgccggctgc gagtgcgggg ccccgctgc agtccggctg ccatggatcc gccggcggga
121 gccgctcgcc gcctgctctg ccccgctgc ctgctgctgc tgctgctgct gccgccgccg
181 ctctgcccgc cgccgccgcc gccgcgaac gccaggctcg ccgccgccgc cgacccccca
241 ggcgggcccc tggggcacgg agcggagcgc atcctggcgg tgcccgtgcg cactgacgcc

```

301 cagggccgct tgggtgtcca cgtggtgtcg gcagctacgt ccagagcagg ggtacgagcc  
361 cgcagggccg ccccgggtccg gaccccgagc ttccccggag gcaacgagga ggagcctggc  
421 agtcacctct tctacaatgt cacggtcttt ggccgagacc tgcacctgcy gctgcyggccc  
481 aacgcccgc tcygtggcgc cggggccact atggagtggc agggcgagaa gggcaccacc  
541 cgcgtggagc ccctgctcgg gagctgtctc tacgtcggag acgtggccgg cctagccgaa  
601 gcctcctctg tggcgctcag caactgcgat gggctggctg gtctgatccg gatggaggag  
661 gaggagtctc tcatcgaacc cttggagaag gggctggcgg cgcaggaggc tgagcaaggc  
721 cgtgtgcatg tgggtgatcg ccggccacce acgtcccctc ctctcggggg gccacaggcc  
781 ctggacacag gggcctccct ggacagcctg gacagcctca gccgcgccct gggcgtccta  
841 gaggagcacg ccaacagctc gaggcggagg gcacgcaggc atgctgcgga cgatgactac  
901 aacatcgagg tcctgctggg cgtggatgac tctgtggtgc agttccacgg gaaggagcac  
961 gtacagaagt acctgctgac actcatgaac attgtcaatg aaatctacca tgacgagtcc  
1021 ttgggtgccc acatcaacgt ggtcctggtg cggatcatcc tctgagcta tggaaagtcc  
1081 atgagcctca tcgagatcgg gaacccctct cagagcctgg agaatgtctg ccgctgggcc  
1141 tacctccagc agaagccaga cacgggccac gatgaatacc acgatcacgc catcttcctc  
1201 acacggcagg actttgggcc ttccggcatg caaggctatg ctctgtcac cggcatgtgc  
1261 catccggtcc gcagctgcac cctgaacatg gaggacggct tctctcagc gttgtggtg  
1321 gcccatgaga ctggccacgt gctggcatg gagcacgacg ggcaggcaa ccgctgtggc  
1381 gacgaggtgc ggctgggcag catcatggcg cccctggtgc aggccgctt ccaccgctt  
1441 cactggtccc gctgcagcca gcaggagctg agccgctacc tgcactccta tgactgctg  
1501 ctggatgacc ccttcgcca cgactggccg gcgctgccc agctccggg actgcactac  
1561 tccatgaacg agcaatgccg ctttgacttc ggcctgggt acatgatgtg cacggcgtt  
1621 cggacccttg acccctgcaa gcagctgtgg tgcagccatc ctgacaaccc ctacttttg  
1681 aagaccaaga aggggcccc cttggacggg actatgtgtg cacctggcaa gttcaggccg  
1741 ggcgcggtgg ctcatgcctg ttatcccagc actttgggag gccaaggtag gtggatcgcc  
1801 tgaggtcaga agttcaagc aagtctggtt aacatggcaa aatcccgtct ctactaaaa  
1861 taaaaaatt agctgggcgc ggtggtgggt gcctgtaatc ccagctactc cggaggctga  
1921 ggcatgaaaa tcgtttgagc ccaggaggcg gaggttgcgg tgagccaaga tcgctgcgt  
1981 gctctccagt ctggatcaca cagcaagacc ctgtctcaaa aaataaaaaa aaaagtgaag  
2041 tgcacaaaa aaaaaaaaaa aaaa

## EK-C ADAMTS2 Restriksiyon Haritasi

**Noncutters:** AatII, AbsI, AccI, AclI, AflIII, AflIII, AgeI, AgsI, AjuI, ApoI, ArsI, AscI, AsuII, AvrII, BarI, BcgI, BciVI, BclI, BfiI, BglII, BplI, BsaBI, BsePI, BsmI, Bsp1407I, BstEII, BtsI, ClaI, DrdI, Eam1105I, Eco47III, Eco57I, **EcoRI**, EcoRV, Fall, HaeIV, HindII, HindIII, HpaI, KpnI, MauBI, MfeI, MluI, NdeI, NheI, NotI, NruI, PacI, PfoI, PmeI, PshAI, PsiI, PI-PspI, PsrI, PvuI, SacI, SacII, Sall, SanDI, SapI, ScaI, PI-SceI, SexAI, SfiI, SgfI, SgrDI, SnaBI, SpeI, SrfI, Sse8387I, SspI, StuI, SwaI, TaqII, TatI, TfiI, TsoI, Tth111I, VspI, XbaI, XcmI, XmnI

Name	Sequence	Site Length	Overhang	Frequency	Cut Positions
<a href="#">BaiI</a>	TGGCCA	6	blunt	1	1234
<a href="#">FspAI</a>	RTGCGCAY	8	blunt	1	189
<a href="#">OliI</a>	CACNNNGTG	6	blunt	1	441
<a href="#">AarI</a>	CACCTGC	7	five_prime	1	373
<a href="#">BamHI</a>	GGATCC	6	five_prime	1	5
<a href="#">BspHI</a>	TCATGA	6	five_prime	1	883
<a href="#">BtgZI</a>	GCGATG	6	five_prime	1	541
<a href="#">Eco3I</a>	GGTCTC	6	five_prime	1	349
<a href="#">EcoNI</a>	CCTNNNNNAGG	6	five_prime	1	1317
<a href="#">Esp3I</a>	CGTCTC	6	five_prime	1	472
<a href="#">NcoI</a>	CCATGG	6	five_prime	1	1
<a href="#">PpuMI</a>	RGGWCCY	7	five_prime	1	809
<a href="#">PspXI</a>	VCTCGAGB	8	five_prime	1	758
<a href="#">SgrAI</a>	CRCCGGYG	8	five_prime	1	11
<a href="#">SmlI</a>	CTYRAG	6	five_prime	1	758
<a href="#">XhoI</a>	CTCGAG	6	five_prime	1	758
<a href="#">XhoII</a>	RGATCY	6	five_prime	1	5
<a href="#">BsrDI</a>	GCAATG	6	three_prime	1	1479
<a href="#">DraIII</a>	CACNNNGTG	6	three_prime	1	224
<a href="#">EciI</a>	GGCGGA	6	three_prime	1	779

Name	Sequence	Site Length	Overhang	Frequency	Cut Positions
<a href="#">FseI</a>	GGCCGGCC	8	three_prime	1	490
<a href="#">MmeI</a>	TCCRAC	6	three_prime	1	455
<a href="#">NmeAIII</a>	GCCGAG	6	three_prime	1	378
<a href="#">PflMI</a>	CCANNNNNTGG	6	three_prime	1	1241
<a href="#">PstI</a>	CTGCAG	6	three_prime	1	1356
<a href="#">TspGWI</a>	ACGGA	5	three_prime	1	172
<a href="#">BtrI</a>	CACGTC	6	blunt	2	482, 652
<a href="#">PmaCI</a>	CACGTG	6	blunt	2	221, 1238
<a href="#">PvuII</a>	CAGCTG	6	blunt	2	1174, 1544
<a href="#">SmaI</a>	CCCGGG	6	blunt	2	401, 1447
<a href="#">ApaLI</a>	GTGCAC	6	five_prime	2	1508, 1618
<a href="#">BbvCI</a>	CCTCAGC	7	five_prime	2	717, 1205
<a href="#">HgaI</a>	GACGC	5	five_prime	2	204, 722
<a href="#">NarI</a>	GGCGCC	6	five_prime	2	396, 1308
<a href="#">PleI</a>	GAGTC	5	five_prime	2	822, 923
<a href="#">RsrII</a>	CGGWCCG	7	five_prime	2	275, 1166
<a href="#">SfaNI</a>	GCATC	5	five_prime	2	178, 1309
<a href="#">AlfI</a>	GCANNNNNTGC	6	three_prime	2	1119, 1153
<a href="#">AloI</a>	GAACNNNNNTCC	7	three_prime	2	549, 581
<a href="#">ApaI</a>	GGGCCC	6	three_prime	2	148, 1597
<a href="#">BaeI</a>	ACNNNNGTAYC	7	three_prime	2	852, 885
<a href="#">BdaI</a>	TGANNNNNNTCA	6	three_prime	2	875, 909
<a href="#">BglI</a>	GCCNNNNGGC	6	three_prime	2	152, 264
<a href="#">CspCI</a>	CAANNNNNGTGG	7	three_prime	2	1256, 1291
<a href="#">Eco57M I</a>	CTGRAG	6	three_prime	2	1029, 1038
<a href="#">GsuI</a>	CTGGAG	6	three_prime	2	1029, 1038
<a href="#">Hin4I</a>	GAYNNNNNVTC	6	three_prime	2	1185, 1217
<a href="#">HphI</a>	GGTGA	5	three_prime	2	315, 1139
<a href="#">PpiI</a>	GAACNNNNNCTC	7	three_prime	2	549, 581

<b>Name</b>	<b>Sequence</b>	<b>Site Length</b>	<b>Overhang</b>	<b>Frequency</b>	<b>Cut Positions</b>
<a href="#">SphI</a>	GCATGC	6	three_prime	2	783, 1130
<a href="#">TspRI</a>	CASTG	5	three_prime	2	197, 1347
<a href="#">BsaAI</a>	YACGTR	6	blunt	3	221, 860, 1238
<a href="#">BsrBI</a>	CCGCTC	6	blunt	3	24, 80, 162
<a href="#">Bpu10I</a>	CCTNAGC	6	five_prime	3	717, 963, 1205
<a href="#">PacI</a>	CCCWGGG	7	five_prime	3	149, 200, 728
<a href="#">Tsp45I</a>	GTSAC	5	five_prime	3	321, 338, 1145
<a href="#">BsrI</a>	ACTGG	5	three_prime	3	1235, 1347, 1428
<a href="#">BstXI</a>	CCANNNNNNTGG	6	three_prime	3	443, 1230, 1673
<a href="#">Hpy99I</a>	CGWCG	5	three_prime	3	477, 1260, 1284
<a href="#">MboII</a>	GAAGA	5	three_prime	3	320, 560, 1085
<a href="#">MslII</a>	CAYNNNNRRTG	6	blunt	4	441, 936, 1152, 1387
<a href="#">NaeI</a>	GCCGGC	6	blunt	4	13, 488, 642, 1429
<a href="#">AcyI</a>	GRCGYC	6	five_prime	4	196, 396, 733, 1308
<a href="#">BsmAI</a>	GTCTC	5	five_prime	4	349, 471, 472, 1221
<a href="#">BspMI</a>	ACCTGC	6	five_prime	4	367, 373, 880, 1387
<a href="#">AlwNI</a>	CAGNNNCTG	6	three_prime	4	523, 680, 1016, 1367
<a href="#">HaeII</a>	RGCGCY	6	three_prime	4	399, 516, 1311, 1434
<a href="#">NspI</a>	RCATGY	6	three_prime	4	630, 783, 1130, 1157

<b>Name</b>	<b>Sequence</b>	<b>Site Length</b>	<b>Overhang</b>	<b>Frequency</b>	<b>Cut Positions</b>
<a href="#">TstI</a>	CACNNNNNTCC	6	three_prime	4	641, 673, 1601, 1633
<a href="#">BccI</a>	CCATC	5	five_prime	5	522, 545, 1098, 1168, 1564
<a href="#">Cfr10I</a>	RCCGGY	6	five_prime	5	11, 486, 640, 1149, 1427
<a href="#">CfrI</a>	YGGCCR	6	five_prime	5	350, 484, 642, 1232, 1425
<a href="#">StyI</a>	CCWWGG	6	five_prime	5	1, 580, 919, 1600, 1682
<a href="#">TspDTI</a>	ATGAA	5	three_prime	5	560, 900, 913, 1087, 1479
<a href="#">AvaI</a>	CYCGRG	6	five_prime	6	284, 399, 456, 663, 758, 1445
<a href="#">BseYI</a>	CCCAGC	6	five_prime	6	815, 1033, 1241, 1292, 1438, 1665
<a href="#">DraII</a>	RGGNCCY	6	five_prime	6	145, 677, 691, 809, 1593, 1594
<a href="#">AvaII</a>	GGWCC	5	five_prime	7	275, 280, 809, 941, 1166, 1345, 1522
<a href="#">FokI</a>	GGATG	5	five_prime	7	156, 563, 837, 942, 1147, 1416, 1543
<a href="#">BseMII</a>	CTCAG	5	three_prime	7	530, 601, 731, 954, 1023, 1219, 1359
<a href="#">BsgI</a>	GTGCAG	6	three_prime	7	345, 858,



Name	Sequence	Site Length	Overhang	Frequency	Cut Positions
					1160, 1338, 1365, 1437, 1571
<a href="#">FauI</a>	CCCGC	5	five_prime	8	8, 50, 110, 135, 267, 393, 447, 1356
<a href="#">BsaXI</a>	ACNNNNNCTCC	6	three_prime	8	549, 579, 641, 671, 1185, 1215, 1368, 1398
<a href="#">BseRI</a>	GAGGAG	6	three_prime	9	321, 324, 494, 570, 573, 576, 649, 756, 1193
<a href="#">BseSI</a>	GKGCMC	6	three_prime	9	148, 157, 184, 435, 773, 929, 1512, 1597, 1622
<a href="#">EcoP15I</a>	CAGCAG	6	five_prime	12	20, 23, 26, 29, 32, 35, 38, 785, 845, 1077, 1370, 1389
<a href="#">SduI</a>	GDGCHC	6	three_prime	14	148, 157, 184, 260, 435, 451, 748, 773, 859, 929, 1255, 1512, 1597, 1622
<a href="#">EcoRII</a>	CCWGG	5	five_prime	15	111, 137, 148, 172, 199, 314, 679, 697, 706, 727, 943, 1015, 1312, 1492, 1622

Name	Sequence	Site Length	Overhang	Frequency	Cut Positions
<a href="#">BbvI</a>	GCAGC	5	five_prime	19	34, 37, 40, 43, 46, 49, 52, 55, 243, 358, 770, 1161, 1183, 1309, 1338, 1366, 1420, 1553, 1564
<a href="#">TseI</a>	GCWGC	5	five_prime	19	47, 50, 53, 56, 59, 62, 65, 68, 231, 371, 783, 1171, 1174, 1297, 1351, 1354, 1433, 1541, 1552
<a href="#">TauI</a>	GCSGC	5	three_prime	24	24, 31, 74, 77, 80, 89, 92, 95, 98, 101, 123, 126, 129, 208, 270, 371, 377, 600, 724, 1033, 1292, 1326, 1375, 1480