

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



**İNSAN *ADAMTS2* GENİNİN TRANSKRİPSİYONEL
REGÜLASYONU**

DOKTORA TEZİ

MELTEM ALPER

BALIKESİR, AĞUSTOS 2013

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



**İNSAN *ADAMTS2* GENİNİN TRANSKRİPSİYONEL
REGÜLASYONU**

DOKTORA TEZİ

MELTEM ALPER

BALIKESİR, AĞUSTOS 2013

KABUL VE ONAY SAYFASI

Meltem ALPER tarafından hazırlanan “**İNSAN ADAMTS2 GENİNİN TRANSKRİPSİYONEL REGÜLASYONU**” adlı tez çalışmasının savunma sınavı 28.08.2013 tarihinde yapılmış olup aşağıda verilen jüri tarafından oy birliği / ~~oy çokluğu~~ ile Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

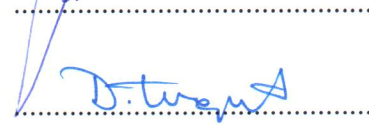
Jüri Üyeleri

İmza

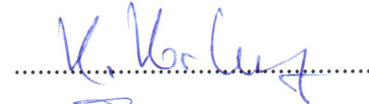
Danışman
Prof. Dr. Feray KÖÇKAR



Üye
Prof. Dr. Dilek T.BALIK



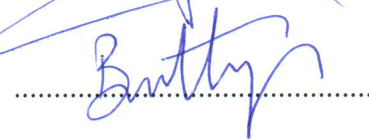
Üye
Prof. Dr. Kemal Sami Korkmaz



Üye
Doç. Dr. Ekrem DÜNDAR



Üye
Yrd. Doç. Dr. Hatice YILDIRIM



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

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Prof. Dr. Hilmi NAMLI



Bu tez çalışması TÜBİTAK tarafından 212T200 no'lu projeye desteklenmiştir.

Bu tez çalışması Balıkesir Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından 2010/39 no'lu projeye desteklenmiştir.

ÖZET

İNSAN ADAMTS2 GENİNİN TRANSKRİPSİYONEL REGÜLASYONU
DOKTORA TEZİ
MELTEM ALPER
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

(TEZ DANIŞMANI: PROF. DR. FERAY KÖÇKAR)

BALIKESİR, AĞUSTOS-2013

ADAMTS'ler (A Disintegrin And Metalloprotease domain with ThromboSpondin type I motifs) embriyonik gelişim, anjiyogenez ve kırıkta dekredasyonu gibi önemli fizyolojik süreçlerde görev yapan metalloproteazlardır. Bu ailenin üyelerinden ADAMTS2 fibriller prokollajenlerin amino uçlarının kesilmesinde görev yapmaktadır. ADAMTS2 genindeki mutasyonlar insanlarda Ehler Danlos sendromu tip VIIC'ye neden olmaktadır. Organizma için daha birçok önemli fonksiyonu bulunan ADAMTS2'nin transkripsiyonel regülasyonunun aydınlatılması oldukça önemlidir.

Bu çalışmada transkripsiyon başlangıç bölgesinden 760bp'ye kadar uzanan ADAMTS2 promotör bölgesi ve transkripsiyonel olarak en aktif bölgenin belirlenmesi amacıyla üç farklı uzunlukta [-530/+112], [-324/+112], [-180/+112] promotör parçası lusiferaz vektörüne klonlandı. Saos (insan osteosarkoma) hücrelerinde yapılan geçici transfeksiyon analizleri sonucunda bütün parçaların yüksek promotör aktivitesi gösterdiği ve transkripsiyonel aktivite için en küçük promotör parçasının yeterli olduğu belirlendi. Biyoinformatik analizlerle ADAMTS2 promotörünün 110bp'lik 5'UTR bölgesine sahip olduğu, TATA kutusu içermediği, GCKutuları, GA kutuları, CpG adaları, SP1 ve USF için bağlanma motifleri içerdiği belirlendi. Yapılan ko-transfeksiyon çalışmalarıyla USF ve SP1'in ADAMTS2 promotör aktivitesini arttırdığı belirlendi. USF'nin fonksiyonel olarak promotora bağlandığı da EMSA çalışmalarıyla belirlendi.

ADAMTS2'nin çalışılan hücre hatlarında en fazla MG-63'te ve en az HUVEC'te ifade olduğu belirlendi. Saos hücrelerinde ADAMTS2 proteinini immunfloresans ile işaretlendi. Ayrıca Saos hücrelerinde IL-6 ve IL-1 α stimülasyonu ile ADAMTS2 ve ADAMTS3 ekspresyonunun mRNA ve protein düzeyinde arttığı qRT-PCR ve Western blot çalışmalarıyla belirlendi. Benzer MG-63 modelinde de sonuçlar doğrulandı. IL-6'nın ADAMTS2 promotör aktivitesini arttırdığı belirlendi. Saos hücrelerinde yapılan inhibisyon çalışmalarıyla IL-6'nın STAT yolunu ve *de-novo* protein sentezini aktive ettiği belirlendi. IL-6 sitokininin Saos hücrelerinde hücre proliferasyonuna neden olmazken IL-1 α 'nın hücre proliferasyonuna neden olduğu MTT çalışmalarıyla belirlendi.

ANAHTAR KELİMELER: ADAMTS2, transkripsiyonel regülasyon, Ehler Danlos sendromu, osteosarkoma, IL-6, IL-1 α , STAT

ABSTRACT

TRANSCRIPTIONAL REGULATION OF HUMAN *ADAMTS2* GENE
PH.D THESIS
MELTEM ALPER
BALIKESIR UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE
BIOLOGY

(SUPERVISOR: PROF. DR. FERAY KÖÇKAR)

BALIKESİR, AUGUST-2013

ADAMTS (A Disintegrin And Metalloprotease domain with ThromboSpondin type I motifs) are metalloproteinases with demonstrated functionality in embryonic development, angiogenesis and cartilage degradation. One of the members of this family, ADAMTS2 responsible for removal of the amino terminus of the fibrillar procollagens. Mutations in the *ADAMTS2* gene causes Ehler Danlos syndrome type VIIC in humans. It is quite important to elucidate the transcriptional regulation of the *ADAMTS2* which has many important functions for organism.

In this study, *ADAMTS2* promoter region extending up to 760bp from the transcription start site and three different portions of the promoter [-530/+112], [-324/+112], [-180/+112] fragments were cloned into luciferase vector to determine transcriptionally most active region. As a result high promoter activity was determined with all constructs in transiently transfected Saos (human osteosarcoma) cells and the smallest construct was enough to exhibit the transcriptional activity. Bioinformatic analyses revealed that TATA-less *ADAMTS2* promoter has a 110bp 5'UTR region including GC, GA boxes, CpG islands, SP1 and USF binding motifs. The co-transfection studies determined increased activity of the *ADAMTS2* promoter with USF and SP1. Functional binding of USF to *ADAMTS2* promoter was determined by EMSA studies.

Expression of ADAMTS2 was determined at most MG-63 and at least HUVEC among the studied cell lines. ADAMTS2 protein was labelled in Saos cells by immunofluorescence. Increased ADAMTS2 and ADAMTS3 expression at mRNA and protein levels with IL-6 and IL-1 α stimulation of Saos cells was also determined qRT-PCR and Western blotting studies. Results were also confirmed similar MG-63 model. IL-6 was increased activity of the *ADAMTS2* promoter. Inhibition studies showed STAT pathway and *de-novo* protein synthesis activation after IL-6 stimulation in Saos cells. Cell proliferation wasn't determined with IL-6 stimulation in Saos cells by MTT experiments. On the contrary IL-1 α caused cell proliferation.

KEYWORDS: *ADAMTS2*, transcriptional regulation, Ehler Danlos Syndrome, osteosarcoma. IL-6, IL-1 α , STAT

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
ŞEKİL LİSTESİ.....	viii
TABLO LİSTESİ	xi
SEMBOL ve KISALTMALAR LİSTESİ	xii
ÖNSÖZ.....	xiii
1. GİRİŞ.....	1
1.1 ADAMTS Gen Ailesi	2
1.2 ADAMTS Ailesi Üyelerinin Yapısal özellikleri	3
1.3 ADAMTS Proteazların Ekspresyonları	5
1.4 ADAMTS Proteazların Fizyolojik Fonksiyonları	7
1.4.1 Hyalektanaz Aktivitesi: (ADAMTS1, 4, 5, 8, 9, 15 ve 20)	7
1.4.2 Anti-Anjiyogenik Aktivite: (ADAMTS1, 4 ve 8)	8
1.4.3 vWFCP: (ADAMTS13).....	8
1.4.4 Gonad Gelişimi ve Embriyogenez (ADAMTS1, 9, 20)	9
1.4.5 Prokollajen N-propeptidaz (pNP) Aktivitesi: (ADAMTS2, 3 ve 14).....	9
1.5 ADAMTS2	10
1.5.1 ADAMTS2 Metalloproteinazın Domain Yapısı ve Regülasyonu	11
1.5.2 ADAMTS2 Enziminin Fizyolojik Fonksiyonları ve Hastalıklarla İlişkisi.....	12
1.5.2.1 Kollajen Öncüllerinin İşlenmesi	12
1.5.2.2 Gonad Gelişimi	13
1.5.2.3 Anti-Anjiyogenik ve Anti-Tümör Aktivite	13
1.5.3 ADAMTS2 İnhibitörleri	14
1.6 Sitokinler	14
1.6.1 IL-6 (İnterlökin-6).....	16
1.6.2 IL-1 α (İnterlökin-1 alfa)	17
1.7 ADAMTS2 ve Sitokinler.....	18
1.8 Çalışmanın Amacı	19
2. MATERYAL ve METOT	23
2.1 Materyal.....	23
2.1.1 Kullanılan Kimyasallar	23
2.1.2 Kullanılan Araç-Gereçler.....	25
2.1.3 Bakteriyel Hücre Soyları	26
2.1.4 Çalışmada Kullanılan Plazmitler	27
2.1.5 Kullanılan Solüsyonlar	30
2.1.5.1 DNA Çalışmalarında Kullanılan Solüsyonlar	30
2.1.5.2 Hücre Kültürü Çalışmalarında Kullanılan Solüsyonlar	31
2.1.5.2.1 Hücre Kültürü Çalışmalarında Kullanılan Hücre Hatları	31
2.1.5.3 Transkripsiyonel Aktivite Çalışmalarında Kullanılan Solüsyonlar....	32
2.1.5.4 RNA Çalışmalarında Kullanılan Tampon ve Çözeltiler	33

2.1.5.4.1	Formaldehit-Agaroz Jel Elektroforezi Tamponları.....	33
2.1.5.5	Protein Çalışmalarında Kullanılan Tampon ve Çözeltiler	34
2.1.5.6	DNA-Protein Etkileşimi (EMSA) Çalışmalarında Kullanılan Tampon ve Çözeltiler	35
2.1.6	Dizi Analizlerinde Kullanılan Primerler.....	35
2.2	Metod.....	36
2.2.1	Bakteri Çalışmaları ile İlgili Teknikler	36
2.2.1.1	Katı ve Sıvı Besiyerinin Hazırlanması.....	36
2.2.1.2	Bakteri Önkültürün Hazırlanması	36
2.2.1.3	<i>E.coli</i> , <i>DH5α</i> Hücrelerinin Kompetan (Alıcı) Hale Getirilmesi	36
2.2.1.4	Transformasyon.....	37
2.2.1.5	Gliserol Stok Hazırlanması	37
2.2.1.6	Küçük Ölçekli Plazmit DNA İzolasyonu.....	38
2.2.1.7	Büyük Ölçekli Plazmit DNA İzolasyonu.....	38
2.2.2	DNA ile İlgili Teknikler	38
2.2.2.1	Saos Hücre Hattından Genomik DNA İzolasyonu.....	38
2.2.2.2	Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR).....	39
2.2.2.3	Agaroz Jel Elektroforezi	41
2.2.2.4	DNA Örneklerinin Agaroz Jelden Saflaştırılması	41
2.2.2.5	DNA Miktarının Spektrofotometrik Olarak Belirlenmesi	41
2.2.2.6	Restriksiyon Endonükleaz Enzim Kesimi.....	42
2.2.2.7	Defosforilizasyon	42
2.2.2.8	Ligasyon.....	43
2.2.3	Hücre Kültürü ile İlgili Teknikler.....	44
2.2.3.1	Hücre Kültürü Laboratuvarının ve Kullanılan Malzemelerin Temizliği.....	44
2.2.3.2	Hücre Kültürü Deneylerinde Kullanılacak Malzemenin Hazırlığı ..	44
2.2.3.2.1	Medyumun Hazırlanması:.....	44
2.2.3.2.2	FCS'nin Hazırlanması:	45
2.2.3.2.3	PBS'nin Hazırlanması:	45
2.2.3.2.4	Tripsin-EDTA Solüsyonunun Hazırlanması:.....	45
2.2.3.3	Hücre Hatlarının Rutin Bakımı	45
2.2.3.3.1	Hücrelerin Açılması.....	45
2.2.3.3.2	Hücrelerin Pasajlanması	46
2.2.3.3.3	Hücre Canlılığının Belirlenmesi ve Hücre Sayımının Yapılması	46
2.2.3.3.4	Hücrelerin Dondurulması	47
2.2.4	Transkripsiyonel Aktivite ile İlgili Teknikler.....	47
2.2.4.1	Kalsiyum-Fosfat Presipitasyonu ile Geçici Transfeksiyon.....	47
2.2.4.1.1	Salınan Sistem Lusiferaz Aktivitesinin Ölçülmesi	48
2.2.4.1.2	SEAP Aktivitesinin Ölçümü.....	48
2.2.4.1.3	B- Galaktozidaz Aktivitesinin Ölçülmesi	48
2.2.5	RNA ile İlgili Teknikler.....	49
2.2.5.1	Sitokin Deneylerinin Kurulması	49
2.2.5.2	RNA İzolasyonunun Yapılması	49
2.2.5.3	RNA Miktarının Spektrofotometrik Olarak Belirlenmesi.....	49
2.2.5.4	Formaldehit Agaroz Jel Elektroforezi.....	50
2.2.5.5	RT- PCR Reaksiyonu	50
2.2.5.6	Real Time PCR	51
2.2.5.7	Sonuçların Değerlendirilmesi ve İstatistiksel Analiz.....	51

2.2.6	Protein ile İlgili Teknikler.....	52
2.2.6.1	Westernblot	52
2.2.6.1.1	Westernblot İçin Sitokin Deneylerin Kurulması	52
2.2.6.1.2	Yolak Çalışmaları İçin Deneylerin Kurulması	52
2.2.6.1.3	Total Hücre Ekstraktının Hazırlanması	52
2.2.6.1.4	SDS-PAGE	53
2.2.6.1.5	Proteinlerin PVDF Membrana Transferi ve İmmünolojik Olarak Belirlenmesi	54
2.2.6.1.6	PVDF Membrandan Antikorların Ayrılması (Stripping).....	55
2.2.6.1.7	Sonuçların Değerlendirilmesi	55
2.2.6.2	İmmünfloresans Tekniği	55
2.2.7	DNA-Protein Etkileşimi ile İlgili Teknikler	56
2.2.7.1	Electromobility Shift Assay (EMSA)	56
2.2.7.1.1	Saos Hücrelerinden Nükleer Ekstrakt Hazırlanması	57
2.2.7.1.2	Oligonükleotidlerin Bağlanması	57
2.2.7.1.3	Bağlanma Reaksiyonu	57
2.2.7.1.4	Jelin Yürütülmesi ve Proteinlerin Membrana Transferi	58
3.	BULGULAR	59
3.1	İnsan <i>ADAMTS2</i> Promotorunun pGEM-T Easy Plazmit Vektörüne Klonlanması	59
3.1.1	Genomik DNA İzolasyonu	59
3.1.2	Primer Tasarımı	59
3.1.3	<i>ADAMTS2</i> Promotorunun Klonlanması İçin Kullanılan Yüksek GC Baz Oranına Sahip Dizilere Özel PCR Stratejileri	61
3.1.3.1	Farklı Enzim Sistemleri.....	61
3.1.3.2	Farklı PCR Yöntemleri	63
3.1.3.3	İnsan Genome Walker Stratejisi.....	66
3.1.3.4	Genomik DNA'nın Restriksiyon Enzimleriyle Kesilmesiyle Elde Edilen Ürünün Kalıp Olarak Kullanıldığı PCR Amplifikasyonları ...	68
3.1.3.5	PCR Kuvvetlendiricileri.....	68
3.1.4	PCR Ürünlerinin pGEM-T Easy Vektör Sistemi'ne Ligasyonu ve <i>DH5α</i> Hücrelerine Transformasyonu	69
3.1.5	pGEM-T Easy Vektörüne Yapılan Ligasyonun Kontrolü	69
3.1.6	Dizi Analizi.....	70
3.2	Kısaltılarak Yapılan <i>ADAMTS2</i> Promotor Parçalarının Oluşturulması	71
3.2.1	<i>ADAMTS2</i> Promotorunun 760bp'lik Bölgesinin Kısmi Kesim Stratejisi ile pMetLuc Haberci Gen Vektörüne Klonlanması.....	72
3.2.1	<i>ADAMTS2</i> Promotorunun 530bp'lik Bölgesinin pMetLuc Haberci Gen Vektörüne Klonlanması	73
3.2.2	<i>ADAMTS2</i> Promotorunun 324bp'lik Bölgesinin pMetLuc Haberci Gen Vektörüne Klonlanması	74
3.2.3	<i>ADAMTS2</i> Promotorunun 180bp'lik Bölgesinin pMetLuc Haberci Gen Vektörüne Klonlanması	75
3.3	İnsan <i>ADAMTS2</i> Promotorunun Karakterizasyonu.....	77
3.4	İnsan <i>ADAMTS2</i> Promotorunun Fonksiyonel Analizi	80
3.4.1	Saos Hücrelerinde Kalsiyum-Fosfat Presitasyonu ile Geçici Transfeksiyonun Salınan Lusiferaz Sisteminde Optimize Edilmesi.....	80
3.4.2	Bazal Promotor Aktivitesinin Belirlenmesi	82
3.4.3	Kotransfeksiyon Çalışmaları.....	85
3.4.4	EMSA	86

3.5	ADAMTS2 mRNA Ekspresyon ve Protein Düzeyindeki Çalışmalar.....	89
3.5.1	ADAMTS2'nin Farklı Hücre Hatlarındaki Ekspresyon Seviyesinin Belirlenmesi	89
3.5.2	Saos Hücrelerinde ADAMTS2 Proteininin İmmunfloresans ile Gösterilmesi.....	92
3.5.2.1	Western Blot Optimizasyon Çalışmaları.....	93
3.5.2.1.1	Primer/sekonder Antikor Konsantrasyonunun Optimizasyonu	94
3.5.2.1.2	Protein Ekstraktı Hazırlamada Kullanılan Yöntem ve Tampon Sisteminin Optimizasyonu.....	97
3.5.2.1.3	Transfer Etkinliğinin ve Yüklenen Protein Kalitesinin Belirlenmesine Yönelik Çalışmalar	98
3.5.2.1.4	Özgün Olmayan Sekonder Antikor Kalıntılarının Kontrolü.....	99
3.5.3	IL-6 Sitokin <i>ADAMTS2</i> ve <i>ADAMTS3</i> Gen İfadesine Etkileri.....	100
3.5.3.1	IL-6 Sitokin Saos Hücre Proliferasyonuna Etkisinin Belirlenmesi.....	101
3.5.3.2	Saos Hücrelerinde IL-6 Sitokin <i>ADAMTS2</i> ve <i>ADAMTS3</i> mRNA Ekspresyonuna Etkisinin Kantitatif Realtime PCR ile Belirlenmesi.....	103
3.5.3.3	Saos Hücrelerinde IL-6 Sitokin Doza ve Zamana Bağlı Olarak <i>ADAMTS2</i> mRNA Düzeyine Etkisinin Kantitatif Realtime PCR ile Belirlenmesi.....	105
3.5.3.4	Benzer MG-63 Hücre Modelinde IL-6 Sitokin <i>ADAMTS2</i> ve <i>ADAMTS3</i> mRNA Seviyesine Etkisinin Belirlenmesi	107
3.5.3.5	Farklı HT-29 Kolon Kanseri Hücre Modelinde IL-6 Sitokin <i>ADAMTS2</i> mRNA Seviyesine Etkisinin Belirlenmesi	108
3.5.4	Saos Osteosarkoma Hücre Modelinde <i>ADAMTS2</i> ve <i>ADAMTS3</i> Protein Düzeyinin Western blot ile Belirlenmesi	110
3.5.4.1	Saos Osteosarkoma Hücre Modelinde IL-6 Sitokin <i>ADAMTS2</i> ve <i>ADAMTS3</i> Protein Düzeyine Olan Etkilerinin Westernblot ile Belirlenmesi	110
3.5.4.2	Benzer MG-63 Hücre Modelinde IL-6 Sitokin <i>ADAMTS2</i> ve <i>ADAMTS3</i> Protein Düzeyine Olan Etkilerinin Westernblot ile Belirlenmesi.....	111
3.5.5	IL-6 Sitokin <i>ADAMTS2</i> Transkripsiyonel Aktivitesine Etkisinin Belirlenmesi.....	112
3.5.6	Yolak Çalışmaları	113
3.5.7	IL-1 α Sitokin <i>ADAMTS2</i> ve <i>ADAMTS3</i> Gen İfadesine Etkileri.....	114
3.5.7.1	IL-1 α Sitokin Saos Hücre Proliferasyonuna Etkisinin Belirlenmesi.....	114
3.5.7.2	Saos Osteosarkoma Hücre Modelinde IL-1 α Sitokin <i>ADAMTS2</i> ve <i>ADAMTS3</i> mRNA Ekspresyonuna Etkilerinin Kantitatif Realtime PCR ile Belirlenmesi	115
3.5.7.3	Saos Osteosarkoma Hücre Modelinde IL-1 α Sitokin <i>ADAMTS2</i> ve <i>ADAMTS3</i> Protein Düzeyine Olan Etkilerinin Westernblot ile Belirlenmesi	118
3.5.7.4	Benzer MG-63 Hücre Modelinde IL-1 α Sitokin <i>ADAMTS2</i> Protein Düzeyine Olan Etkilerinin Westernblot ile Belirlenmesi	119
4.	SONUÇ VE ÖNERİLER	120
5.	KAYNAKLAR.....	128

6. EKLER	135
EK-A DNA Büyüklük Belirteçleri	135
EK-B Protein Büyüklük Belirteci.....	136
EK-C ADAMTS2 cDNA Bilgileri	137
EK-D ADAMTS2 Restriksiyon Haritası.....	143
EK-E <i>ADAMTS2</i> Promotoru Transkripsiyon Faktörü Bağlanma Bölgeleri.....	147

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1.1: MMP, ADAM ve ADAMTS proteinazlarının temel domain yapıları (Darren ve diğ.'den [11] uyarlanmıştır).....	2
Şekil 1.2: ADAMTS proteazların domain yapısı (Apte'den [20] uyarlanmıştır).....	5
Şekil 1.3: ADAMTS proteazların fizyolojik fonksiyonları.....	7
Şekil 1.4: ADAMTS2 geninin domain organizasyonu.....	11
Şekil 1.5: Tip I prokollajenin amino ve karboksi propeptidlerinin işlenmesi. Amino uç solda, iki adet pro- α 1 zinciri siyah, tek ve daha kısa olan pro- α 2 gri renklidir.....	12
Şekil 1.6: IL-6 sinyal iletim yolu.....	17
Şekil 1.7: IL-1 sinyal iletim yolu. O'Neill ve Greene'den [41] uyarlanmıştır.....	18
Şekil 1.8: Çalışma basamaklarını özetleyen akış diyagramı.....	22
Şekil 2.1: pGEM-T Easy vektör haritası ve klonlama bölgeleri.....	27
Şekil 2.2: pMetLuc-Reporter vektör haritası ve klonlama bölgeleri.....	28
Şekil 2.3: pSEAP2-Kontrol vektörü haritası.....	28
Şekil 2.4: pSV- β -Galaktozidaz vektörü haritası.....	29
Şekil 2.5: pMetLuc Kontrol vektörü haritası.....	29
Şekil 2.6: Thoma lamı.....	47
Şekil 3.1: İzole edilen genomik DNA'lara ait agaroz jel elektroforezi görüntüsü.....	59
Şekil 3.2: ADAMTS2 promotor amplifikasyonu için tasarlanan primerlere ait diyagram.....	61
Şekil 3.3: <i>Taq</i> DNA polimeraz enzimi kullanılarak yapılan PCR çalışmaları.....	62
Şekil 3.4: Farklı DNA polimeraz enzimleri kullanılarak yapılan PCR çalışmaları.....	63
Şekil 3.5: ADAMTS2 promotor bölgesi olası CpG adası bölgesi.....	64
Şekil 3.6: ADAMTS2 promotor bölgesine ait olası sekonder yapı oluşumu.....	65
Şekil 3.7: Genome Walker Human Kit (Clontech) çalışma basamakları.....	66
Şekil 3.8: İnsan genome walker kitinde I.ve II. basamakta kullanılan primerler.....	67
Şekil 3.9: Genome walker I. ve II. Basamak sonuçları.....	67
Şekil 3.10: ADAMTS2 promotoru amplifikasyonu agaroz jel elektroforezi görüntüsü.....	68
Şekil 3.11: ADAMTS2 [+112/-658] promotor parçasının pGEMT Easy vektörüne ligasyonunun kontrolü.....	69
Şekil 3.12: pGEM-T Easy vektörüne ligasyonu yapılan 760bp'lik ADAMTS2 promotor bölgesinin dizileme sonuçlarının gen bankasındaki dizi ile karşılaştırılması.....	70
Şekil 3.13: Kısaltılarak oluşturulan ADAMTS2 promotor parçaları.....	71
Şekil 3.14: Kısmi kesim agaroz jel görüntüsü.....	72
Şekil 3.15: 530bp'lik ADAMTS2 promotor parçasının pGEMT Easy vektöre olan ligasyonunun kontrolü.....	73

Şekil 3.16: 530bç'lik ADAMTS2 promotor parçasının pMetLuc haberci gen vektörüne ligasyonunun kontrolü.....	74
Şekil 3.17: 324bç'lik ADAMTS2 promotor parçasının pMetLuc haberci gen vektörüne ligasyonunun kontrolü.....	75
Şekil 3.18: 180bç'lik ADAMTS2 promotor parçasının pGEMT Easy vektöre olan ligasyonunun kontrolü.....	76
Şekil 3.19: 180bç'lik ADAMTS2 promotor parçasının pMetLuc haberci gen vektörüne ligasyonunun kontrolü.....	76
Şekil 3.20: İnsan ADAMTS2 5'UTR bölgesinin digger türleri ile karşılaştırılması.....	77
Şekil 3.21: ADAMTS2 [-658/+112] promotoru üzerinde muhtemel transkripsiyon faktörü bağlanma bölgeleri ve motifleri.....	78
Şekil 3.22: pMetLuc kontrol vektörü lusiferaz aktivitesi.....	81
Şekil 3.23: Seap kontrol vektörü salınan alkalın fosfataz aktivitesi.....	82
Şekil 3.24: pMetLuc haberci gen vektörü lusiferaz aktivitesi.....	82
Şekil 3.25: ADAMTS2 760bç promotor parçasının lusiferaz aktivite sonuçları.....	83
Şekil 3.26: ADAMTS2 promotor parçalarının karşılaştırmalı bazal aktiviteleri.....	84
Şekil 3.27: ADAMTS2 promotor parçalarının hSP1 ile kotransfeksiyonu sonucu 48 saat karşılaştırmalı lusiferaz aktiviteleri.....	85
Şekil 3.28: ADAMTS2 promotor parçalarının hUSF ile kotransfeksiyonu sonucu 48 saat karşılaştırmalı lusiferaz aktiviteleri.....	86
Şekil 3.29: ADAMTS2 EMSA çalışmalarında incelenen bölge.....	87
Şekil 3.30: ADAMTS2 EMSA sonucu.....	89
Şekil 3.31: ADAMTS2'nin farklı hücre hatlarındaki ekspresyon analizi.....	90
Şekil 3.32: Ekspresyon çalışmalarında kullanılan hücre hatları.....	91
Şekil 3.33: ADAMTS2 immünfloresans boyama sonuçları.....	93
Şekil 3.34: Dot-blot analizi film görüntüsü.....	97
Şekil 3.35: Laemli ve NP-40 tamponu ile hazırlanan ekstraktlara ait westernblot sonucu.....	98
Şekil 3.36: Westernblot kontrol paneli.....	99
Şekil 3.37: Sadece sekonder antikor ile muamele edilen membranın görüntüsü.....	100
Şekil 3.38: Sitokinlerin ADAMTS2 ve ADAMTS3 gen ifadesine etkilerinin belirlenebilmesi amacıyla takip edilecek çalışma planı ve uygulanacak yöntemler.....	101
Şekil 3.39: IL-6 sitokininin Saos hücre proliferasyonuna etkisinin zamana bağlı olarak değerlendirilmesi.....	102
Şekil 3.40: IL-6 sitokininin Saos hücre proliferasyonuna etkisinin doza ve zamana bağlı olarak değerlendirilmesi.....	102
Şekil 3.41: Saos 500 Ü/ml IL-6 uygulanan deney ve kontrol gruplarına ait RNA'ların formaldehit agaroz jel görüntüsü.....	104
Şekil 3.42: Saos hücrelerinde IL-6 sitokininin, ADAMTS2 mRNA ekspresyon seviyesine etkileri.....	104
Şekil 3.43: Saos hücrelerinde IL-6 sitokininin, ADAMTS3 mRNA ekspresyon seviyesine etkileri.....	105
Şekil 3.44: Saos-2 hücrelerinde ADAMTS2 mRNA seviyesinin IL6 sitokin uygulaması sonucu doza bağlı değişimi.....	106
Şekil 3.45: MG-63 500 Ü/ml IL-6 uygulanan deney ve kontrol gruplarına ait RNA'ların formaldehit agaroz jel görüntüsü.....	107

Şekil 3.46: MG-63 hücrelerinde IL-6 sitokininin, ADAMTS2 mRNA ekspresyon seviyesine etkileri.....	107
Şekil 3.47: MG-63 hücrelerinde IL-6 sitokininin, ADAMTS3 mRNA ekspresyon seviyesine etkileri.....	108
Şekil 3.48: HT-29 500 Ü/ml IL-6 uygulanan deney ve kontrol gruplarına ait RNA'ların formaldehit agaroz jel görüntüsü.	109
Şekil 3.49: HT-29 hücrelerinde IL6 sitokininin, ADAMTS2 mRNA ekspresyon seviyesine etkileri.....	109
Şekil 3.50: Saos hücrelerinde IL-6 sitokininin ADAMTS2 protein düzeyine etkisi.	110
Şekil 3.51: Saos hücrelerinde IL-6 sitokininin ADAMTS3 protein düzeyine etkisi.	111
Şekil 3.52: MG-63 hücrelerinde IL-6 sitokininin ADAMTS2 protein düzeyine etkisi.....	112
Şekil 3.53: MG-63 hücrelerinde IL-6 sitokininin ADAMTS3 protein düzeyine etkisi.....	112
Şekil 3.54: IL-6 sitokininin <i>ADAMTS2</i> promotor parçaları üzerine etkisinin karşılaştırılması.	113
Şekil 3.55: ADAMTS2 inhibisyon çalışmaları.....	114
Şekil 3.56: IL-1 α sitokininin Saos hücre proliferasyonuna etkisinin zamana bağlı olarak değerlendirilmesi.....	115
Şekil 3.57: Saos 500 Ü/ml IL-1 α uygulanan deney ve kontrol gruplarına ait RNA'ların formaldehit agaroz jel görüntüsü.	116
Şekil 3.58: Saos hücrelerinde IL-1 α sitokininin, ADAMTS2 mRNA ekspresyon seviyesine etkileri.....	117
Şekil 3.59: Saos hücrelerinde IL-1 α sitokininin, ADAMTS3 mRNA ekspresyon seviyesine etkileri.....	117
Şekil 3.60: Saos hücrelerinde IL-1 α sitokininin ADAMTS2 protein düzeyine etkisi.	118
Şekil 3.61: Saos hücrelerinde IL-1 α sitokininin ADAMTS3 protein düzeyine etkisi.	118
Şekil 3.62: MG-63 hücrelerinde IL-1 α sitokininin ADAMTS2 protein düzeyine etkisi.....	119
Şekil 6.1: DNA büyüklük belirteci (100bç).....	135
Şekil 6.2: DNA büyüklük belirteci (1kb).	135
Şekil 6.3: Protein büyüklük belirteci.	136

TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 1.1: ADAMTS enzimlerinin farklı dokulardaki ekspresyon analizi.....	6
Tablo 2.1: Çalışmalarda kullanılan malzemeler ve temin edildikleri firmaların listesi.....	23
Tablo 2.2: Kullanılan araç-gereçler ve satın alındıkları firmaların listesi.....	25
Tablo 2.3: Genomik DNA izolasyonunda kullanılan solüsyonlar.	30
Tablo 2.4: DNA agaroz jel elektroforezinde kullanılan çözeltiler.	30
Tablo 2.5: Salınan sistemle yapılan geçici transfeksiyon deneylerinde kullanılan tampon ve çözeltiler.	32
Tablo 2.6: Lusiferaz, SEAP ve β -Galaktozidaz aktivitesinin ölçümünde kullanılan tampon ve solüsyonlar.....	32
Tablo 2.7: Formaldehit agaroz jel elektroforezi jel tamponu.....	33
Tablo 2.8: FA jel elektroforezi tank tamponu.....	33
Tablo 2.9: Western blot çalışmalarında kullanılan tampon ve çözeltiler.....	34
Tablo 2.10: EMSA çalışmalarında kullanılan tampon ve çözeltiler.	35
Tablo 2.11: Ligasyonların kontrolü amacıyla tasarlanan pMetLuc dizileme primeri.	35
Tablo 2.12: PCR bileşenleri, miktar ve son konsantrasyonları.	39
Tablo 2.13: PCR döngü koşulları.....	40
Tablo 2.14: Hot-Start ile kombine edilmiş touch down PCR döngü koşulları.....	40
Tablo 2.15: Kısmi kesim koşulları.	42
Tablo 2.16: pMetLuc vektörü defosforilizasyon koşulları.....	43
Tablo 2.17: Real time PCR döngü koşulları.	51
Tablo 2.18: SDS-PAGE Ayırma ve yığıma jeli bileşen miktar ve son konsantrasyonları	54
Tablo 3.1: İnsan <i>ADAMTS2</i> promotor bölgesinin amplifikasyonu için tasarlanan primer dizileri.....	60
Tablo 3.2: <i>ADAMTS2</i> promotor parçalarının klonlama stratejileri.	71
Tablo 3.3: <i>ADAMTS2</i> promotoru üzerinde bağlanma motifleri bulunan transkripsiyon faktörleri ve bağlanma bölgeleri.....	80
Tablo 3.4: EMSA çalışmalarında kullanılan primer dizileri.....	88
Tablo 3.5: Ekspresyon çalışmalarında kullanılan primer bilgileri.	92
Tablo 3.6: Farklı antikor dilüsyonlarında farklı firmalara ait antikorlarla yapılan westernblot çalışmaları.....	95
Tablo 3.7: Dot-Blot analizinde uygulanan antikor dilüsyonları ve protein miktarları.	96

SEMBOL ve KISALTMALAR LİSTESİ

EMSA:	Electromobility Shift Assay
DMSO:	Dimetil Sülfoksit
DEPC:	Dietilpirokarbonat
mRNA:	Mesajcı Ribonükleik Asit
USF:	Upstream stimulatory factor 1
UV:	Ultra-viyole
RPM:	Dakikadaki Dönüş Sayısı.
SP1:	Specificity protein 1alpha
O.D:	Optik Dansite
Nm:	Nanometre
µg:	Mikrogram
fmol:	Femtomol
Ct:	Cycle Treshold

ÖNSÖZ

Doktora tezi olarak hazırlanan bu çalışmanın deneysel aşamaları, Balıkesir Üniversitesi Temel Bilimler Uygulama ve Araştırma Merkezi Biyoloji ve Kimya laboratuvarlarında yapılmış olup, Balıkesir Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi öğretim üyesi Prof. Dr. Feray KÖÇKAR danışmanlığında sonuçlanmıştır.

Yoğun laboratuvar çalışmalarım süresince beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan, engin bilgi ve tecrübeleriyle beni özveriyle yetiştiren değerli hocam Prof. Dr. Feray KÖÇKAR'a en içten minnet ve teşekkürlerimi sunarım.

Tez izleme komitesinde bulunarak değerli fikirleriyle çalışmalarına katkıda bulunan değerli hocalarım, Prof. Dr. Dilek T. BALIK ve Doç. Dr. Ekrem DÜNDAR'a teşekkür ederim.

Çalışmalarım sırasında kullandığım hücre hatlarının temininde yardımlarını esirgemeyen Ege Üniversitesi Biyomühendislik Anabilim Dalı Öğretim üyesi Prof. Dr. İsmet D. GÜRHAN, Prof. Dr. Kemal S. KORKMAZ, Cardiff Üniversitesi'nden Dr. Kenneth Wan ve Dr. Deborah Mason'a teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım sırasında ve özel hayatımda desteklerini hep hissettiğim; Doç. Dr. Olga SAK, Doç. Dr. Serdar SAK, Doç. Dr. Selma SİNAN, Yrd. Doç. Dr. Hatice YILDIRIM, Yrd. Doç. Dr. Sümeyye A. TÜRKÖĞLU, Dr. Berna SANÖN, Dr. Ayla AVCIKURT, Yrd. Doç. Dr. F. Bahar SUNAY, Yrd. Doç. Dr. Elif SAVAŞ, Yrd. Doç. Dr. Semra IŞIK ve Uzm. Ferit KARANFİL'e en içten teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuvarda en yoğun çalışma zamanlarımda ve özel yaşantımda hep yanımda olan, arkadaştan öte birer kardeş gibi gördüğüm Esra TOKAY, Derya OKUYAN, A. Tuğşen AYDEMİR, Z. Ece CEYLAN, Merve KARAMAN, Ceylan TOPRAK, Mihrap Y. KAYA, Serhad ONAT, Selin S. AYZ, Gülçin ÇETİN, Gizem GÜLER, Kubilay T.GÜNERHAN, Görkem DENİZ ve Öznur SUAKAR'a çok teşekkür ederim.

Hayatı paylaştığım, her zaman en büyük destekçilerimden biri olduğumu bildiğim, varlığıyla beni huzurlu ve mutlu kılan biricik eşim Alp ALPER'e

Manevi destekleri ve yardımlarını hep hissettiğim değerli annem Necmiye ALPER ve babam M. İskender ALPER'e

Bana olan güvenlerini hiçbir zaman kaybetmeyen, beni her koşulda destekleyen, bu çalışmanın ortaya çıkmasında en büyük katkısı olan canım annem Z. Nilüfer AYDIN, babam Turan AYDIN'a ve varlığıyla beni mutlu kılan biricik kardeşim Ebru AYDIN'a sonsuz sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

1. GİRİŞ

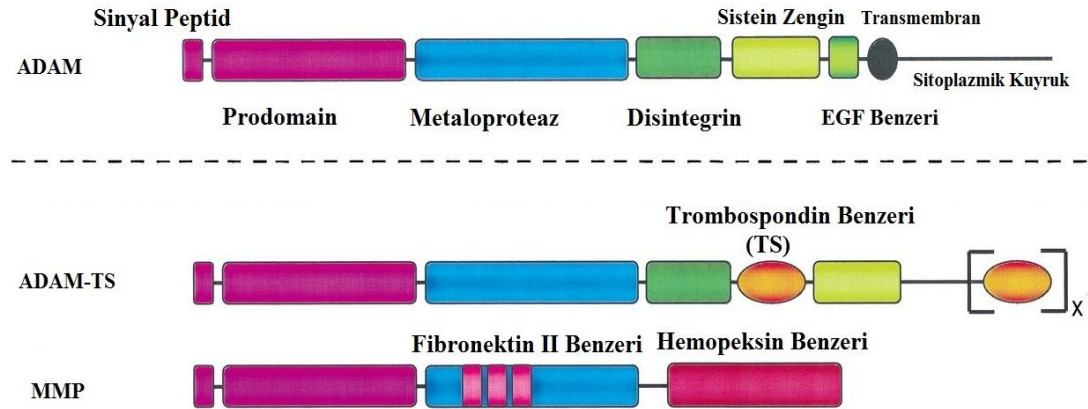
MMP'ler (*Matrix Metalloproteinase; Matriks Metaloproteinaz*), hücreler arası matrikste görev yapan enzimlerdir. Embriyogenez, normal doku yenilenme süreci, yara onarımı ve anjiyogenez gibi normal süreçlerde rol oynadığı gibi; aterom, artirit, kanser ve ülserleşme gibi patolojik süreçlerde de rol oynar. Bugünkü bilgiler dahilinde kollajeni yıktığı bilinen tek enzim grubu *MMP*'lerdir [1]. Kemik ve kırıkdağın temel bileşeni olan kollajenler doku ve organlara mekanik desteklik sağlayıp onları dış etkilere karşı koruyan hücreler arası matriksin temel bileşenlerindedir. Kollajen, hücreye oryantasyonu için platform sağlar ve dokuya özgün gen ekspresyonu için hücreleri teşvik eder. Özellikle Tip I, II, III ve V kollajenleri cilt, kemik, tendon, dentin, hiyalin kırıkdağ, kan damarları, kornea ve sinoviyal membranlar gibi birçok dokuda bulunmaktadır. Bu kollajenler fibril oluşturabilme yeteneğindedir. Hücrelerde sentezlenen kollajen hücreler arası matikse salgılanır ve bir takım işlemlere tabi tutulur. Bu işlemler proteinin amino ve karboksi uçlarındaki aminopropeptid kısımlarının uzaklaştırılmasını kapsamaktadır. Bu işleme düzgün olarak gerçekleşmediğinde anormal fibril yapısı ve bununla bağlantılı olarak patofizyolojik problemler ortaya çıkmaktadır. Kollajenlerin karboksi uçlarının olgunlaşmasında *BMP-1 (Bone Morphogenetic Protein; Kemik Morfogenetik Protein-1)* gibi bir dizi prokollajen C proteinaz enzimleri görev yapmaktadır [2, 3]. Kollajenlerin amino uçlarındaki işlenmeyi ise bugünkü bilgilerimize göre *ADAMTS2 (A Disintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin Motifs 2; Trombospondin Motifli Disintegrin ve metaloproteinaz 2)*, 3 ve 14 *prokollojen N proteinazlar (pNP)* yapmaktadır. *ADAMTS2*; tip I, II, III ve V prokollajenleri olgunlaştırabilmektedir. Özellikle ciltte bulunan prokollajenlerin amino uçlarının olgunlaştırılmasında *ADAMTS2* alternatifsiz olarak görev yapmaktadır. Bu nedenle *ADAMTS2* gen mutasyonları ile ilgili fonksiyonel kayıplarda cildin kollajen yapısı deforme olup, Ehler-Danlos Sendromu Tip VIIC ve Dermatosparaksis gibi önemli sendromlar ortaya çıkmaktadır [4, 5]. Kollajenin işlenmesinde, kilit rolü olan *ADAMTS2* ilk olarak Colige ve diğ. [6, 7] tarafından prokollajenin amino ucunun işlenmesi için önemli olan bir protein olarak *pNP* olarak adlandırılmıştır. Daha sonra Kuno ve diğ. [8] tarafından *ADAMTS1*'in

aydınlatılmasıyla pNP'nin de aslında bir *ADAMTS* olduğu önerilerek bu şekilde isimlendirilmiştir.

1.1 *ADAMTS* Gen Ailesi

ADAMTS proteazlar ilk olarak farelerde, sonrasında ise memelilerde ve *C.elegans*'da aydınlatılmıştır [9]. Bilinen 19 üyesi mevcuttur. Kısaca özetlenecek olursa; anti anjiyogenik *ADAMTS1* ve 8, agrekanazlar; *ADAMTS1*, 4, 5, 8, 9 ve 15, *pNP*'ler; *ADAMTS2*, 3, 14, üreme organları gelişiminde görev alanlar; *ADAMTS9* ve 20, *vWFCP* (*von Willebrand factor cleavage protease*; *von Willebrand faktörü kesen proteaz*); *ADAMTS13*, organ oluşumunda görev aldığı düşünülen; *ADAMTS17* ve ailenin fonksiyonu ve substratları tam olarak aydınlatılmamış üyeleri ise; *ADAMTS6*, 7, 10, 12, 16, 18 ve 19 olarak adlandırılmaktadır [10].

ADAMTS enzimleri, yapısal ve evrimsel olarak *ADAM* (*A Disintegrin and Metalloproteinase*; *Disintegrin ve Metalloproteinaz*) ve *MMP*'ler ile benzerlik gösterir. Şekil 1.1'de *MMP*, *ADAM* ve *ADAMTS* proteazlara ait temel domain yapıları gösterilmektedir [4].



Şekil 1.1: MMP, ADAM ve ADAMTS proteazlarının temel domain yapıları (Darren ve diğ.'den [11] uyarlanmıştır).

Transmembran proteinler olan ADAM enzimlerinin aksine (ADAM12 ve 28 varyasyonları hariç), tüm memeli ADAMTS enzimleri salgılanan moleküllerdir ve

ADAM proteinlerinde bulunan *EGF* (*Epidermal Growth Factor; Epidermal Büyüme Faktörü*) benzeri domainler, ADAMTS proteazlarda yoktur. Bunun yerine ADAMTS proteazlar karboksi uç bölgelerinde değişen sayılarda *TS* (*Thrombospondin 1; Trombospondin 1*) tipine benzer tekrarlar içerir. Bu tekrarlar hücrelerarası matrikse bağlanmayı sağlar [12].

1.2 ADAMTS Ailesi Üyelerinin Yapısal Özellikleri

Bütün ADAMTS enzimleri öncelikle inaktif pre-proproteinler olarak sentezlenir. ADAMTS ailesi üyeleri yapısal olarak ortak bazı karakteristik domainler ve motifler içermektedir (Şekil 1.2). Bu domainler amino uçtan karboksi uca doğru şöyledir;

Sinyal peptid dizisi; değişken uzunluklarda (220-300 aminoasit) olabilir. *ADAMTS13*'te 74 aminoasit içeriğiyle diğerlerine göre daha kısadır [3].

Pro-domain; inaktif formdaki öncül enzimi korur [3]. Furin kesimi için en az bir tane korunmuş motif içerir. Bir konvertaz enzimi olan furin latent halde bulunan öncül proteinleri biyolojik olarak aktif formlarına dönüştürür. Furin insanlarda *FURIN* geni tarafından kodlanan bir proteindir. Furin ayrıca *PACE* (*Paired basic Aminoacid Cleaving Enzyme*) olarak da bilinir [13-15].

Metaloproteinaz katalitik domain; ADAMTS proteazların katalitik domainleri yüksek derecede benzerlik gösterir. Reprölin tip çinko bağlanma motifi içerir. Katalitik çinko iyonu üç adet histidin rezidüsü ile koordine halde bulunur. Bu koordinasyon korunmuş glisin ile sağlanır. Glisin dar bir saç tokası ilmeği oluşturur ve bu şekilde üç histidin rezidüsünün doğru pozisyonda bulunmasına olanak sağlar. Çinko bağlanma dizisini korunmuş bir metionin rezidüsü izler. Bu yüzden aktif bölge *Met-çinko tip* olarak adlandırılır. Metioninin sağ el dönüş yönünde oluşturduğu dönüşler aktif bölge için önemlidir [3, 12].

Disintegrin benzeri domain; bu kısım sistein içermediğinden *Disintegrin benzeri* olarak adlandırılır. Yılan zehiri disintegrini ile benzerlik göstermektedir.

Merkezi TS (Trombospondin) Tip-I benzeri tekrarlar; bu domainin sülfatlanmış glikozaminglikan bağlama domaini olarak görev yaptığı düşünülmektedir ve heparin bağlama ünitesi içermektedir.

Sistein bakımından zengin domainler; 10 adet korunmuş Sistein rezidüsü içermektedir.

Değişebilen uzunlukta ara bölge; amino ve karboksi uçlarda, korunmuş hidrofobik rezidü içerir. Bu bölge enzimin yapısal karakterini etkilemez.

Karboksi ucunda değişken sayılarda TS tekrarları; *ADAMTS4* dışındaki bütün üyeler 1-14 adet TS tekrarlar içerir [3].

Yukarıda sayılan kısımlara ek olarak bazı *ADAMTS* enzimleri, karboksi uca farklı modüller de içerebilir. Örneğin;

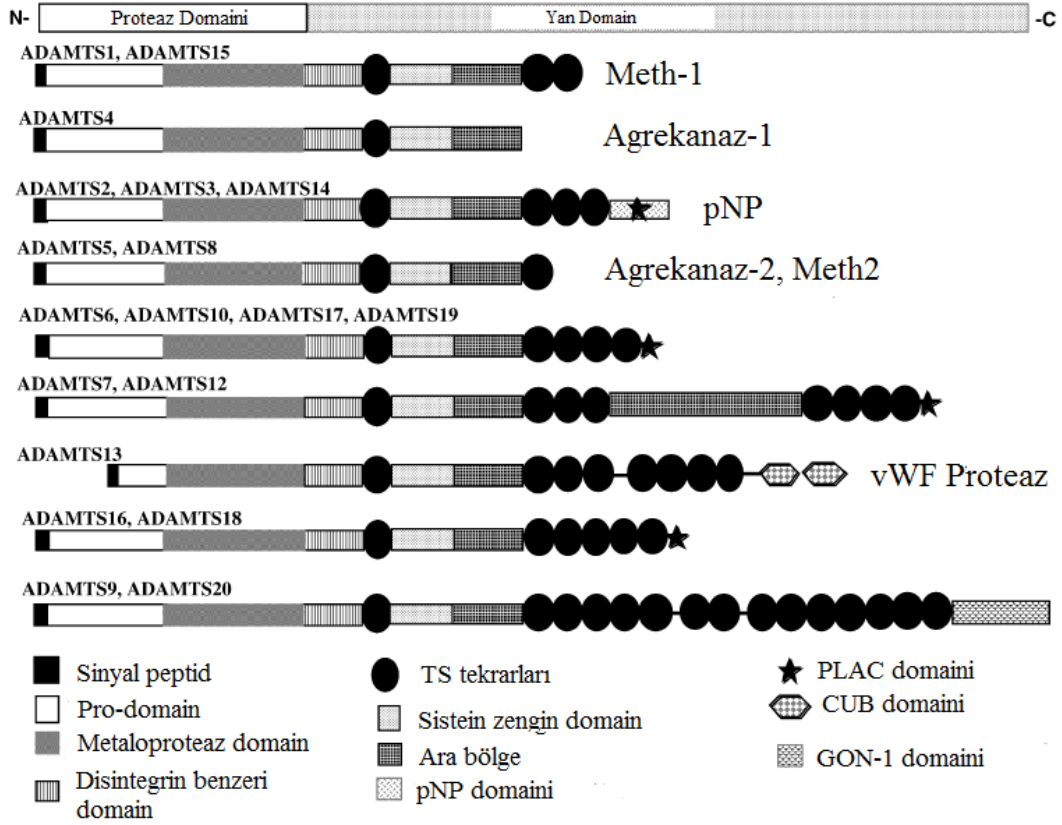
Musin domaini; *ADAMTS7* ve *12*, musin domaini içerir [16].

GON (Üreme organ) domainleri; gonad gelişiminde görev alır. *ADAMTS9* ve *20* bu domaini içerir [17].

CUB (Complement subcomponent C1r/C1s/embryonic sea urchin protein Uegf (urchin epidermal growth factor) / Bone morphogenic protein 1) domaini; bu domaini içeren proteinlerin çoğunun embriyogenez ya da organogenez gibi gelişim süreçlerinde rol aldığı düşünülmektedir. CUB domaini çinkoya bağımlı astasin ailesinde görülür ve fonksiyonel olarak bağımsız bir modüldür. Hücreler arası proteinlerde değişken oranlarda bulunur. *ADAMTS13*, iki adet CUB domaini içeren tek üyedir [18].

PLAC (Protease and Lacunin; Proteaz ve Lasunin) domaini; PLAC domaini ilk olarak hücreler arası matriks proteini olan lasuninin karboksi ucunda bulunmuştur. Kanat oluşumu ve embriyonik gelişimde epitel hücrelerin şekillenmesinde görev yapar. *ADAMTS2, 3, 10, 12, 14, 17* ve *19* bu domaini içerir [19].

BMP-1 domaini; *ADAMTS13* karboksi ucunda bu domaini içermektedir [18].



Şekil 1.2: ADAMTS proteazların domain yapısı (Apte'den [20] uyarlanmıştır).

1.3 ADAMTS Proteazların Ekspresyonları

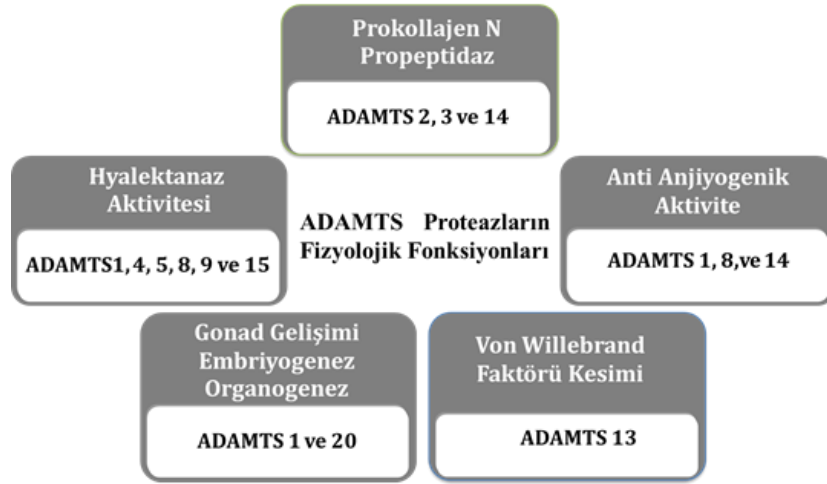
Memelilere ait ADAMTS genlerinin çoğunun erişkin dokularda ekspresyonu düşük seviyelerde yapılmaktadır. Fakat farklı dokulardaki transkripsiyon seviyelerinin northern blot ve RT-PCR analizi ile karşılaştırılması anlamlı sonuçlar vermektedir. Buna göre ADAMTS1, 4 ve 7 ailenin diğer üyelerine göre dokularda nispeten daha çok bulunmaktadır. ADAMTS2, 3 ve 8 ise genellikle düşük seviyelerde bulunmaktadır. ADAMTS5 ve 6 plasentada oldukça fazla eksprese edilmektedir. Tablo 1.1'de insana ait ADAMTS enzimlerinin norma ve malignant dokulardaki ekspresyon analizi detaylı bir şekilde verilmiştir [10].

Tablo 1.1: ADAMTS enzimlerinin farklı dokulardaki ekspresyon analizi [10].

Gen İsmi	Fetal Doku	Normal Erişkin Doku	Malignant Doku
<i>ADAMTS1</i>	Böbrek, akciğer	Kalp, plasenta, karaciğer, iskelet kası, böbrek, tiroid bezi, adrenal medulla, adrenal korteks, mide, uterus, mesane, serviks, aort, kolon, özefagus, ovaryum, prostat, omurilik, kıkırdak	Hücre hatları
<i>ADAMTS2</i>	-	Aort, kemik, deri, tendon, mesane, retina, böbrek, akciğer, barsak, karaciğer, iskelet kası	-
<i>ADAMTS3</i>	-	Plasenta, akciğer, beyin, kalp, deri	-
<i>ADAMTS4</i>	-	Mesane, beyin, ovaryum, kalp, iskelet kası, uterus, mide, omurilik, kıkırdak	-
<i>ADAMTS5</i>	-	Mesane, serviks, özefagus, plasenta, uterus, kıkırdak	-
<i>ADAMTS6</i>	-	Plasenta	-
<i>ADAMTS7</i>	-	Kalp, iskelet kası, böbrek, pankreas, beyin, karaciğer	-
<i>ADAMTS8</i>	Beyin, akciğer, böbrek	Akciğer, kalp, plasenta, beyin	Hücre hatları
<i>ADAMTS9</i>	Beyin, kalp, böbrek, karaciğer, akciğer, iskelet kası, dalak, timus	Kalp, plasenta, akciğer, iskelet kası, böbrek, pankreas, ovaryum, kolon, kıkırdak	-
<i>ADAMTS10</i>	-	Pankreas, kalp, beyin, akciğer, plasenta, karaciğer, böbrek	Hücre hatları
<i>ADAMTS12</i>	Akciğer	Belirlenememiş	Mide kanseri
<i>ADAMTS13</i>	Karaciğer	Prostat, beyin, karaciğer, plasenta, kalp, iskelet kası	-
<i>ADAMTS14</i>	Akciğer	Prostat, beyin, karaciğer, retina, akciğer, plasenta, uterus	Böbrek ve göğüs kanseri
<i>ADAMTS15</i>	Karaciğer, böbrek	---	-
<i>ADAMTS16</i>	Akciğer, böbrek	Beyin, ovaryum, prostat, uterus	-
<i>ADAMTS17</i>	Akciğer	Ovaryum, prostat, beyin, karaciğer	-
<i>ADAMTS18</i>	Akciğer, böbrek	Prostat, beyin, endotel, çenealtı bezi	-
<i>ADAMTS19</i>	Akciğer	---	Osteosarkom
<i>ADAMTS20</i>	-	Testis, prostat, ovaryum, kalp, plasenta, akciğer, pankreas, beyin	Beyin, kolon ve göğüs kanseri

1.4 ADAMTS Proteazların Fizyolojik Fonksiyonları

ADAMTS proteazlar, embriyonik gelişim, anjiyogenez, üreme, kıkırdığın işlenmesi, gibi canlılar için önemli birçok fizyolojik süreçte görev alırlar. ADAMTS'lerin görevleri Şekil 1.3'te şematik olarak özetlenmiştir.



Şekil 1.3: ADAMTS proteazların fizyolojik fonksiyonları [10].

1.4.1 Hyalektanaz Aktivitesi: (ADAMTS1, 4, 5, 8, 9, 15 ve 20)

ADAMTS enzimlerinden bazılarının hücreler arası matrikste bulunan ve kondroitin sülfat proteoglikanları olarak bilinen hyalektanları (agrekan, versikan ve brevikan) işleyebildikleri aydınlatılmıştır. Agrekan, kıkırdak, tendon, aort çeperi, omurga diski ve perinöronal ağda bulunan temel proteoglikandır. Kıkırdakta Tip II kollajeni artırır ve hidrasyonla kıkırdak dokunun basınca karşı dayanıklı olmasını sağlar. ADAMTS ailesinden ADAMTS1, 4, 5, 8, 9 ve 15 agrekanaz aktivitesi göstermektedir. Agrekan diğer başka proteazlar tarafından da işlenir ancak kıkırdaktaki agrekanın, agrekanaz aracılı yıkımı artirit gelişiminin bir göstergesidir. Agrekan, kollajen fibrillerinin kollajenazlar tarafından degradasyonunu önler. Agrekan ve versikanın agrekanaz aracılı kesiminin, tendonun gergin bölgelerinde olduğu kaydedilmiştir. Bunun da dokunun homeostasisi açısından önemli olabileceği düşünülmektedir. ADAMTS4 ve 5 osteoarititte agrekan yıkımında görev alan agrekanazlardır. Farelerde yapılan çalışmalar ADAMTS5'in artan agrekanaz aktivitesinden birinci dereceden sorumlu olduğunu göstermektedir [4].

ADAMTS proteazların çoğu hyalektan versikanı da analog bölgelerden keser. ADAMTS4 ve 5'in merkezi sinir sisteminde bulunan brevikanı kestiği aydınlatılmıştır.

ADAMTS4'ün fibromodulin ve dekorini kestiği gibi *COMP* (*Cartilage oligomeric matrix protein; Kartilaj oligomerik matriks proteinini*)'u kestiği aydınlatılmıştır. ADAMTS proteinazların bu alt grubunun sadece proteoglikanların kesimi ile kısıtlanmış olmaması bu enzimlerin daha geniş bir proteolitik spektruma sahip olabileceğini göstermektedir [4, 5].

1.4.2 Anti-Anjiyogenik Aktivite: (ADAMTS1, 4 ve 8)

Bu alt grubun üyeleri anjiyogenezi de regüle edebilir. Vaskülarizasyon hem tendon patolojisinin hem de artiritin bir özelliğidir ve ADAMTS'ler her iki durum için de düzenleyici proteinler olabilir.

ADAMTS1 ve 8, endotel hücrelerinde, *FGF-2* (*Fibroblast Growth Factor; Fibroblast büyüme faktörü*) ve *VEGF* (*Vascular endothelial growth factor; Vasküler Endotel Büyüme Faktörü*) tarafından indüklenen anjiyogenik etkileri baskılayarak tümörde damar oluşumunu inhibe eder. Bu aktivitenin trombospondin motifleri aracılığıyla sağlandığı düşünülmektedir. Bu etki endotel karakterli hücreler üzerinde geçerli olup, düz kas hücreleri ya da fibroblast hücreleri için geçerli değildir. ADAMTS1'in inhibisyon kapasitesi ADAMTS8'den fazladır. Ayrıca ADAMTS4 mRNA'sının *in-vitro* anjiyogenez modelinde arttığı gösterilmiştir [4].

1.4.3 vWFCP: (ADAMTS13)

vWFCP endotel hücrelerde ve megakaryositlerde sentezlenen bir adhezyon proteindir. vWFCP hem primer hemostazda hem de kan koagülasyon sisteminde önemlidir. Moleküler Faktör VIII, kollajen, heparin ve trombosit glikoproteinleri gibi çeşitli bileşiklerin bağlandığı bölgeler vardır. Molekül üzerindeki bu bağlanma bölgeleri sayesinde zedelenen damar duvarında trombositlerin adhezyonu ve agregasyonunda önemli rol oynar. vWF hastalığı kalıtsal kanama anomalilerin en sık

görülenidir. Çoğunlukla dominant olarak kalıtılan bu otozomal hastalık vWFCP adı verilen multimerik plazma proteininin eksikliği veya fonksiyon bozukluklarına bağlıdır. Trombotik trombositopenik purpura (vW hastalığı) son derece heterojen olup klinik olarak hafif mukozal kanamalardan hemofiliye benzer ağır ölümcül kanama eğilimine kadar farklı şiddette kanama semptomları ile kendini gösterebilir. Yüksek konsantrasyondaki vWF düzeyleri enflamatuvar veya aterosklerotik vasküler hasar durumlarında görülür. ADAMTS13 büyük multimerik vW Faktör öncülünü optimum büyüklükte keser. Bu düzgün bir koagülasyon için gereklidir. ADAMTS13 enzimidaki mutasyonlar, trombotik trombositopenik purpura ile korelasyon göstermektedir [21].

1.4.4 Gonad Gelişimi ve Embriyogenez (ADAMTS1, 9, 20)

ADAMTS9, *C.elegans*'ta aydınlatılan *gon-1(gonadal development)* geni ile yüksek derecede benzerlik göstermektedir. *Gon-1* geni *C.elegans*'ta üreme organları gelişiminde görev yapmaktadır. ADAMTS9'un gonad gelişiminde görevi olup olmadığı henüz aydınlatılmamıştır. Ancak yapılan çalışmalarda özellikle böbrek ve yumurtalık tümörlerinde artış gösterdiği belirtilmektedir. ADAMTS20, trombospondin motiflerinin sayısı bakımından ADAMTS9 ile benzerlik gösterir. Farelerde yapılan çalışmalar, ADAMTS20'nin embriyogenez süresince melanoblastların göçü için gerekli olduğunu göstermiştir.

Farelerde yapılan çalışmalarda ADAMTS1 eksikliğinde, ürogenital sistem gelişimi, organ morfolojisi, fonksiyonu ve dişi fertilitasını etkileyen birçok gelişimsel anomaliler olduğu tespit edilmiştir. Sıçan, fare ve atlarda yapılan çalışmalarda ADAMTS1'in ovulasyonda rolü olduğu tespit edilmiştir [4].

1.4.5 Prokollajen N-propeptidaz (pNP) Aktivitesi: (ADAMTS2, 3 ve 14)

ADAMTS2 fibril oluşturabilen tip I, II III ve V kollajen öncüllerinin amino uçlarını keserek olgun kollajen moleküllerinin oluşturulmasını sağlar. Ciltteki ekspresyonu diğer pNP'lere göre oldukça fazladır. ADAMTS2 genindeki mutasyonların sığır ve insanda *Ehlers-Danlos Sendromu (Tip VIIC)* ve

Dermatosparaxis ile bağlantılı olduğu bulunmuştur. *Ehlers-Danlos Sendromu (Tip VIIC)* çekinik olarak kalıtılan bir bağ doku hastalığıdır. Öncül kollajen uçlarının uygun olmayan bir şekilde işlenmesinden dolayı ortaya çıkmaktadır. Oldukça hassas ve sarkık bir cilt yapısı, eklem yapısında gevşeklik ile belirti göstermektedir. Farelerle yapılan *ADAMTS2* geni susturma çalışmalarında cilt ve eklem yapısında yukarıda bahsedilen benzer semptomlar ve ayrıca erkek farelerde sperm seviyesinin düşmesine bağlı olarak kısır bireylerin olduğu gözlenmiştir. Bu çalışmayla *ADAMTS2*'nin spermatogonyumların olgunlaştırılmasında görev yaptığı aydınlatılmıştır.

ADAMTS3 fibriler kollajen öncüllerinden tip I ve II'yi amino uçlarından keserek olgunlaştırmaktadır. Ciltte *ADAMTS2*'den daha az bulunmasına karşın kıkırdakta *ADAMTS2*'ye oranla 5 kat fazla bulunur.

ADAMTS14, *ADAMTS2*'nin homologudur. Tip I ve II prokollajenleri işler. Özellikle tendonda tip I Prokollajen N-proteinaz olarak görev yapar [4, 22].

1.5 ADAMTS2

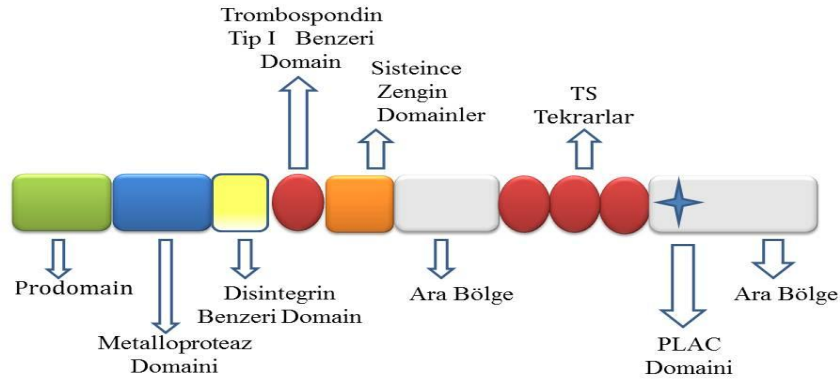
ADAMTS2 geni, birçok dokuya güç ve destek sağlayan kollajen moleküllerine ait öncül proteinlerin (prokollajen) işlenmesinden sorumlu olan enzimi kodlamaktadır. *ADAMTS2* geni 5. kromozomun uzun kolunda (178,473,473bc-178,704,934) lokalize olmuştur.

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 type1 motif,2*, *Procollagen I N-proteinase*, *Procollagen N-endopeptidase*” olarak literatürde geçmektedir [3].

1.5.1 ADAMTS2 Metalloproteinazın Domain Yapısı ve Regülasyonu

ADAMTS2 proteaz, ailenin diğer üyeleriyle benzer bir domain yapısı göstermektedir. Bu domainlere ek olarak ADAMTS3, 10, 12, 14, 17 ve 19'da da bulunan PLAC domainini içermektedir (Şekil 1.4). Bu domain 6 adet sistein içeren bir motiftir.

ADAMTS2 diğer ADAMTS'ler gibi zimojen formda sentezlenir. Sonrasında, furin ya da diğer ilgili enzimler tarafından kesime uğrar, N- ve C- terminal bölgeleri işlenerek tamamen aktif hale getirilir. ADAMTS2 enziminin işlenmesi aktivitesi ve kesim spesifikliği üzerine etkili olan bölgelerin belirlenmesi amacıyla yapılan çalışmalarda her bir domainin görevi aydınlatılmıştır. Buna göre pro-domain kısmı ADAMTS2 enziminin doğru katlanması için gereklidir. Tam bir enzim aktivitesi için prodomain kısmının *furin* tarafından kesilmesi gerekmektedir. C-terminal bölge enzim aktivitesini negatif yönde regüle etmektedir. İki adet bulunan trombospondin tip I tekrarları enzim aktivitesini arttırmaktadır. Tam bir enzim aktivitesi için substratı tanımda ya da bağlamada görev yapmaktadır.



Şekil 1.4: ADAMTS2 geninin domain organizasyonu (Apte'den [20] uyarlanmıştır).

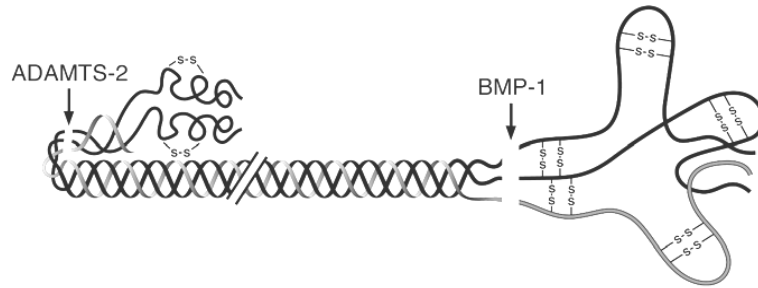
Enzimin 104 kDa'luk formu tip I prokollajen üzerinde en yüksek aminoprokollajen peptidaz aktivitesine sahiptir. Merkezi domainler tip I kollajen öncüllerinin işlenmesi için gereklidir. pNP domaini öncül kollajen moleküllerinin amino uçlarının işlenmesinde negatif regülatör olarak rol oynamaktadır [23].

1.5.2 ADAMTS2 Enziminin Fizyolojik Fonksiyonları ve Hastalıklarla İlişkisi

1.5.2.1 Kollajen Öncüllerinin İşlenmesi

Tip I-III ve V kollajenleri, omurgalılarda hücreler arası matriksin temel fibröz bileşenlerindedir. İkisi birlikte insana ait toplam proteinlerin yaklaşık %30'unu oluşturmaktadır. Monomerik Tip I-V kollajenlerinin her biri ilkin öncül moleküller şeklinde “prokollajen” sentezlenir. Prokollajen molekülleri işlenmiş kollajen monomerlerinden farklıdır. Propeptid olarak bilinen amino ve karboksi terminal peptid uzantıları içerirler (Şekil 1.5).

Yapılan çalışmalar, prokollajen I-V'in amino ve karboksi propeptidlerinin, optimum olarak nötral pH'da ve Ca^{+2} iyonuna bağlı metalloproteinazlar tarafından işlendiğini göstermiştir [3].



Şekil 1.5: Tip I prokollajenin amino ve karboksi propeptidlerinin işlenmesi. Amino uç solda, iki adet pro- α 1 zinciri siyah, tek ve daha kısa olan pro- α 2 gri renklidir [3].

Tip I-V karboksi uçta bulunan propeptitleri, *BMP1/ TRF (Tolloid-related family of astacin-like metalloproteinases; Tolloid Bağlantılı Astasin Benzeri Metalloproteinaz Ailesi)* tarafından işlenir. Amino propeptidlerin ise ADAMTS2 tarafından işlenir. Temel fibriler kollajenlerin, karboksi propeptitlerinin işlenmesindeki defektlere bağlı bir bağ doku rahatsızlığı henüz kaydedilmemiştir. Bunun aksine amino propeptidlerin işlenmesindeki aksaklıkların bir takım kalıtsal

hastalıklara yol açtığı aydınlatılmıştır. Bunlar insanda Ehler–Danlos Sendromu Tip VIIC ve sığırdan tanımlanmış olan Dermatosparaksistir [3].

Oldukça dayanıksız bir cilt ile belirginleşen dermatosparaksis bir bağ doku hastalığıdır. İlk olarak 1967 yılında sığırdan aydınlatılmıştır. Daha sonra ise koyun ve kedide rapor edilmiştir. Lapiere ve diğ. [24] bu hastalığın Tip I prokollajenden amino propeptidlerini kesen bir proteazın miktarındaki azlıktan kaynaklandığını göstermiştir. Bu hastalığa sahip sığırdan dermis anormal kollajen fibrilleri içerir ve prokollajen monomerleri amino propeptidlerini hala taşımaktadır. İnsanda EDS TipVIIC, cildin fiziksel özelliği, eklemler ve kan damarlarındaki defektlerle belirginleşen otozomal resesif kalıtsal bir bağ doku hastalığıdır. Amino propeptidin tutulması aslında fibril oluşumunu engellemez. Ancak oluşan fibriller anormal morfolojiye sahip olmaktadır. Benzer durum dermatosparaksiste de görülmektedir. Bu anormal fibril yapısı normal koşullarda ya da çevresel stres altında dokunun canlılığını sağlayacak gerilme gücünü sağlayamamaktadır [24].

1.5.2.2 Gonad Gelişimi

ADAMTS2 geni susturulmuş farelerde yapılan çalışmalar bu enzim eksikliğinin sadece aşırı dayanıksız bir cilt yapısına değil aynı zamanda spermatogenezde azalma ve kısır erkek bireylerin oluşumuna neden olduğunu da göstermiştir. Bu yüzden *ADAMTS2* enzimi erkek fertilitesi için önem taşımaktadır [25].

1.5.2.3 Anti-Anjiyogenik ve Anti-Tümör Aktivite

ADAMTS2'nin anti anjiyogenik aktiviteye sahip olduğu ve apoptozu indüklediği *in-vitro* ve *in-vivo* yapılan çalışmalarda bulunmuştur. Endotel hücrelerde, VEGF ve FGF-2 stimülasyonu ile *ADAMTS2*'nin anti anjiyogenik aktivitesi gözlenmiştir. Buna karşın aynı koşullar altında fibroblast karakterli hücrelerde benzer etki gözlenmemiştir. *HUVEC* (*Human umbilical vein endothelial cell*; *İnsan kordon endotel hücreleri*) hücreleri model alınarak yapılan bir çalışmada

rekombinant ADAMTS2'nin ortama eklenmesi sonrasında, HUVEC hücreleri tarafından oluşturulan kılcak damar benzeri yapıların azaldığı tespit edilmiştir [26].

Ayrıca literatürde rastlanan bazı çalışmalarda *ADAMTS* [ADAMTS2, Trp795-to-ter] ve kollajendeki [COL1A1, Arg134Cys] bazı mutasyonların anormal dentin oluşumuna neden olduğu kayıt edilmiştir [27].

1.5.3 ADAMTS2 İnhibitörleri

Özellikle antifibrotik tedavi modellerinin oluşturulmasında ADAMTS2 inhibitörleri önemli bir potansiyel oluşturmaktadır. Bu açıdan yeni ADAMTS2 inhibitörleri araştırılmakta ve sentetik inhibitörler de farklı araştırmacılar tarafından sentezlenmektedir [28]. Papilin ilk olarak *Drosophila*'da hücreler arası matrikste bulunan bir glikoprotein olarak aydınlatılmıştır. *Drosophila*'nın gelişim sürecinde özellikle matriksle ilişkili önemli görevlerinin olduğu bulunması *Caenorhabditis* ve memelilerde de araştırılmasını sağlamıştır. *Drosophila*, *Caenorhabditis* ve memelilerde bulunan papilin proteinleri domain organizasyonları bakımından oldukça benzerlik göstermektedir. Papilin ve ADAMTS'ler trombospondin tekrarları ve sisteince zengin domainleri bakımından benzerlik göstermektedir. Yapılan *in vitro* çalışmalarda papilin ADAMTS'lerin yarışmasız inhibitörü olduğu bulunmuştur [29].

Bunun yanısıra, son dönemde, matriksinler olarak bilinen ve omurgalılarda metalloproteinazları inhibe edebilen *TIMP* (*Tissue Inhibitor of Metalloproteinase*) ailesi üyelerinden TIMP-3'ün, ADAMTS2 enziminin endojen inhibitörü olduğu aydınlatılmıştır. TIMP-3 özellikle heparin varlığında ADAMTS2'nin tip II kollajen öncüllerinin işlenmesini inhibe edebilmektedir [30]. EDTA'nın da ADAMTS2 enziminin inhibitörü olduğu belirlenmiştir [23].

1.6 Sitokinler

Sitokinler bitki ve hayvan hücreleri tarafından üretilen, hücrelerin birbirleriyle iletişimini sağlayan, oldukça düşük moleküler ağırlığa sahip protein ve

peptidlerin bir grubudur. Hemen hemen bütün biyolojik süreçlerde görev alırlar. Hücrelere olan etkileri otokrin, parakrin ya da endokrin yollarla olmaktadır. Hücre yüzeyinde bulunan sitokin reseptörleri aracılığıyla görevlerini yaparlar. Yangı (enflamasyon) ve bağışıklık reaksiyonlarında, aktif lenfositler, makrofajlar, endotel, epitel ve bağ dokular tarafından oluşturulurlar. Salımları geçicidir. Yapısal ve fonksiyonel özelliklerine sınıflandırılmaktadırlar. Fonksiyonel özelliklerine göre; (*IL*) *İnterlökinler*, (*IFN*) *İnterferonlar*, (*TNF*) *Tümör Nekroz Faktörler*, (*CSF*) *Koloni stimüle edici faktörler*, *Kemokinler* ve (*TGF*) *Transforme edici büyüme faktörleri* olarak sınıflandırılmaktadır [31, 32].

İnterlökinler: Lökositler tarafından salgılanan ve lökositler arası haberleşmeyi sağlayan sitokinlerdir. Özellikle enflamasyon, hematopoiez, doğal öldürücü hücrelerin üretilmesi için lenfositlerin uyarılması, virus ve mikroplara karşı savunma gibi önemli görevlerde rol oynarlar (IL-1-IL-36) [33].

İnterferonlar: Patojen, virus, mikrop ya da tümörlü hücre varlığına karşı konakçı hücre tarafından salgılanan moleküllerdir. Bu gibi durumlarda bağışıklık sistemini hücrelerini uyararak gerekli savunmanın yapılmasını sağlarlar (IFN- α , IFN- β , IFN- ω , IFN- γ , CFR2-4, CFR2-12) [34].

Tümör nekroz faktörler: Anti-tümör aktiviteye sahip bir sitokin grubudur. Ayrıca apoptozu indüklemesinin yanı sıra başka diğer önemli fonksiyonlarının da bulunduğu aydınlatılmıştır (TNF- α , TNF- β , CD40L, CD27L, CD30L, FASL, 4-1BBL, OX40L, TRAIL) [35].

Koloni stimüle edici faktörler: Özellikle hematopoietik kök hücrelerden, kan hücreleri oluşumunu stimüle eden glikoproteinlerdir (Makrofaj koloni stimüle edici faktör, granülosit koloni stimüle edici faktör, kök hücre faktörü, eritropoietin vb.) [36].

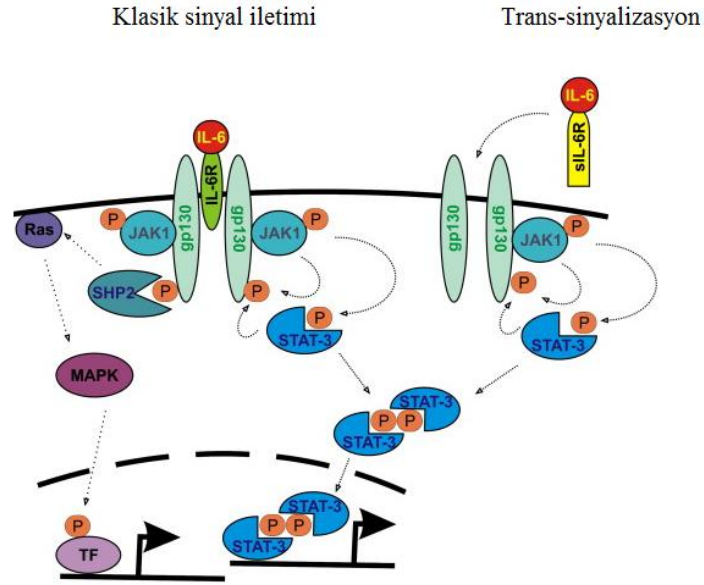
Kemokinler: Kemokinler, enflamasyonda ve homeostazda lökositlere ve kök hücrelere kemotaksi yaptıran sitokinlerdir. Bu grup sitokinler heparin bağlayan proteinlerdir ve lökosit migrasyonunun düzenlenmesi bunun yanı sıra anjiyogenez ve lökosit degranülasyonu gibi süreçlerin de gerçekleşmesine yardımcı olmaktadır. (GCP; granülosit kemotaktik protein, MCP; monosit kemotaktik protein vb.) [37].

Transforme edici büyüme faktörleri: Makrofajlar, beyin hücreleri ve keratinositler tarafından üretilirler. Doku yenilenmesi, hücre farklılaşması, embriyonik gelişim ve bağışıklık sisteminin regülasyonunda rol oynarlar. Bazı spesifik hücre modellerinde onkogenik transformasyonu teşvik edici yönde görev yapmaktadırlar (TGF- α , TGF- β) [38].

1.6.1 IL-6 (İnterlökin-6)

IL-6 özellikle enflamasyon, enfeksiyon, hematopoez ve onkogeneizde görev yapan bir sitokindir. Görevleri bunlarla sınırlı kalmayıp bazı metabolik, rejeneratif ve nöral süreçlerin düzenlenmesinde de rol oynamaktadır. T hücreleri, makrofajlar ve osteoblastlar tarafından salgılanmaktadır.

Hücrelerin klasik IL-6 kaskadı ile stimülasyonunda IL-6 öncelikle hedef hücrenin membranında bulunan IL-6 reseptörüne bağlanır. IL-6'nın reseptöre bağlanması ile *gp130* (*glikoprotein130*) proteini, ligand-reseptör kompleksi ile bağlantıya geçer ve dimerizasyona uğrar. Gp130 proteininin dimerizasyonu *JNK*'ları (*Janus kinazları*) aktive eder. *JNK*'lar gp130'u tirozin rezidülerinden fosforiller. Bu komplekse *SHP-2* (*Src Homology domains containing tyrosin Phosphatase-2*) fosfatazın da katılmasıyla *ras/raf* (*proto-oncogene serine/threonine-protein kinase*) ve *MAPK* (*Mitogen-Activated Protein Kinaz*) kaskadı aktive olur. Buna ek olarak fosforillenmiş olan *STAT* (*Signal Transducer and Activator of Ttranscription factors*) dimerizasyona uğrayarak nükleusa göç eder. Burada ilgili genleri aktive eder [39, 40].



Şekil 1.6: IL-6 sinyal iletim yolu [39].

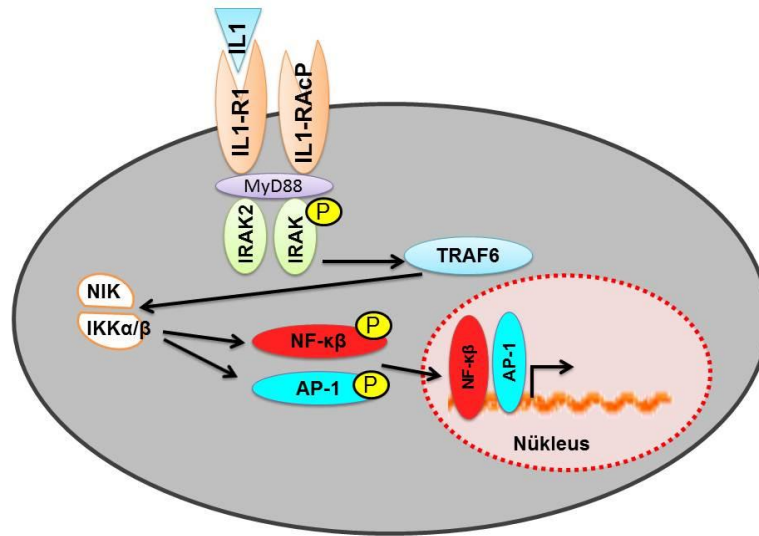
Bazı hücre tiplerinde ise *gp130* bulunmasına karşın IL-6 reseptörü bulunmaz. Bu durumda IL-6 ortamda çözülmüş halde bulunan IL-6 reseptörü ile bağlantıya geçerek kaskadı aktive edebilir. Buna trans-sinyalizasyon adı verilir. IL-6 klasik sinyalizasyon ile hücreleri stimüle ettiğinde hücreler üzerinde rejeneratif ve anti-enflamatuar yönde etki eder (bkz. Şekil 1.6). Trans-sinyalizasyon ile stimülasyon olduğunda etki pro-enflamatuar yöndedir [40].

1.6.2 IL-1 α (İnterlökin-1 alfa)

IL-1 α temelde enflamasyona karşı cevabın oluşturulmasında rol oynayan bir sitokindir. Bunun yanısıra hematopoez gibi birçok metabolik ve fizyolojik süreçlerde de görev yapar. Makrofajlar başta olmak üzere monositler, fibroblastlar ve dendritler tarafından üretilir. Ayrıca B-lenfositlerde, doğal öldürücü hücreler ve epitel hücrelerinde ekspresyonu yapılmaktadır. Fagositler, lenfositler ve diğer bazı bağışıklık sistemi hücrelerinin diapedezine yardımcı olur. Termoregülasyonda görevli hipotalamusu da etkiler. Prostaglandin üretimi, vücut ısısının yükselmesi ve sepsisi teşvik eder. Endojen pirojen olarak bilinmektedir.

IL-1 α çift etkili bir sitokindir. Yani nükleusta transkripsiyonu etkileyerek bir transkripsiyon faktörü gibi görev yaparken, ilgili reseptörlere bağlanarak klasik sitokin görevini de yerine getirmektedir.

IL-1'in reseptör aracılı sinyal iletim yolunda IL-1'in tip I resöptere bağlanmasıyla (IL1-RI) reseptör ile *IL-1RAcP* (*IL-1 Receptor Accessory Protein*) arasında heterodimer oluşur. Sitozolik proteinlerden *MyD88* (*Myeloid Differentiation primary response gene-88*) ve *TollIP* (*Toll-Interacting Protein*) bu komplekse katılır. Bu proteinler bir serin-treonin kinaz olan *IRAK* (*IL-1 Receptor-Associated Kinase*)'ın komplekse katılması için bağlanma yüzeyi oluşturur. Bu kompleks *TRAF6* (*TNF Receptor-Associated Factors-6*)'yı aktive eder. *TRAF6* ise transkripsiyon faktörlerinden NF- κ B (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) ve *AP-1* (*Adaptor protein-1*)'in aktif hale gelmesini sağlar. NF- κ B ve *AP-1* nükleusa geç ederek ilgili genlerin transkripsiyonunu düzenler (Şekil 1.7) [33, 41].



Şekil 1.7: IL-1 sinyal iletim yolu. O'Neill ve Greene'den [41] uyarlanmıştır.

1.7 ADAMTS2 ve Sitokinler

Literatürde ADAMTS2 mRNA ve protein düzeyinde ifadesiyle ilgili yapılan çalışmalara bakıldığında normal dokularda; insana ait; aort, kemik, cilt, tendon,

mesane, retina, böbrek, akciğer, barsak, karaciğer, iskelet kasında ve fibroblast hücrelerinde ekspresyon olduğu bulunmuştur [10]. Ayrıca fare embriyosunda, sığır cilt ve retina hücrelerinde de ADAMTS2'nin ifade olduğu gösterilmiştir [24].

Normal dokularda yapılan çalışmaların yanı sıra kanserli hücrelerde ve bazı model hücre hatlarında da ekspresyon analizleri yapılmıştır. Monositler, CD14++ ve alveolar makrofajlarda glukokortikoid stimülasyonu sonrasında ADAMTS2 ekspresyonunun arttığı bulunmuştur. Makrofajlar bağışıklık sistemi ve doku homeostasisinde önemli fonksiyonlara sahip olduğundan, bu hücrelerde ADAMTS2'nin glukokortikoid aracılığıyla indüklenmesinin, iltihabın çözülmesi ve yara iyileşmesi açısından önemli olduğu vurgulanmaktadır. Bu bulgular *MM6* (*mono Mac6*) ve *THP-1* (*acute monocytic leukemia cell line*) monositik hücre hatları ile de doğrulanmıştır. Aynı çalışmada epitel karakterli A549 (adenocarcinomic human alveolar basal epithelial cells), calu-3 (lung adenocarcinoma), Colo320 (human colon adenocarcinoma), BT-20 (mammary gland/breast carcinoma) ve fibroblast karakterli MRC-5 (human fetal lung fibroblast cells), WI-38 (human fibroblast-like fetal lung cell) hücre hatlarında glukokortikoid indüklenmesi sonucunda dikkate değer bir farklılık gözlenmemiştir [42].

Yapılan diğer bir çalışmada osteosarkoma modeli olan *MG-63* hücre hattında ADAMTS2'nin mRNA düzeyinde ifade olduğu, gösterilmiş ayrıca, *TGF-β1* stimülasyonu ile doza ve zamana bağlı olarak 8 kat arttığı bulunmuştur [43].

Göz retinal pigment epitel hücre modeli olan ARPE-19 ile yapılan çalışmalarda TNF-α stimülasyonu sonrasında ADAMTS2 mRNA ve protein düzeyinde artış olduğu aydınlatılmıştır. Bu çalışma enflamasyon kökenli göz hastalıkları ve retinal matriks yapısının düzenlenmesi açısından önem taşımaktadır [44].

1.8 Çalışmanın Amacı

Organizma için oldukça önemli görevleri üstlenen *ADAMTS2* geninin kendi regülasyonunun nasıl olduğu henüz bilinmemektedir. Transkripsiyonel regülasyonun, genin en önemli regüle edildiği basamak olduğu dikkate alındığında *ADAMTS2*

promotörün nasıl regüle edildiği, bazal transkripsiyonu kontrol eden önemli transkripsiyonel aktivatörleri ya da baskılayıcıları hakkında literatürde herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Bu çalışma ile *ADAMTS2*'nin osteosarkom hücre modelinde transkripsiyonel regülasyonunun aydınlatılması amaçlanmaktadır. Çalışmada transkripsiyonel aktivitenin belirlenmesinde Saos hücreleri kullanılacaktır. *ADAMTS2*'nin bu hücrelerde mRNA ve protein düzeyinde ifade olduğu ilk defa bu çalışma ile belirlenmiştir. Bu anlamda transkripsiyonel aktivitenin çalışması için uygun bir model olarak tespit edilmiştir. Klonlanan promotör parçaları Saos hücrelerine geçici transfeksiyon ile aktararak transkripsiyonel aktivite çalışmaları yapılacaktır.

Promotor bölgesinin biyoinformatik analizi yapılarak transkripsiyon faktörü bağlanma bölgeleri belirlenecektir. Fonksiyonel olarak bağlanmanın olup olmadığı EMSA çalışmaları ile belirlenecektir.

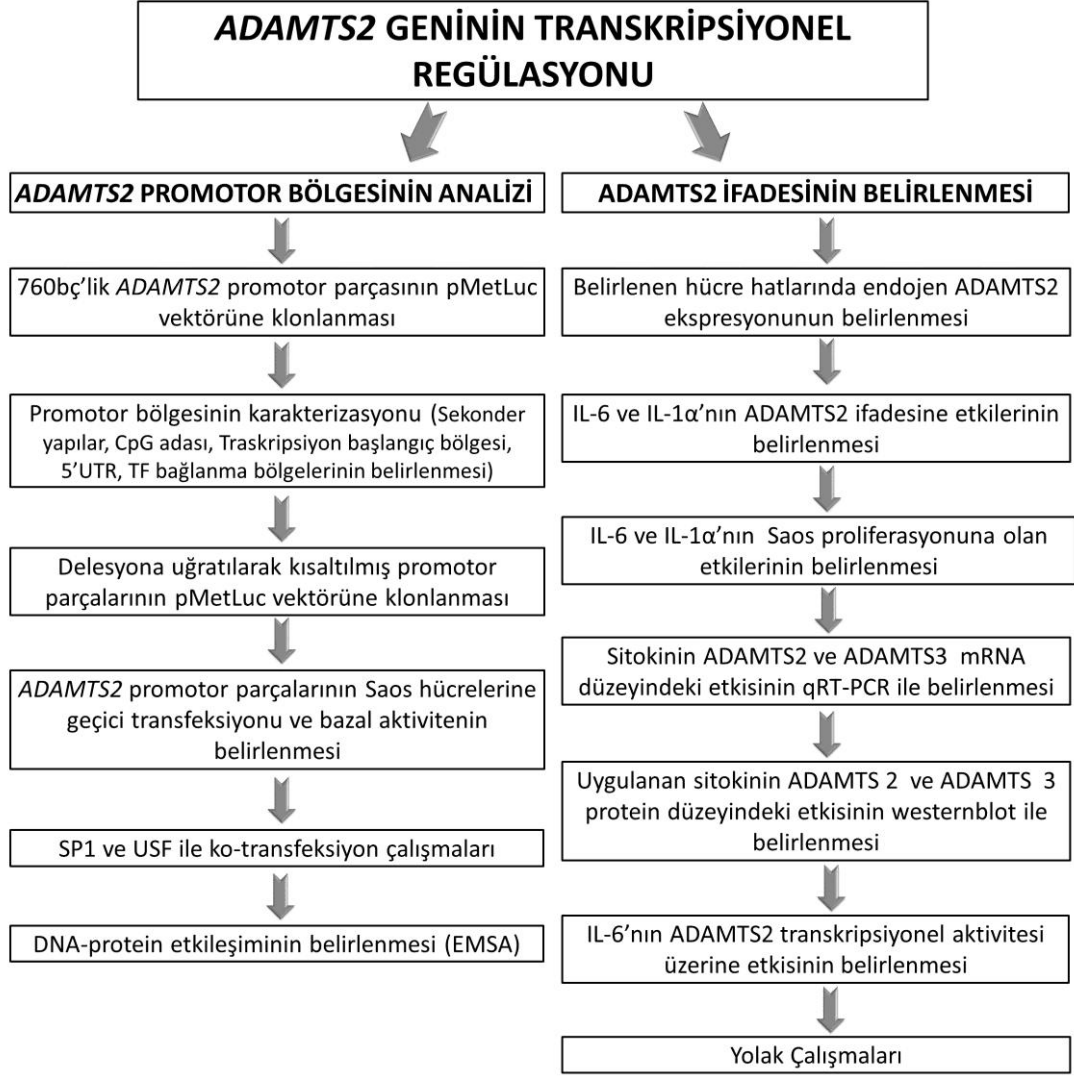
Genin mRNA ve protein seviyesindeki değişikliklerin belirlenmesi çalışmanın diğer bir basamağını oluşturmaktadır. Bu amaçla model olarak seçilen Saos hücrelerinde ve benzer model olarak seçilen MG-63 hücrelerinde enflamasyon sitokinleri olan IL-1 α ve IL-6'nın *ADAMTS2* mRNA ve protein seviyesine olan etkileri kantitatif Real-time PCR ve western blot ile belirlenecektir. *ADAMTS2* gibi kollajenin amino ucunun işlenmesinde görevli olan *ADAMTS3* için de ekspresyon düzeyindeki bu çalışmalar tekrarlanarak elde edilen sonuçlar karşılaştırılmalı olarak değerlendirilecektir.

Yapılan bu çalışmalar genin normal ve patolojik durumlarıdaki ekspresyonun regülasyonunun anlaşılmasına ışık tutacaktır. Planlanan çalışma basamaklarına aşağıda detaylı olarak değinilmiştir. Şekil 1.8 çalışma basamaklarını özetlemektedir.

Çalışma basamakları özetlenecek olursa;

- (i) İnsan *ADAMTS2* promotörünün genomik DNA'dan PCR'a dayalı strateji ile pGEM-TEasy (T:A klonlama) vektör sistemine klonlanması.

- (ii) Transkripsiyonel aktivitenin en aktif olduğu bölgeyi bulmak amacıyla delesyona uğratarak kısaltılmış promotor parçalarının hazırlanması ve transkripsiyonel aktivitenin belirlenmesi için kullanılan bir haberci sistem olan pMet-Luc lusiferaz vektör sistemine alt klonlanması.
- (iii) Geçici transfeksiyon analizleri ile promotor parçalarının bazal aktivitelerinin belirlenmesi. Transkripsiyonel anlamda en aktif bölgenin belirlenmesi.
- (iv) İnsan *ADAMTS2* promotorunda transkripsiyon faktörü bağlanma bölgelerinin biyoinformatik olarak belirlenmesi. *ADAMTS2* promotor bölgesinin diğer türler ile karşılaştırılması, sekonder yapı ve GC adası analizlerinin yapılması.
- (v) Promotor bölgesine bağlanması muhtemel bazı transkripsiyonel faktörleri için DNA-protein etkileşiminin belirlenebilmesi amacıyla EMSA çalışmalarının yapılması.
- (vi) *ADAMTS2*'nin farklı hücre hatlarındaki ifadesinin belirlenebilmesi amacıyla ilave farklı kanser ve hücre modellerinde RT-PCR'a dayalı yöntem ile *ADAMTS2* mRNA seviyesinin belirlenmesi
- (vii) IL-1 α ve IL-6 sitokinlerinin, *ADAMTS2* ve *ADAMTS3* mRNA düzeyine olan etkilerinin belirlenmesi amacıyla, osteosarkoma modeli olan Saos ve benzer model olarak seçilen MG-63 hücre hatlarında qRT-PCR analizlerinin yapılması.
- (vi) IL-1 α ve IL-6 sitokinlerinin *ADAMTS2* ve *ADAMTS3* protein seviyesine olan etkilerinin western blot analizi ile belirlenmesi.
- (vii) IL-6'nın *ADAMTS2* transkripsiyonel aktivitesine etkisinin belirlenmesi.
- (viii) Saos hücrelerinde IL-6 stimülasyonunu takiben STAT sinyal iletim yolunun ve *ADAMTS2* protein düzeyinin analizi.



Şekil 1.8: Çalışma basamaklarını özetleyen akış diyagramı.

2. MATERYAL ve METOT

2.1 Materyal

2.1.1 Kullanılan Kimyasallar

Hücre kültürü, transkripsiyonel aktivite, DNA, RNA, protein, DNA-protein etkileşimi ve yolak çalışmalarında kullanılan malzemelerin listesi Tablo 2.1’de belirtilmiştir.

Tablo 2.1: Çalışmalarda kullanılan malzemeler ve temin edildikleri firmaların listesi.

Bakteri Çalışmalarında Kullanılan Malzemeler	
Luria Broth(LB), LB agar	Sigma
SOC (Super Optimal Broth)	Invitrogen
Amfisilin, kanamisin	Sigma, Merck
Plasmid Maxi Prep Kit	Thermo, Roche
Plasmid Mini Prep Kit	Thermo
Gliserol, CaCl ₂	Sigma
DNA Çalışmalarında Kullanılan Malzemeler	
Restriksiyon endonükleaz enzimleri	Fermentas, NEB
T4 DNA ligaz, proteinaz K, Alkalen fosfataz	Fermentas
Amonyum asetat, SDS	Sigma
pMetLuc vektör sistemi	Clontech
pGEM-T Easy vektör sistemi	Promega
<i>Taq</i> DNA polimeraz, dNTP karışımı	Fermentas
Agaroz, Et-Br	Sigma
Hücre Kültürü Çalışmalarında Kullanılan Malzemeler	
Dulbecco’s Modified Eagle’s Medyum (DMEM)	Gibco
Roswell Park Memorial Institute Medyum (RPMI)	Gibco

Tablo 2.1'in devamı

Fetal Sığır Serumu (FCS)	Sigma
IL-1 α ve IL-6 sitokinleri	Cell Signalling Tech.
Fosfat tamponu tabletleri (PBS)	Sigma
Dimetilsülfoksit (DMSO)	Merck
Tripan mavi solüsyonu	Sigma
Sığır Serum Albumini (BSA)	Sigma
L-glutamin, Tripsin-EDTA	Sigma
Transkripsiyonel Aktivite Çalışmalarında Kullanılan Malzemeler	
Ready-To-Glow Secreted Luciferase Rep. Assay	Clontech
Lusiferaz ve Seap Substratları	Clontech
4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES)	Sigma
Fugene	Roche
RNA Çalışmalarında Kullanılan Malzemeler	
GeneJET™ RNA Purification Kit	Fermentas
Diethylpyrocarbonate (DEPC)	Sigma
3-(N-morpholino) propanesulfonic acid (MOPS)	Merck
Formaldehit, B-Merkaptoetanol	Sigma
SYBR® Green PCR Master Mix	Sigma
Reverse Transkriptaz	Fermentas
Protein Çalışmalarında Kullanılan Malzemeler	
Tris, Borik Asit, EDTA	Sigma
Tetramethylethylenediamine (TEMED)	Sigma
Amonyum persülfat	Merck
PVDF Membran	Millipore
ADAMTS2 antikoru	Sigma, Abcam
ADAMTS3 antikoru	Abcam
β -Aktin Antikoru (A5441) (Ab8227)	Sigma, Abcam
Sekonder antikör (goat, anti-rabbit) (Ab97069)	Abcam
Sekonder antikör (goat, anti-mouse) (sc-2005)	Sigma

Tablo 2.1'in devamı

Alexa Fluor 488 sekonder antikor,anti-rabbit	Invitrogen
Proteaz inhibitör tabletleri	Roche
Page ruler plus prestained protein ladder (26616)	Thermo
ECL (Electrochemiluminescence) Kit	Pierce
X-Ray Film	Kodak
DNA-Protein Etkileşimi (EMSA) Çalışmalarında Kullanılan Malzemeler	
Biotin 3' End DNA Labeling Kit	Pierce
LightShift® Chemiluminescent EMSA Kit	Pierce
Nylon Membran	Pierce
Yolak Çalışmalarında Kullanılan İnhibitörler	
Wortmannin	Cell signalling
MEK İnhibitörü	Sigma
SP600125 JNK İnhibitörü	Sigma

2.1.2 Kullanılan Araç-Gereçler

Tablo 2.2: Kullanılan araç-gereçler ve satın alındıkları firmaların listesi.

Kullanılan Araç-Gereçler	Modeli
-86 °C Derin Dondurucu	Thermo
CO ₂ 'li İnkübatör	Nuair
Laminar Air Flow	Telstar BIOII, İspanya
Mikroskop	Nikon Eclipse
Buz Makinesi	Fiocchetti Frigoriferi Scientifici, İtalya
Buzdolabı	Profilo, Türkiye
Çalkalamalı İnkübatör	Shel-Lab, USA
Elektroforez	Apelex, İngiltere
Elektronik Tartı	Sartorius, Almanya
Etüv	WTB, German, Nüve, Türkiye
Isıtmalı Manyetik Karıştırıcı	Velp Scientifica, İspanya

Tablo 2.2'nin devamı

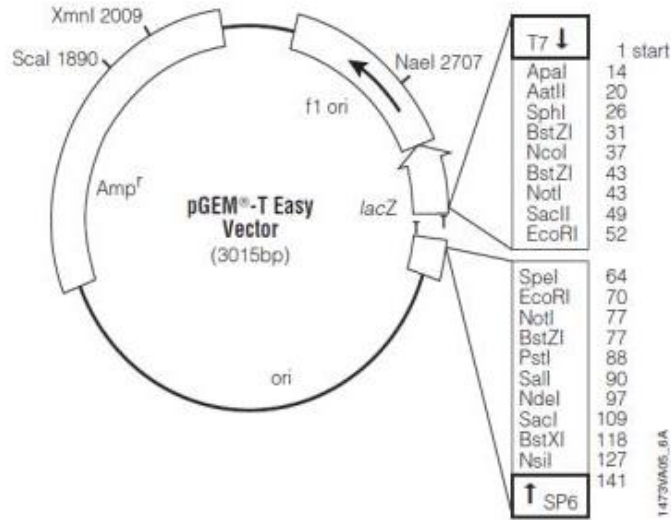
Light Cyclers 485	Roche Diagnostics
Otoklav	Hirayama, Japonya
Thermocycler	Techne Progene, İngiltere
pH Metre	WTW, Almanya
Qubit Florimetre	Invitrogen
Jel görüntüleme sistemi	Bioimaging Systems
Saf su cihazı	Destilasyon 3.1 (Comecta Sa,)
MikroSantrifüj	Sigma Laborzentrifugen, Germany
Santrifüj	Hettich Zentrifugen, Germany
SDS PAGE Aparatları	BioRad
Horizantal Çalkalayıcı	GFL, Almanya
Elektroforez için Güç Kaynağı	Consort, İngiltere
Sıcak su banyosu	Elektro-mag, Türkiye
Isı kontrollü çalkalamalı etüv	GFL , Almanya
Isıtıcı blok	FALC, İtalya
UV visible Spektrofotometreler	Thermo
Vorteks	Elektromag, Türkiye
Pipetler	Finnpipette, Eppendorf
Luminometre	Thermo

2.1.3 Bakteriyel Hücre Soyları

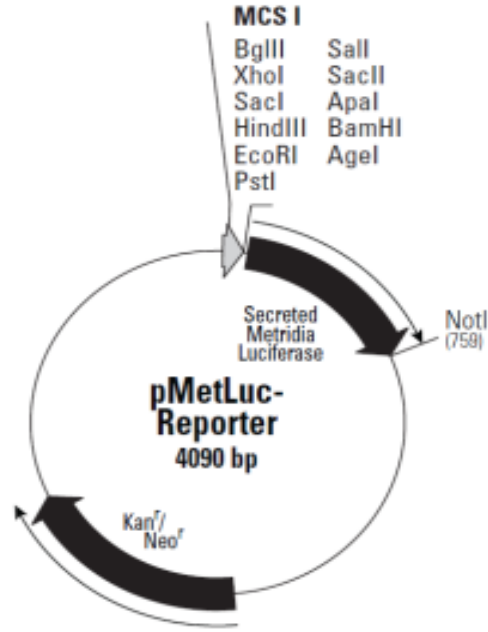
Klonlama ve stok amaçlı *E.coli DH5 α* (SupE44 Δ lacU169 (Φ 80 LacZ Δ M15) hsdR17recA1 endA1 gyrA96 thr-1 rI A1) ve *XL-1Blue* süper kompetent (recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacIqZ Δ M15 Tn10 (Tetr)]) soyu kullanıldı.

2.1.4 Çalışmada Kullanılan Plazmitler

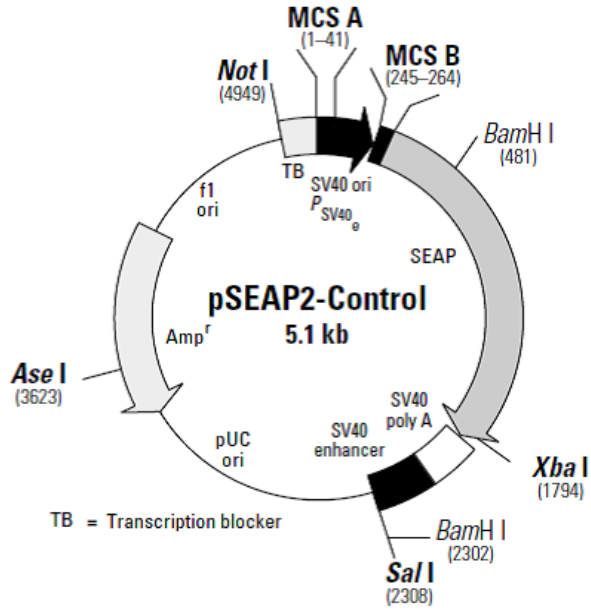
ADAMTS2 promotorunun belli büyüklükteki parçalarının klonlaması amacıyla pGEM-T Easy (Promega) vektör sistemi kullanıldı (Şekil 2.1). Promotor parçalarının bazal aktivitelerinin belirlenmesi amacıyla bu promotor parçaları alt klonlamayla haberci gen vektörü olarak pMetLuc Reporter'a klonlandı (Şekil 2.2). Transfeksiyon çalışmalarının normalizasyonu amacıyla pSEAP2 kontrol vektörü kullanıldı (Şekil 2.3). Bu vektör tüm transfekte edilen kuyucuklara 0,5 µg olacak şekilde transfekte edildi. Bazı transfeksiyon çalışmalarında normalizasyon amacıyla β galaktozidaz haberci vektörü kullanıldı. Bu vektör Dr. Dipak Ramji'den (Cardif Üniversitesi) temin edildi (Şekil 2.4). Transfeksiyon etkinliğini genel olarak gözlemlemek için pozitif kontrol olarak pMetLuc Kontrol vektörü kullanıldı (Şekil 2.5).



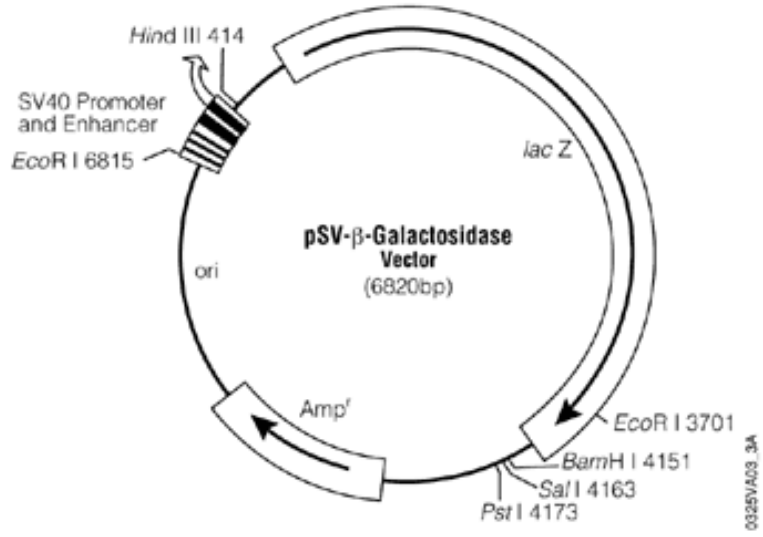
Şekil 2.1: pGEM-T Easy (Promega) vektör haritası ve klonlama bölgeleri.



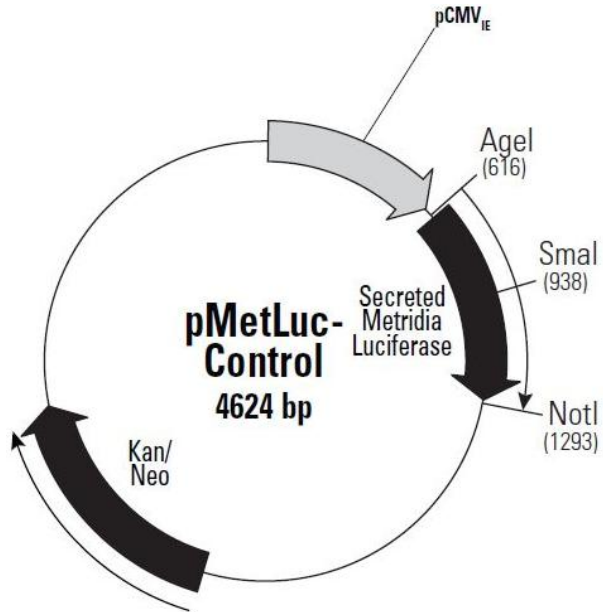
Şekil 2.2: pMetLuc-Reporter (Clontech) vektör haritası ve klonlama bölgeleri.



Şekil 2.3: pSEAP2-Kontrol (Clontech) vektörü haritası.



Şekil 2.4: pSV-β-Galaktozidaz vektörü haritası.



Şekil 2.5: pMetLuc Kontrol vektörü (Clontech) haritası.

2.1.5 Kullanılan Solüsyonlar

2.1.5.1 DNA Çalışmalarında Kullanılan Solüsyonlar

Tablo2.3: Genomik DNA izolasyonunda kullanılan solüsyonlar.

Proteinaz K (10mg/ml)	0,01 g Proteinaz K, 1 ml dH ₂ O'da çözüldü. -20 °C'de muhafaza edildi.
Satüre Amonyum Asetat (NH₄Ac)	74 g NH ₄ Ac, dH ₂ O ile 100 ml'ye tamamlandı. Manyetik karıştırıcıda yaklaşık 40 °C'de çözülüp filtrasyon ile steril edildi. +4 °C'de muhafaza edildi.
Nüklei Lizis Buffer	10 mM Tris Base, 400 mM NaCl, 2 mM EDTA dH ₂ O'da çözülüp pH: 8,2'ye ayarlandı. 121 °C'de 20 dakika otoklavlanarak steril edildi. +4 °C'de muhafaza edildi.

Tablo2.4: DNA agaroz jel elektroforezinde kullanılan çözeltiler.

5X/L Tris-Borik Asit-EDTA (TBE) tamponu pH: 8,00	54 g Tris Base, 27,5 g Borik Asit, 20 ml 0,5 M EDTA (pH:8,00) tartıldı. Üzeri dH ₂ O ile 1 L'ye tamamlandı.
0,5X/L TBE Tamponu pH: 8,00	5X/L TBE tamponu 10 kat sulandırılarak pH'sı ayarlanıp otoklavlandı
DNA Ladder	100 µl DNA ladder (1 hacim), 200 µl yükleme boyası (2 hacim) ve 200 µl steril distile suda (2 hacim) çözülerek hazırlandı.
Etidyum Bromür Stok Solüsyonu	10 mg/ml olacak şekilde steril dH ₂ O ile hazırlandı Koyu renkli ışık geçirmeyen bir şişede muhafaza edildi.

2.1.5.2 Hücre Kültürü Çalışmalarında Kullanılan Solüsyonlar

Stok MTT ((3-(4,5- dimethylthiazolyl-2)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide) Solüsyonu: Toz olarak temin edilen MTT, son konsantrasyonu 5 mg/ml olacak şekilde steril PBS içinde bir gece boyunca magnetik karıştırıcıda karıştırılarak çözüldü. 0,22 µm'lik filtre ile steril edilerek kullanıldı. 2-8 °C'de muhafaza edildi. MTT testinde oluşan formazan kristallerini çözmek için kullanılan izopropanol son konsantrasyonu 0,004 M HCl içerecek şekilde hazırlandı.

PBS (Phosphate Buffered Salin) Tamponu: 100 ml'ye 1 adet tablet PBS eklerek çözüldü. 121 °C'de 20 dakika otoklavlanarak steril edildi. +4 °C'de muhafaza edildi.

Tripsin-EDTA (T.E) Tamponu: %0,05 Trypsin ve 0,5 mM EDTA 1X PBS içerisinde çözümlenerek hazırlandı. 121 °C'de 20 dakika otoklavlanarak steril edildi. +4 °C'de muhafaza edildi.

2.1.5.2.1 Hücre Kültürü Çalışmalarında Kullanılan Hücre Hatları

Çalışmada kullanılan Saos ve MG-63 (İnsan osteosarkoma) hücreleri Cardiff Üniversitesi (İngiltere) öğretim üyesi Dr. Kenneth Wann ve Dr. Deborah Mason'dan, PC-3 ve DU-145 (insan prostat kanseri) hücreleri, MCF-7 (insan meme kanseri) hücreleri Ege Üniversitesi Biyomühendislik Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Kemal S. Korkmaz'dan, HL60 (insan myeloid lösemi) hücreleri ve HT-29 (insan kolon kanseri) hücreleri Ege Üniversitesi Biyomühendislik Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. İsmet D. GÜRHAN'dan, insan endometrial adenokarsinoma hücreleri olan Ishikawa hücreleri ise Çapa Tıp Fakültesi öğretim üyesi Prof. Dr. Ayhan Bilir'den temin edildi.

2.1.5.3 Transkripsiyonel Aktivite Çalışmalarında Kullanılan Solüsyonlar

Tablo 2.5: Salınan sistemle yapılan geçici transfeksiyon deneylerinde kullanılan tampon ve çözeltiler.

2 mM CaCl₂	14,7 g CaCl ₂ , 50 ml'ye distile su ile tamamlandı. Otoklavlandıktan sonra filtre edilip +4 °C' de muhafaza edildi
2X HEPES	1,6 g NaCl, 0,04 g Na ₂ HPO ₄ , 1,3 g HEPES dH ₂ O ile 100 ml'ye tamamlandı. pH: 7,05–7,12 aralığında olmalıdır. Otoklav yapılarak filtre edildi ve -20 °C' de muhafaza edildi.

Tablo 2.6: Lusiferaz, SEAP ve β-Galaktozidaz aktivitesinin ölçümünde kullanılan tampon ve solüsyonlar.

10X Substrat Solusyonu	Liyofilize durumdaki substrat, substrat tamponu ile çözüldü
1X Substrat/Reaksiyon Tamponu	10X substrat solusyonu, reaksiyon tamponu ile 10 kat sulandırılıp her ölçüm için 5 µl kullanıldı.
1X Dilüsyon Tamponu	5X dilüsyon tamponu dH ₂ O ile 5 kat sulandırılarak her bir örnek için 75 µl kullanıldı.
2X Assay Buffer	120 mM Na ₂ HPO ₄ , 80 mM NaH ₂ PO ₄ , 2 mM MgCl ₂ , 100 mM β-merkaptoetanol, 1,33 mg/ml ONPG

2.1.5.4 RNA Çalışmalarında Kullanılan Tampon ve Çözeltiler

2.1.5.4.1 Formaldehit-Agaroz Jel Elektrofrezisi Tamponları

RNA çalışmalarında kullanılacak olan tamponların tamamı RNaz içermeyen su ile hazırlandı. Kullanılan suyun RNaz'dan arındırılması için 0,1 ml Dietilpirokarbonat (DEPC), 100 ml dH₂O' da çözülüp 37 °C'de 12 saat bekletildikten sonra 121 °C'de 20 dakika otoklavlandı. Formaldehit Agaroz Elektrofrezisi jel tamponu ve tank tamponu Tablo 2.7 ve Tablo 2.8'de gösterildiği şekilde hazırlandı.

Tablo2.7: Formaldehit agaroz jel elektrofrezisi jel tamponu.

FA jel tamponu	Stok Sol.	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 hazırlanıp pH: 7,0'ye ayarlandı. Otoklavlanarak steril edildi.		

Tablo2.8: FA jel elektrofrezisi tank tamponu.

FA Tank Tamponu	Son Konsantrasyon
10X FA Jel Tamponu	1X
%37 'lik (12,3 M) Formaldehit	0,25 M
DEPC 'li dH ₂ O	1 L'ye tamamlandı.

2.1.5.5 Protein Çalışmalarında Kullanılan Tampon ve Çözeltiler

Tablo 2.9: Western blot çalışmalarında kullanılan tampon ve çözeltiler.

Laemli Tamponu	0,125 M Tris-HCl (pH:6,8), %4 (w/v) SDS, %10 (v/v) Gliserol, %10 (v/v) β -Merkaptoetanol
NP-40 Tamponu	20 mM Tris pH:7,4, 150 mM NaCl, Complete mini, EDTA free protease inhibitor coctail tablets, 2 mM EDTA, %1 NP-40
Bromfenol Mavisi Solüsyonu	%0,05 (w/v) bromfenol mavisi distile su içinde çözülerek hazırlandı.
Yükleme Boyası	1,4 gr Tris, 4 gr SDS, 20 gr Sükroz, 4 mg bromfenol mavisi, pH:6,8'e ayarlanarak 100 ml'ye tamamlandı.
SDS PAGE Ayırma Jeli Tamponu	1,5 M Tris-HCl (pH:8,8), %10 (w/v) SDS
SDS PAGE Yığıma Jeli Tamponu	1 M Tris-HCl (pH:6,8), %10 (w/v) SDS
SDS PAGE Yürütme Tamponu	25 mM Tris, 250 mM Glisin, %0,1 (w/v) SDS
Boyama Çözeltisi	0,25 g Coomassie Brilliant Blue 250, 100 ml %95'lik Etanol, %10 Asetik Asit
Arıtma Çözeltisi	Hacimce %7,5 Asetik Asit, %5 Metanol ve %87,5 distile su
Western Blot Transfer Tamponu	25 mM Tris, 192 mM Glisin, %20 (v/v) Metanol
10X Tris Buffered Saline (10X TBS)	10 mM Tris-HCl, 20 mM NaCl, pH: 7,4
Stripping Tamponu	1 M Glycine, %1 SDS, pH: 2,5
Film Yıkama Tamponu	3,5 L su içerisine 1,25 L A solüsyonu 125 ml B solüsyonu, 125 ml C solüsyonu eklenerek hazırlandı.
Fiksator Tamponu	1,4 L su içerisine 500 ml A solüsyonu ve 50 ml B solüsyonu eklenerek hazırlandı.
Ponceau Boyası	10 ml saf su içerisine 300 μ l glasiyel asetik asit, 0,033 g Ponceau boyası koyuldu. Saf su ile 30 ml'ye tamamlandı.

2.1.5.6 DNA-Protein Etkileşimi (EMSA) Çalışmalarında Kullanılan Tampon ve Çözeltiler

Tablo 2.10: EMSA çalışmalarında kullanılan tampon ve çözeltiler.

TEN	40 mM Tris-HCl, pH: 7,5, 1 mM EDTA, 150 mM NaCl
A Tamponu	10 mM HEPES pH: 7,9, 10 mM KCl, 1,5 mM MgCl ₂ , 0,5 mM PMSF, 0,5 mM DTT, 1 µg/ml Tip I soya fasülyesi tripsin inhibitörü
C Tamponu	20 mM HEPES pH: 7,9, 420 mM NaCl, 1,5 mM MgCl ₂ , 0,2 mM EDTA, %25 gliserol 0,5 mM DTT, 0,5 mM PMSF 1 µg/ml pepstatin A, 10 µg/ml aprotinin, 10 µg/ml leupeptin, 10 µg/ml Tip I soya fasülyesi tripsin inhibitörü

2.1.6 Dizi Analizlerinde Kullanılan Primerler

Tablo 2.11: Ligasyonların kontrolü amacıyla tasarlanan pMetLuc dizileme primeri.

Primerin Adı	T_m (°C)	Uzunluk (bç)	Primer Dizisi (5'- 3')
pMetLuc Dizileme Primeri	68°C	23bç	5'-AGTTATTACTAGCGCTAC CGGAC - 3'

2.2 Metod

2.2.1 Bakteri Çalışmaları ile İlgili Teknikler

2.2.1.1 Katı ve Sıvı Besiyerinin Hazırlanması

Sıvı besiyeri olarak Luria Broth (LB) ve Super Optimal Broth (SOC) üretici firma tarafından belirtilen miktarda dH₂O'da çözüldü. 121 °C'de 20 dk otoklavlanarak steril edildikten sonra kullanıldı.

Katı besiyeri olarak kullanılan LB agar belirtilen miktarda dH₂O'da çözüldü. 121 °C'de 20 dk otoklavlanarak steril edildikten sonra 50 °C'ye kadar soğuması beklendi. Amfisilin, son konsantrasyonu 100 µg/ml ve kanamisin, son konsantrasyonu 30 µg/ml olacak şekilde eklenerek karıştırıldıktan sonra bek alevi yanında petri kaplarına dökülerek katılaşması beklendi. Petrilerin etrafı parafilmlelenerek +4 °C'de buzdolabında ters çevrilerek ve ışık almayacak şekilde muhafaza edildi.

2.2.1.2 Bakteri Önkültürün Hazırlanması

Bakteri önkültürünün hazırlanması için; tek koloniden veya daha önceden hazırlanmış gliserol stoktan öze yardımıyla alınan örnekler LB sıvı besiyerine alev yanında aşılandı. 16 saat süresince 37 °C'ye ayarlanmış çalkalamalı etüvde inkübasyona bırakılarak istenilen yoğunluğa gelmesi sağlandı.

2.2.1.3 *E.coli*, *DH5α* Hücrelerinin Kompetan (Alıcı) Hale Getirilmesi

Klonlamada kullanılacak *DH5α* hücreleri bir gece önceden 10 ml LB sıvı besiyerine tek koloni düşecek tarzda ekildi ve 37 °C'de 16 saat inkübasyona bırakıldı. Hazırlanan önkültürün 5 ml'si, 100 ml'lik hacimde taze LB sıvı besiyeri içerisine inoküle edildi. 600 nm dalga boyunda ölçülen absorbans değeri 0,5-0,6

arasına ulaşınca bakteri süspansiyonu 4 °C’de, 3000 rpm’de 5 dk santrifüjlendi. Üst sıvı uzaklaştırıldı. Bakteri pelleti, 100 ml, 0,1 M CaCl₂ solüsyonu ile karıştırılarak dikkatlice pastör pipeti yardımıyla çözüldü. 25 dk buz üzerinde beklemeye bırakıldı ve sonra 4 °C’de 3000 rpm’de 5 dk santrifüjlendi. Üst sıvı uzaklaştırıldı. Hücre pelleti başlangıç hacminin 1/10’i kadar hacimde 0,1 M CaCl₂ ile çözüldü ve 1-4 saat buz üzerinde bekletildi. Eşit hacimde %40’lık gliserol eklenerek dikkatlice karıştırıldı. Ependorflara paylaştırılarak -80 °C’de derin dondurucuda muhafaza edildi [45].

2.2.1.4 Transformasyon

Kompetan hücreler -80 °C’den çıkarılarak buza koyuldu ve çözümlenmesi beklendi. Transformasyon tüpüne 5 µl ligasyon reaksiyonu ve 50 µl kompetan hücre eklendi. Buzda 40 dk inkübasyona bırakılan hücreler daha sonra 42 °C’ye ayarlanmış su banyosunda 90 saniye çalkalanmadan tutularak ısı şokuna tabi tutuldu. Takiben 2 dk buzda bekletildi. Bu sürenin bitiminde, önceden 37 °C’ye ılıtılmış olan LB medyumdan 950 µl eklendi ve 1,5 saat 37 °C’de çalkalamalı inkübatörde bırakıldı. Transformasyon kültürünün 150-200 µl’si petrilere yayıldı. Artan transformasyon kültürü 3000 rpm’de 5 dk santrifüjlenip, 100 µl LB medyumda çözülmek suretiyle diğer bir petriye yayıldı. Daha sonra petrilere ters çevrilerek 37 °C’deki inkübatörde hücrelerin büyümesi için 16-24 saat inkübasyona bırakıldı [46]. Oluşan kolonilerin rekombinant olup olmadığı bu kolonilerden izole edilen plazmitin restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesimi sonrasında belirlendi.

2.2.1.5 Gliserol Stok Hazırlanması

İlgili antibiyotiği içeren LB medyuma tek koloniden ekim yapılarak önkültür hazırlandı. Bek alevi yanında steril ependorflara önkültür paylaştırıldı. Eşit hacimde %30’luk steril gliserol tüplere eklenerek -80 °C’de muhafaza edildi [47].

2.2.1.6 Küçük Ölçekli Plazmit DNA İzolasyonu

İzole edilecek plazmiti içeren bakteri stoklarından 6 ml'lik önkültür hazırlandıktan sonra 8000 rpm'de 5 dk süresince hücreler santrifüjlendi. Üst kısımda kalan besiyeri dikkatlice bir pipet yardımıyla alınarak atıldı. Tüpte kalan bakteri hücre pelletinden GeneJET plazmit mini preperasyon kitinde (Fermentas) belirtilen işlem basamaklarına göre plazmit DNA izole edildi [48]. Florimetrik ya da spektrofotometrik miktar ve saflık tayini yapılarak agaroz jel elektroforezinde görüntülendi.

2.2.1.7 Büyük Ölçekli Plazmit DNA İzolasyonu

Transfeksiyon çalışmalarında kullanılacak yüksek konsantrasyonda ve saflıkta ayrıca endotoksinleri içermeyen plazmit DNA'nın izolasyonu için ilgili antibiyotiği içeren 1-5 ml'lik LB sıvı besiyeri tek koloni ile aşılandı. 37 °C'de çalkalamalı etüvde 8 saat inkübasyona bırakıldıktan sonra 1:1000 oranında, 100-400 ml'lik taze sıvı besiyerine aşılandı. 12-16 saat çalkalamalı etüvde 37 °C'de inkübasyona bırakıldı. OD değeri 2'ye ulaştığında kültürün tamamı +4 °C'de 8000 rpm'de 5 dk santrifüjlendi. Üst sıvı atılarak dipte kalan hücre pelleti ile GeneJET plazmit maxi preperasyon kitinde (Thermo) belirtilen işlem basamaklarına göre izolasyon gerçekleştirildi [49]. Florimetrik ya da spektrofotometrik miktar ve saflık tayini yapılarak agaroz jel elektroforezinde görüntülendi.

2.2.2 DNA ile İlgili Teknikler

2.2.2.1 Saos Hücre Hattından Genomik DNA İzolasyonu

Hücre kültüründe, standart 75 cm²'lik flasklarda büyütülen Saos hücreleri bölüm 2.2.3.3.2'de belirtilen şekilde tripsinizasyon ile flask yüzeyinden alınarak 5 dk süresince 3500 rpm'de santrifüjlendi. Üstteki medyum dikkatlice pipetle çekilerek atıldı. Çökelti üzerine 250 µl nüklei lizis tamponu, 20 µl %10'luk SDS ve 20 µl proteinaz K eklendi ve tüp alt-üst edilerek çalkalandı. Eppendorf tüp 72 °C'deki su

banyosunda 10 dk bekletildi. Eppendorf tüpe 175 µl doymuş amonyum asetat eklenip 30 sn çalkalandı. Oda ısısında 15 dk bekletilen örnekler 4500 rpm’de 20 dk santrifüjlendi. Üstteki sıvı temiz bir eppendorf tüpüne aktarıldıktan sonra üzerine 2 katı oranında mutlak etanol eklendi. Eppendorf tüpü yavaşça alt-üst edildi ve DNA’nın belirmesi gözlemlendi. 3000 rpm’de 10 dk santrifüj edildikten sonra üstteki sıvının tümü pipetle atıldı ve çökelti üzerine 250 µl %75’lik etanol ilave edildi. 13000 rpm’de 10 dk santrifüj edildikten sonra üstteki sıvının tümü pipetle atıldı. DNA kurutuldu ve üzerine 100 µl steril su eklenerek çözülmesi sağlandı [50].

2.2.2.2 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

ADAMTS2 promotor bölgesinin PCR ile amplifikasyonu için Tablo 3.1’de belirtilen primerler kullanıldı. Reaksiyon bileşenleri ve son konsantrasyonları Tablo 2.12’te belirtilmektedir. *ADAMTS2* promotorunun çoğaltılabilmesi için standart PCR koşullarına ek olarak 7-deaza-GTP (50 µM/L), 1X Q solüsyonu ve %5 DMSO PCR kuvvetlendiricileri olarak reaksiyon ortamına eklendi. Amplifikasyon koşulları Tablo 2.13’te belirtilmektedir.

Tablo2.12: PCR bileşenleri, miktar ve son konsantrasyonları.

PCR Bileşenleri	Miktar /son konsantrasyon
gDNA (300 ng/ µl)	1,5 µl
MgCl₂ (25 mM)	5 µl (2,5 mM)
10X PCR Tamponu(+KCl)	5 µl (1X)
dNTP (10 mM)	1 µl (0,2 mM)
Pr-F (100 ng/ µl)	1 µl
Pr-R (100 ng/ µl)	1 µl
Taq DNA Polimeraz (5 U/µl)	1 µl
dH₂O	21,5 µl
TOPLAM	50 µl

Tablo 2.13: PCR döngü koşulları.

Segment	Döngü Sayısı	Sıcaklık	Süre
1	1	94 °C	3 dk
2	35	94 °C	1 dk
		58 °C	45 sn
		72 °C	1 dk
3	1	72 °C	10 dk

Klasik PCR amplifikasyonunun yetersiz kaldığı durumlarda Hot-Start ile birleştirilmiş touch down PCR metodu kullanıldı. Bu metodun döngü koşulları tablo 2.14'te belirtilmektedir. Reaksiyonda, hot-start özelliği olmayan bir DNA polimeraz enzimi kullanıldığında, enzim, reaksiyon ortamına başlangıç denatürasyonundan sonra eklenerek enzimin aktivitesi de korundu [51, 52].

Tablo 2.14: Hot-Start ile kombine edilmiş touch down PCR döngü koşulları.

Segment	Döngü Sayısı	Sıcaklık	Süre
1	1	96 °C	6 dk
Taq DNA polimeraz eklenir			
2	10	95 °C	30 sn
		(67-66-65.....58 °C)	45 sn
		72 °C	90 sn
3	25	95 °C	30 sn
		58 °C	45 sn
		72 °C	90 sn
4	1	72 °C	5 dk

2.2.2.3 Agaroz Jel Elektroforezi

DNA'nın jelde görüntülenmesi amacıyla %0,8'lik agaroz jel hazırlandı. Bu amaçla jel elektroforezi aparatına uygun miktarda 0,4 gr agaroz tartılarak 0,5 X TBE tamponunda (Tablo 2.4) çözüldükten sonra kaynatıldı. 45-50 °C'ye kadar soğutulduktan sonra son konsantrasyon 0,5 µg/ml olacak şekilde Et-Br eklenerek karıştırıldı. Tarakların önceden yerleştirilmiş olduğu agaroz jel elektroforezi kasetine dökülerek polimerleşmesi sağlandı. Kaset elektroforez tankına yerleştirildi ve tank 0,5 X/L TBE tamponu ile dolduruldu. Taraklar jelden ayrıldı. Örnekler yükleme boyası ile karıştırılarak jele yüklendikten sonra 80 Voltta yürütülerek jel görüntüleme sisteminde görüntülendi ve fotoğraflandı [45].

2.2.2.4 DNA Örneklerinin Agaroz Jelden Saflaştırılması

Jelden geri kazanılacak olan DNA örnekleri, bir bisturi yardımıyla jelden kesilerek ependorf tüpüne aktarıldı ve tartıldı. Jel ekstraksiyon kitinde (Fermentas) belirtilen miktarda bağlama tamponu eklenerek 55 °C'de ısıtıcı bloğa yerleştirildi ve 10 dk süresince jelin çözünmesi beklendi. Jel, tampon içerisinde tamamen çözüldükten sonra, kitte belirtilen işlem basamaklarına göre ekstraksiyona devam edildi. Jelden geri kazanılan örnekler agaroz jel elektroforezinde görüntülenerek kontrol edildi.

2.2.2.5 DNA Miktarının Spektrofotometrik Olarak Belirlenmesi

İzole edilen DNA steril dH₂O ile 40 kat sulandırıldı. Spektrofotometrede 260 nm ve 280 nm dalga boylarında kuvarz küvet kullanılarak absorbans alındı. A₂₆₀/A₂₈₀ oranı hesaplanarak DNA'nın saflığı belirlendi. DNA konsantrasyonu aşağıdaki formüle göre hesaplandı [53, 54].

$$\text{DNA miktarı} = 50 \mu\text{g/ml} \times A_{260} \times \text{Seyreltme Faktörü} = \dots \mu\text{g/mL DNA}$$

2.2.2.6 Restriksiyon Endonükleaz Enzim Kesimi

Restriksiyon endonükleaz enzim kesimleri 40 µl son hacimde; 1 µg DNA'nın kesimi için 1 U enzim ve 1X konsantrasyonda tampon kullanıldı. Restriksiyon enzimleri ile kısmi kesimin yapılması için, ilgili enzimin konsantrasyonu düşürülerek tam bir restriksiyon kesimine uygun olmayan koşullar oluşturuldu (Tablo 2.15) [47].

Tablo2.15: Kısmi kesim koşulları.

Kesim Koşulları	Miktar
Plazmit DNA	10 µl (4 µg)
10X Tango Buffer	3 µl (1X)
Enzim (10 U/µl)	0,2 µl
dH ₂ O	16,8 µl
37 °C'de 1,5 saat inkübasyona bırakılır.	
10X Tango Buffer	3,7 µl
<i>XhoI</i>	1 µl
37 °C'de 1,5 saat inkübasyona bırakılır.	

2.2.2.7 Defosforilizasyon

Fosfataz, fosforik asit monoesterlerini fosfat iyonu ve serbest hidroksil gruplarına parçalayan enzimdir. Bu olaya defosforilizasyon denilmektedir. Ligasyonda, DNA ligazın birbirine yakın nükleotidler arasında fosfodiester bağı oluşumunu katalizleyebilmesi için bir nükleotidin 5' ucunda fosfat grubu, diğer nükleotidin 3' ucunda ise -OH (hidroksil) grubunun bulunması gerekir. Özellikle tek enzim kesimi yapılarak lineer hale getirilen plazmit DNA'nın ligasyon sırasında kendi üzerine bağlanmasını engellemek amacıyla, her iki 5' ucunda bulunan fosfatların defosforilizasyonla uzaklaştırılması faydalı olmaktadır. Bu sayede ligasyon esnasında klonlanacak DNA parçasının 5' ucunda bulunan fosfat molekülleri, plazmitin 3' ucunda bulunan hidroksil gruplarıyla etkili bir şekilde ligasyona girebilmektedir. Bu amaçla özellikle tek enzim kesimi ile vektörün

hazırladığı klonlama çalışmalarında kullanılan vektör, Tablo 2.16’da belirtilen şekilde defosforilizasyona tabi tutuldu [45].

Tablo2.16: pMetLuc vektörü defosforilizasyon koşulları.

Vektör Defosforilizasyon Koşulları	Miktar
Doğrusal Plazmit DNA	... (1 µg)
10X Reaksiyon Tamponu	2 µl (1X)
Fast Alkalen Fosfataz	1 µl (1U)
dH ₂ O	20 µl’ye tamamlandı.
37 °C’de 10 dk inkübasyona bırakıldı. 75 °C’de 5 dk enzim inaktivasyonu sağlandı.	

2.2.2.8 Ligasyon

Agaroz jelden kazanılan ürünlerin ilk olarak pGEM-T Easy vektör sistemine ligasyonu yapıldı. pGEM-T Easy vektör sistemi T:A klonlama sistemiyle çalışan bir plazmit vektördür. Bu amaçla 20 µl’lik son hacimde reaksiyon ortamına; klonlanacak DNA parçası ve vektör (minimum 3/1 oranında olacak şekilde), 1X ligasyon tamponu, 0,3 U/µl T4 DNA ligaz enzimi eklenerek +4 °C’de bir gece inkübasyona bırakıldı [45]. Ligasyon ürünü, kompetan hale getirilmiş *DH5α* hücrelerine transforme edildi. Rekombinantların seçimi amacıyla seçici antibiyotiği içeren petrilere 100 mM IPTG stok solüsyonundan 100 µl ve 50 mg/ml X-Gal stok solüsyonundan 20 µl yayıldı. Beyaz koloniler seçilerek araştırıldı. Promotor fragmentlerinin haberci gen vektörüne alt klonlanması restriksiyon endonükleaz kesimine dayalı yöntem ile yapıldı.

2.2.3 Hücre Kültürü ile İlgili Teknikler

2.2.3.1 Hücre Kültürü Laboratuvarının ve Kullanılan Malzemelerin Temizliği

Hücre kültürü laboratuvarı periyodik olarak virkonlu su ile temizlendi. Çalışma sonunda UV lamba açık bırakılarak ortamın steril hale gelmesi sağlandı.

Hücre kültürü laboratuvarı çalışmalarında kullanılan steril kabin ve CO₂'li inkübatör periyodik olarak virkonlu su ve %70'lik etil alkol ile silinerek temizlendi. İnkübatöre bağlı bulunan CO₂ tüpü düzenli olarak kontrol edildi. İnkübatör filtrelerinin periyodik olarak değiştirilmesine dikkat edildi ve içerisindeki ortamın nemli kalmasını sağlamak amacıyla alt kısımdaki su tablasına steril edilmiş su koyularak düzenli olarak değiştirildi.

Isıya dayanıklı ependorf, pipet ucu, solüsyonlar ve gerekli diğer malzemeler otoklavda 121 °C'de 20 dk otoklavlanarak, steril edilmeye uygun olmayan solüsyonlar 0,22 µm'luk filtre kullanılarak sterilizasyon sağlandı.

2.2.3.2 Hücre Kültürü Deneylerinde Kullanılacak Malzemenin Hazırlığı

2.2.3.2.1 Medyumun Hazırlanması:

Hücre kültürü deneylerinde, yüzeye tutunarak büyüyen hücre hatları için ticari olarak temin edilen DMEM ve süspansiyon halinde büyüyen hücre hatları için RPMI 1640 medyumunu kullanıldı. Medyum içerisine %10 FCS ve %1 L-Glutamin solüsyonu 0,22 µm'luk filtreden geçirilerek eklendi.

2.2.3.2.2 FCS'nin Hazırlanması:

Hücrelerin rutin bakımında sıklıkla kullanılan FCS ilk kullanımdan önce 56 °C'de 1 saat ısı ile inaktive edildi ve 0,22 µm'luk filtreden geçirilerek steril edildikten sonra kullanıldı. -20 °C'de muhafaza edildi.

2.2.3.2.3 PBS'nin Hazırlanması:

100 ml'lik distile suya ticari olarak alınan PBS (Phosphate Buffered Salin) tabletlerinden 1 adet eklenerek 121 °C'de 20 dk otoklavlanarak steril edildi. +4°C'de muhafaza edildi.

2.2.3.2.4 Tripsin-EDTA Solüsyonunun Hazırlanması:

%0,05 Tripsin ve 0,5 mM EDTA, steril PBS (1X) içerisinde çözüldü. 0,22 µm'luk filtreden geçirilerek steril edildi. -20 °C'de muhafaza edildi.

2.2.3.3 Hücre Hatlarının Rutin Bakımı

2.2.3.3.1 Hücrelerin Açılması

Su banyosu önceden 37 °C'ye ayarlanarak çalışmada kullanılacak olan DMEM (Dulbecco's Modified Eagles Medium) medyum ve FCS(Fetal Calf Serum) su banyosunda ılıtıldı. Hücre soyu ile çalışmaya başlanılmadan en az yarım saat önce steril kabin çalıştırıldı ve %70'lik etil alkol ile steril kabinin iç yüzeyi temizlendi. Ilıtılan FCS ve medyumun dış yüzeyleri %70'lik alkol ile temizlenerek steril kabin içine alındı. Medyumun içine %1 L-Glutamin ve %10 FCS eklendi. -80 °C derin dondurucudan çıkarılan hücre hatları 37 °C'ye ayarlanmış su banyosunda çözüldükten sonra pastör pipeti yardımıyla falkon içindeki medyuma aktarıldı ve 1000 rpm'de 5 dk santrifüjlendikten sonra üstte kalan medyum uzaklaştırıldı. Dipte kalan hücre pelleti belli bir miktar taze medyuma çözülerek eşit oranda flasklara

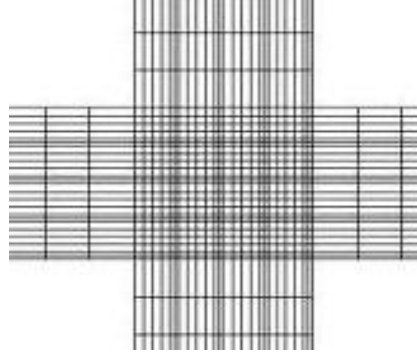
paylaştırıldı ve daha sonra gerekli miktarda medyum, hücrelerin paylaştırıldığı flaskların içine eklendi. Hücreler %5 içeren 37 °C’de nemli ortam sağlayan inkübatörün içinde büyümeye bırakıldı.

2.2.3.3.2 Hücrelerin Pasajlanması

Hücreler sıkışık (konfluent) duruma gelince hem besi ortamı hücreler için yetersiz hale gelmekte, hem de kültür kabında yer olmadığı için kontakt inhibisyon adı verilen mekanizma ile hücrelerin çoğalmaları durmaktadır. Bu nedenle hücrelerin pasajlanması gerekir. Bu amaçla flask içindeki hücreler önce PBS tamponu ile iki kez yıkandı. Tripsinizasyon ile hücrelerin flask yüzeyinden kalkması sağlandı. %10 FCS içeren DMEM ile tripsin inaktive edildi. Yüzeyden kalkan hücreler santrifüj tüpüne aktararak 1000 rpm’de 5 dk santrifüj edildikten sonra üstte kalan medyum uzaklaştırıldı. Dipte kalan hücre pelleti %10 FCS içeren medyumda çözüldü. Hücre süspansiyonu flasklara eşit olarak paylaştırıldıktan sonra gerekli miktarda medyum flaskların içine eklendi.

2.2.3.3.3 Hücre Canlılığının Belirlenmesi ve Hücre Sayımının Yapılması

Tripan mavisi hücre canlılığının belirlenmesi amacıyla kullanılan bir diazo boyasıdır. Cansız hücreler bu boyayı absorbe eder ve mavi renk alır. Hücre canlılığının belirlenmesi amacıyla hücreler falkona aktarıldıktan sonra 1000 rpm’de 5 dk santrifüj yapıldı. Üstte kalan medyum uzaklaştırıldıktan sonra dipte kalan hücre pelleti 6 ml medyumda homojen bir şekilde çözüldükten sonra hücre süspansiyonundan 10 µl alınarak bir ependorfa koyuldu. Aynı ependorfa 10 µl tripan mavisi eklendikten sonra 5 dk oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. Pipet ile karıştırılarak hücrelerin ependorfta homojen bir şekilde karışması sağlandıktan sonra bu karışımdan 10 µl alınarak Toma lamına aktarıldı (Şekil 2.6). Mavi renk almayan canlı hücreler sayılarak ml’de bulunan hücre sayısı hesaplandı (1 ml’deki hücre sayısı = Alanda sayılan hücre miktarı x 10⁴ x Seyreltme faktörü) [55].



Şekil 2.6: Thoma lamı.

Hücre proliferasyonu, canlılığı ve sitotoksosite ölçümü için kullanılan diğer bir yöntem MTT metodudur. Kantitatif kolorometrik bir yöntem olan MTT canlı hücrelerin tetrazolium tuzu olan MTT'yi formazan kristallerine dönüştürmesi esasına dayanır. Bu metoda göre istenilen inkübasyon periyodundan sonra (6, 24, 48 ve 72 saat) hücrelerin bulunduğu ortama 0,5 mg/ml olacak şekilde MTT solüsyonu eklendi ve 4 saat 37 °C'de, %5 CO₂ içeren ortamda inkübe edildi. İnkübasyon sonunda medyum uzaklaştırıldı. 0,004 M HCl içeren izopropanol ile kristaller çözüldü ve spektrofotometrede 550 nm dalga boyunda absorbans alındı [56].

2.2.3.3.4 Hücrelerin Dondurulması

Bölüm 2.2.3.3.2'de anlatılan şekilde hazırlanan hücre pelleti 100 µl DMSO ve 900 µl FCS karışımı ile çözüldükten sonra -80 °C'ye dayanıklı tüplere koyulup hızlıca donducuya kaldırılarak muhafaza edildi.

2.2.4 Transkripsiyonel Aktivite ile İlgili Teknikler

2.2.4.1 Kalsiyum-Fosfat Presipitasyonu ile Geçici Transfeksiyon

Transfeksiyon için hücreler bir gün önceden 12 kuyucuklu plakalara 25x10⁴ hücre/kuyu olacak şekilde paylaştırıldı. 45 µl son hacimde; 2 M CaCl₂ solüsyonu transfekte edilecek DNA ile karıştırıldı. Karışımın üzerine 45 µl 2X HEPES damla damla eklendi ve presipitasyonun oluşması için yarım saat beklendi. Sürenin sonunda

presipitasyon oluşumu kontrol edildi. Presipitasyon oluşuktan sonra karışım her bir kuyucuğa damla damla eklendi. Hücreler CO₂'li inkübatörde 6 saat bekletildi. Sürenin sonunda kuyucuklardan medyum uzaklaştırıldı. Hücreler iki kez PBS ile yıkandı ve taze medyum eklendi. 24, 48 ve 72 saat inkübasyon sürelerinin sonunda lusiferaz ve salınan alkalın fosfat aktivitesi luminometre ile ölçüldü [45].

2.2.4.1.1 Salınan Sistem Lusiferaz Aktivitesinin Ölçülmesi

12 kuyucuklu plakalarda yapılan transfeksiyon sonrasında 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon süreleri sonrasında hücre kültürü medyumundan 50 µl alınarak 96 kuyucuklu plakalara eklendi. Her bir örnek için taze hazırlanmış 1X Substrat/Reaksiyon tamponundan 5 µl medyumun üzerine eklendi ve hızlıca luminometrede sonuçlar okundu [57].

2.2.4.1.2 SEAP Aktivitesinin Ölçümü

24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon süreleri sonunda ayrılan 25 µl hücre kültürü medyumunu 96 kuyucuklu plakalara koyuldu. 1X dilüsyon tamponundan 75 µl medyumların üzerine eklendi. Plaka 65 °C'de 30 dakika bekletildi. Daha sonra 2-3 dk buzda bekletilerek soğutulduktan sonra oda sıcaklığına gelmesi sağlandı. Oda sıcaklığındaki SEAP substrat solusyonundan her bir örneğe 100 µl eklendi ve örnekler oda sıcaklığında 10-60 dakika bekletildi. İşlem sonunda sonuçlar luminometrede okutuldu [58].

2.2.4.1.3 B- Galaktozidaz Aktivitesinin Ölçülmesi

B-Galaktozidaz aktivitesinin ölçülmesi için öncelikle hücre ekstraktı hazırlandı. Ekstraktın hazırlanması için medyum ortamdan uzaklaştırılıp hücreler 1X PBS ile yıkandı. 75 µl 1X PLB (Passive Lysis Buffer, Promega) eklenip 5 dk horizontal çalkalayıcıda bekletildi. Hücre kazıyıcısı ile hücreler plaka yüzeyinden kazınıp ependorf tüplerine alındı. 15 saniye vortekslendikten sonra 1 dk süresince 13500 rpm'de santrifüjlendi. Üst sıvı ayrı bir ependorf tüpüne alındı.

Aktivite ölçümü için 96 kuyucuklu plakalara 50 µl 2X Assay Buffer (Tablo 2.6) ve hazırlanan hücre ekstraktından 50 µl eklendi. Pipet ile karıştırıldıktan sonra 37 °C’de 30 dk inkübasyona bırakıldı. Sarı renk oluşumu gözlemlendikten sonra kuyucuklara 100 µl 1 M sodyum karbonat eklenerek reaksiyon durduruldu. Spektrofotometrede 420 nm’de absorbans alındı.

2.2.5 RNA ile İlgili Teknikler

2.2.5.1 Sitokin Deneylerinin Kurulması

Hücreler tripan mavisi ile boyanarak sayıldı ve %90 oranında canlı olduğuna karar verilen hücrelerle deneyler kuruldu. %10 oranında FCS içeren DMEM besiyeri kullanılarak 25 cm²’lik küçük flasklara 2x10⁶ hücre paylaştırıldı. Hücrelerin yüzeye tutunması için 3 saat beklendi. Hücrelerin yüzeye tutunup tutunmadığı mikroskopta kontrol edildi. Yüzeye tutunduğundan emin olunan hücrelerin besiyeri %0,1 BSA içeren DMEM ile değiştirildi. Bir gece inkübasyondan sonra 500 U/ml olacak şekilde IL-1α ve IL-6 sitokinleri hücrelere uygulandı.

2.2.5.2 RNA İzolasyonunun Yapılması

1, 3, 6, 24, 48 ve 72 saat inkübasyon sürelerinin sonunda kontrol ve deney grubuna ait hücreler bölüm 2.2.3.3.2’de belirtilen şekilde tripsinizasyon ile yüzeyden alınarak pellet haline getirildi. Kontrol ve deney gruplarından RNA izolasyonu ticari kitle (Fermentas) belirtilen işlem basamakları takip edilerek yapıldı.

2.2.5.3 RNA Miktarının Spektrofotometrik Olarak Belirlenmesi

İzole edilen RNA, RNaz içermeyen dH₂O ile 40 kat sulandırıldı. Kuvartz 96 kuyucuklu plaka kullanılarak 260 nm ve 280 nm dalga boylarında absorbans alındı. A₂₆₀/A₂₈₀ oranı hesaplanarak RNA’nın saflığı belirlendi. RNA konsantrasyonu aşağıdaki formüle göre hesaplandı.

$$\text{RNA miktarı} = 40 \mu\text{g/ml} \times \text{OD}_{260} \times \text{Seyreltme Faktörü} = \mu\text{g/ml RNA}$$

2.2.5.4 Formaldehit Agaroz Jel Elektroforezi

İzole edilen RNA örnekleri RNaz enziminin etkilerine karşı açık olduğundan kullanılan cam malzemeler, elektroforez tankı ve su RNaz enziminden arındırıldı. RNaz içermeyen su Bölüm 2.1.5.4'te belirtildiği gibi hazırlandı. Cam malzemeler %0,1 DEPC içeren suda 12 saat bekletildikten sonra otoklavlandı. Elektroforez tankı önce %0,5'lik SDS (Sodyum Dodesil Sülfat) çözeltisi ile yıkandı. Daha sonra RNaz içermeyen su ile durulandı. Saf etanolden geçirildikten sonra kurumaya bırakıldı.

İzole edilen RNA'nın jelde görüntülenmesi amacıyla %1'lik formaldehit agaroz jel elektroforezi yapıldı. Jelin yapımı için 0,5 gr agaroz tartılıp 10X'lik jel tamponunda çözüldü (Tablo 2.7). RNaz içermeyen steril dH₂O ile 50 ml'ye tamamlandı. Jel kaynatıldıktan sonra 50 °C 'ye kadar soğuması beklendi. Jele %37'lik (12,3M) formaldehitten 0.9 ml eklendi ve homojen bir şekilde karışması sağlandı. Daha sonra stok Et-Br solüsyonundan (10 mg/ml) 1 µl eklenip tarakları önceden yerleştirilmiş elektroforez kasetine döküldü. Jelin polimerleşmesi beklendi.

RNA örnekleri jele yüklenmeden önce 70 °C'de 10 dk ısı ile denatüre edilip daha sonra 10 dk buzda bekletildi. Örnekler jele yüklenerek 1X FA Jel tamponu (Tablo 2.8) içerisinde 80 Voltta yürütüldü. Elektroforez sonucu dijital jel görüntüleme sistemi kullanılarak değerlendirildi ve fotoğraflandı.

2.2.5.5 RT- PCR Reaksiyonu

RT-PCR reaksiyonları iki basamaklı olarak gerçekleştirildi. Öncelikle cDNA sentezlendi. Bunun için tüpe öncelikle 12 µl son hacimde, 1 µg RNA kalıbı, 200 pmol Anchored Oligo (dT)₂₃ primer eklenerek 65 °C'de 5 dk ön inkübasyona bırakıldı. Bu sürenin sonunda reaksiyon tüpüne 10 U Revert Aid Reverse Transkriptaz enzimi, 1X Reaksiyon Tamponu, 20 U/µl RNaz inhibitörü ve 1 mM dNTP karışımı eklenerek 20 µl'ye tamamlandı. Reaksiyon tüpü 42 °C'de 1 saat ve 70 °C'de 10 dk inkübasyona bırakıldı. Bu sürenin sonunda elde edilen cDNA'nın 1 µl'si PCR için bölüm 2.2.2.2'de belirtilen bileşen ve son konsantrasyonlarda kullanıldı.

2.2.5.6 Real Time PCR

Realtime PCR çalışmaları Light Cycler 485 (Roche Diagnostic) kullanılarak yapıldı. Reaksiyon 10 µl son hacimde 5 µl SYBR® Green PCR Master Mix, 1 µl cDNA, 100 ng/µl'lik forward ve reverse primerleri stoğundan 0,5'er µl ve 3 µl dH₂O kullanılarak yapıldı. Buna göre her bir cDNA en az üç tekrarlı olarak *ADAMTS2*, *ADAMTS3* ve insan β-2 Mikroglobulin (internal kontrol) genleri için çalışıldı. İnsan β-2 Mikroglobulin geni sonuçların normalizasyonu amacıyla kullanıldı. Döngü koşulları Tablo 2.17'de belirtilmektedir.

Tablo2.17: Real time PCR döngü koşulları.

Segment	Döngü	Sıcaklık	Süre
1	1	95 °C	10 dk
2	35	95 °C	10 sn
		58 °C	15 sn
		72 °C	10 sn
3	1	72 °C	1 dk

2.2.5.7 Sonuçların Değerlendirilmesi ve İstatistiksel Analiz

Real Time PCR sonuçları Livak metoduna göre değerlendirildi [59]. *ADAMTS2* ve *ADAMTS3* için elde edilen Ct değerleri, internal kontrol genin (insan β-2 Mikroglobulin) Ct ortalamasından çıkarıldı. Daha sonra elde edilen değer 2 tabanında kuvveti alındı. Kontrol grupları kendisine bölünerek "1" birim olarak kabul edildi. İlgili saatlerde çalışılan deney sonuçları kontrol değerine bölündü ve 1'in katı şeklinde sonuçlar elde edildi [59]. Sonuçlar MiniTab (One Way ANOVA) ile istatistiksel olarak analiz edildi. $p \leq 0,05$ olduğu durumlar istatistiksel olarak anlamlı olarak kabul edildi.

2.2.6 Protein ile İlgili Teknikler

2.2.6.1 Westernblot

2.2.6.1.1 Westernblot İçin Sitokin Deneylerin Kurulması

Hücreler tripan mavisi ile boyanarak sayıldı ve %90 oranında canlı olduğuna karar verilen hücrelerle deneyler kuruldu. %10 oranında FCS içeren DMEM besiyeri kullanılarak 6 kuyucuklu plakalara 5×10^4 hücre/kuyu olacak şekilde paylaştırıldı. Hücrelerin yüzeye tutunması için 3 saat beklendi. Hücrelerin yüzeye tutunup tutunmadığı mikroskopta kontrol edildi. Yüzeye tutunduğundan emin olunan hücrelerin besiyeri serum açlığının sağlanması amacıyla %0,1 BSA içeren DMEM ile değiştirildi. Bir gece inkübasyondan sonra 500 U/ml olacak şekilde IL-1 α ve IL-6 sitokinleri hücrelere uygulandı.

2.2.6.1.2 Yolak Çalışmaları İçin Deneylerin Kurulması

Bölüm 2.2.5.1’de belirtildiği gibi hücreler flasklara paylaştırıldı. Ertesi gün bir grup hücreye sadece inhibitörler uygulanırken bir grup hücreye de inhibitör uygulamasından 1 saat sonra 500Ü/ml olacak şekilde IL-6 sitokini uygulandı. PI3K inhibitörü olarak Wortmannin (1 μ M), MEK inhibitörü (10 μ M) ve JNK inhibitörü olarak SP600125 (20 μ M) son konsantrasyonlarda olacak şekilde hücrelere uygulandı. Kontrol gruplarının bir kısmına herhangi bir uygulama yapılmazken bir grubuna da inhibitörleri sulandırmakta kullanılan DMSO uygulandı. 6 saatlik inkübasyon süresinin sonunda bölüm 2.2.6.1.3’te belirtildiği şekilde hücrelerden total ekstrakt hazırlandı.

2.2.6.1.3 Total Hücre Ekstraktının Hazırlanması

1, 3, 6, 24, 48 ve 72 saat inkübasyon sürelerinin sonunda kontrol ve deney grubuna ait hücreler bölüm 2.2.3.3.2’de belirtilen şekilde tripsinizasyon ile yüzeyden

alınarak pellet haline getirildi. 1000 rpm'de 5 dk santrifüj edilerek üst kısımda kalan medyum dikkatlice uzaklaştırıldı. 1 ml PBS eklenerek pellet dikkatlice yıkandı ve tekrar 1000 rpm'de 5 dk santrifüjlendi. Üst kısımda kalan PBS uzaklaştırıldı. Pelletin üzerine 300-400 µl soğuk Laemli tamponu (Tablo 2.9) eklendi. Pipet ile karıştırılarak hücrelerin lizis olması sağlandı. 1 dk süresince hücreler vorteksledi ve 30 dk buz üzerinde bekletildi. (Bu sırada çözünebilir proteinlerin birçoğu üst sıvı kısma çıkacaktır). +4 °C'de 14000 rpm'de 30 dk süresince santrifüjlendi. Üst sıvı alınarak protein analizleri için kullanıldı [60].

Bazı örneklerin hazırlanmasında NP-40 tampon (Tablo 2.9) sistemi kullanıldı. Bu amaçla ekstraksiyon işlemleri yukarıda belirtilen prosedür ile aynı şekilde NP-40 tamponu kullanılarak yapıldı. Protein miktarı florimetre kullanılarak belirlendi.

2.2.6.1.4 SDS-PAGE

SDS-PAGE jelinin hazırlanması amacıyla elektroforez aparatları ve cam levhalar su ve %70'lik etanol ile temizlendi. Ayırma ve yığma jeli Tablo 2.18'de belirtilen şekilde hazırlandı. Protein örnekleri 30-40 µg olacak şekilde hazırlandı ve 95 °C'de 5 dk denatüre edildi. Protein ekstraksiyonu Laemli tamponu (Tablo 2.9) ile yapıldığı zaman örnekler yalnız bromfenol mavisi ile karıştırılarak kuyucuklara yüklendi. Protein ekstraksiyonu NP-40 tamponu ile yapıldığı zaman örnekler β-Merkaptoetanol içeren yükleme boyası ile karıştırılarak jele yüklendi. Ayrıca jele 10 µl Prestained Page ruler Plus (Thermo 26616) büyüklük belirteci olarak yüklendi. Tank %0,1 (w/v) SDS içeren 1X yürütme tamponu (Tablo 2.9) ile doldurularak (orta kısım ve alt kısım) 160 volt akımda örneklerin yürümesi sağlandı [47].

Tablo 2.18: SDS-PAGE Ayırma ve yığıma jeli bileşen miktar ve son konsantrasyonları

Jel İçeriği	%10 Ayırma Jeli	%5 Yığıma Jeli
Yığıma Jeli Tamponu	-	2,5 ml
Ayırma Jeli Tamponu	2,5 ml	-
Akrilamid:Bisakrilamid(37.5:1)	2,5 ml	1,25 ml
ddH ₂ O	5 ml	6,25 ml
%10 (w/v)Amonyum PerSülfat	100 µl	100 µl
TEMED	10 µl	10 µl

2.2.6.1.5 Proteinlerin PVDF Membrana Transferi ve İmmünojenik Olarak Belirlenmesi

Proteinlerin transferi için PVDF (Millipore) membran kullanıldı. Kısaca; yığıma jeli kesilerek uzaklaştırıldı ve jel transfer tamponu (Tablo 2.9) içine alınarak oda sıcaklığında 15 dk dengelendi. Whatman 3 MM kağıt ve PVDF membran jel ile aynı boyutlarda kesilerek hazırlandı. Membran metanolde 1 dk bekletilerek aktive edildi. Transfer kaseti arasına (-) kutuptan başlayarak sırasıyla transfer tamponuyla ıslatılmış sünger, whatman kağıdı, jel, membran, whatman kağıdı ve sünger hava kabarcığı kalmamasına dikkat edilerek yerleştirildi. Kaset, transfer tamponu ile dolu olan tanka yerleştirildi ve 15 volt, 400 mA akımda 1 gece boyunca transfer için bırakıldı. Membran %0,1 (v/v) Tween-20 içeren 1X TBS tamponuna, %5 oranında yağsız süt tozu eklenerek hazırlanan bloklama tamponunda 1 saat oda sıcaklığında horizontal çalkalayıcıda çalkalanarak bloklandı. Süre sonunda bloklama çözeltisi uzaklaştırılarak membran %0,1 (v/v) Tween-20 içeren 1X TBS tamponunda 5'er dakikalık sürelerle 3 kez yıkandı.

Membran sırasıyla primer ve sekonder antikolar (Tablo 2.1) ile 1-1,5 saat oda sıcaklığında (ya da primer antikor için +4 °C'de gece boyunca) horizontal çalkalayıcıda inkübasyona bırakıldı. Bantlar ECL Western Blotting Substratı (Pierce) kullanılarak görüntülendi ve karanlık odada X-Ray filme basıldı. Film sırasıyla 2'er

dakika developer ve fixer solüsyonlarında (Tablo 2.9) ve 1 dk suda bekletilerek tab edildi [61].

2.2.6.1.6 PVDF Membrandan Antikorların Ayrılması (Stripping)

PVDF membrandan antikorların ayrılması amacıyla membran % 0,05 Tween-20 içeren 1X TBS ile yıkandı. Stripping tamponundan (Tablo 2.9) 10 ml eklenerek iki kez 15'er dakika boyunca oda sıcaklığında çalkalanarak yıkandı. Daha sonra musluk suyunda membran durulandı. % 0,05 Tween-20 içeren 1X TBS ile yıkanan membran bu basamaktan sonra ECL substratı ile muamele edilerek kontrol edildi.

2.2.6.1.7 Sonuçların Değerlendirilmesi

Western Blot sonuçları Image J programı kullanılarak densitometrik olarak değerlendirildi. β -Aktin proteini tüm deney ve kontrol gruplarında çalışılarak normalizasyon amacıyla kullanıldı [62].

2.2.6.2 İmmü Floresans Tekniği

Hücreler 125×10^3 hücre/kuyu olacak şekilde önceden yuvarlak lamellerin yerleştirilmiş olduğu 24 kuyucuklu plakalara paylaştırıldı. Ertesi gün medyum uzaklaştırılarak PBS ile iki kez yıkandı. Hücreler %4 paraformaldehit ile 15 dk süresince oda sıcaklığında fikse edildi. Fiksataf uzaklaştırıldı ve hücreler % 0,3 (v/v) Triton X-100 içerenin PBS'de 5 dk bekletildi. Hücreler PBS ile yıkandıktan sonra spesifik olmayan bağlanmaları engellemek için %1 BSA içeren PBS ile 1 saat oda sıcaklığında blokladı. PBS ile 5 dk yıkanarak bloklama solüsyonu uzaklaştırıldı ve primer antikor eklendi (Primer antikor 1/50 veya 1/100 oranında %1 BSA içeren PBS ile sulandırıldı). Hücreler gece boyunca +4 °C'de ışık geçirmeyen nemlendirilmiş kapaklı bir kapta primer antikor ile inkübasyona bırakıldı. Ertesi gün primer antikor alınarak hücreler PBS ile yıkandı. Sekonder antikor uygulama işlemleri karanlık ortamda yapıldı. Sekonder antikor %1 BSA içeren PBS ile sulandırıldıktan sonra nemlendirilmiş ve ışık geçirmeyen kapaklı bir kaba

yerleştirilerek oda sıcaklığında 1 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresinin sonunda PBS ile hücreler yıkandı. Nükleus boyaması yapılacak olanlara 1 µg/mL DAPI (4',6' diamino-2-phenylindole 2HCl) boyası eklendi ve 5 dk inkübasyona bırakıldı. Daha sonra PBS ile yıkama yapıldı.

Preperatların mikroskopiye hazırlanması amacıyla lamaların üzerine floresans sinyalin zamanla solmasını engelleyecek ticari antifade tampon (İnvitrogen) damlatıldı. Kuyucukların tabanında bulunan yuvarlak lameller çıkartılıp ters çevrilerek lam üzerine yerleştirildi. Lamelin üzerine entellan sürülerek preperatlar sabitlendi [63]. Floresans görüntülemeleri, Balıkesir Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı bünyesinde bulunan ED200 floresans ataçmanlı Olympus BX51 marka mikroskopta yapıldı. Fotoğraflar, aynı mikroskoba takılı Olympus DP72 marka dijital fotoğraf makinesi ile çekilerek Photoshop CS2 programı ile yeniden boyutlandırıldı.

2.2.7 DNA-Protein Etkileşimi ile İlgili Teknikler

2.2.7.1 Electromobility Shift Assay (EMSA)

EMSA, DNA-protein etkileşimlerini belirlemek için kullanılan bir tekniktir. DNA-protein kompleksinin oluşması durumunda, bu kompleks denatüre olmayan jelde serbest DNA molekülüne göre daha yavaş hareket etmektedir. İlgili proteinin DNA'ya bağlanması durumunda jeldeki hareketi değişerek daha arkada kalmaktadır. Ortama ilgili antikorun da eklenmesi ile (antibody supershift) hareket daha da yavaşlamaktadır [64]. DNA'nın hareketindeki bu değişimler değerlendirilerek düşünülen protein ile etkileşime girip girmediği belirlenebilmektedir. Bu çalışmada biyoinformatik analiz ile belirlenen ve promotor bölgesine bağlanması muhtemel transkripsiyon faktörlerinden bazılarının fonksiyonel olarak *ADAMTS2* promotor bölgesine bağlanıp bağlanmadığı radyoaktif olmayan EMSA çalışmaları ile belirlendi.

2.2.7.1.1 Saos Hücrelerinden Nükleer Ekstrakt Hazırlanması

75 cm²'lik flask yüzeyindeki hücreler buzda soğutulmuş 10 ml PBS ile iki kez yıkandıktan sonra 3 ml TEN tamponu eklendi ve buz üzerinde 5 dk bekletildi. Hücreler flask yüzeyinden kazınarak 2 ml'lik ependorf tüplere alındı. +4 °C'de, 13.000 rpm'de 1 dk santrifüjlendi. Pellet 1,5 ml soğuk PBS eklenerek yıkandı. 4 °C'de, 13.000 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Üst kısım atıldı. Oluşan pellet 50 µl A tamponunda çözüldükten sonra buzda 15 dk bekletildi ve hamilton enjektöründen 5 kez geçirilerek lizis edildi. Lizat +4 °C'de, 13.000 rpm'de 20 sn santrifüj edildikten sonra oluşan pellet 60 µl C tamponu eklenerek yeniden homojen hale getirildi. Buzda 30 dk bekletildikten sonra +4 °C'de, 13.000 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Protein miktarı belirlendikten sonra 10 µl'lik hacimlere ayrılarak -80 °C dondurucuda muhafaza edildi. Böylece EMSA çalışmaları için nükleer ekstrakt hazırlanmış oldu [45].

2.2.7.1.2 Oligonükleotidlerin Bağlanması

Oligonükleotidlerin bağlanması amacıyla, her bir oligonükleotitten 200 fmol/µl olacak şekilde alınarak, 40 µl'lik son hacimde Tris-EDTA tamponu içerisinde sulandırıldı. Her iki primerden eşit miktarda alınarak PCR tüpünde birleştirildi ve çift zincirli hale gelmeleri için 95 °C'de 5 dk inkübasyona bırakıldıktan sonra oda ısısında yavaşça soğuması için bekletildi [45].

2.2.7.1.3 Bağlanma Reaksiyonu

Bağlanma reaksiyonu için üretici firmanın belirttiği talimatlar doğrultusunda 20 µl'lik son hacim içerisine; son konsantrasyonu 1X olacak şekilde bağlanma tamponu, 50 ng/µl son konsantrasyonda poly dI.dC, 4 µg nükleer ekstrakt, 5 mM MgCl₂, 5 mM KCl, 20 fmol biotin etiketli primer eklenerek 20 dk oda sıcaklığında bağlanma reaksiyonunun gerçekleşmesi için bekletildi [45].

2.2.7.1.4 Jelin Yürütülmesi ve Proteinlerin Membrana Transferi

Native poliakrilamid jel %6 Akrilamid: Bisakrilamid (37,5:1), 0,5X/L TBE tamponu, %0,25 gliserol, %0,1 Amonyum persülfat (APS) ve TEMED ilave edilerek hazırlandı. Hazırlanan jel için yürütme tamponunda 100 V akımda, yarım saat süresince ön yürütme yapıldı. Ön yürütmenin sonunda bağlanma reaksiyonları yükleme boyası ile karıştırılarak jele yüklendi ve 100 volt akımda boyuna yürütüldü.

Transfer için naylon membran kullanıldı (Thermo Scientific). Jel, naylon membran, Whatman 3 MM kağıt, sünger pedler transfer tamponu (0,5 X/L TBE) içinde alınarak oda sıcaklığında 5-10 dk bekletildi. Daha sonra transfer kaseti arasına eksi yüklü kutuptan başlamak üzere sırasıyla sünger, Whatman kağıdı, jel, membran, Whatman kağıdı, sünger hava kabarcığı kalmamasına dikkat edilerek yerleştirildi. Kaset, soğuk transfer tamponu ile dolu olan blot tankına yerleştirildi ve 100 volt akımda 1 saat boyunca transfere bırakıldı. Transfer sonrasında kross-link reaksiyonu için membran, streç film ile sarılarak UV transilimünatörde 15 dk tutuldu. Kross-link sonrasında membran, oda sıcaklığında 15 dk süresince bloklama tamponu içerisinde çalkalandı. Bu sürenin sonunda Streptavidin-Horseradish Peroxidase Conjugate, bloklama tamponuna eklenerek 15 dk oda sıcaklığında çalkalandı. Membran kitte bulunan 1X yıkama tamponu ile dört kez yıkandıktan sonra 30 ml substrat dengeleme tamponu eklenerek 5 dk çalkalandı [45].

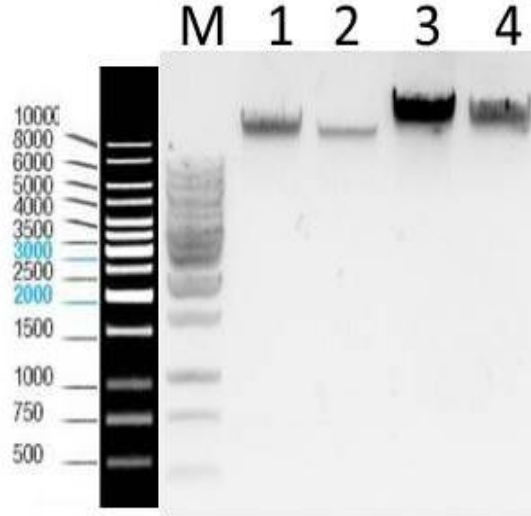
Biotin işaretli DNA: protein kompleksi, ECL substratı kullanılarak görüntüledi ve X-Ray filme aktarıldı. Film tab edilerek sonuçlar görüntüledi.

3. BULGULAR

3.1 İnsan *ADAMTS2* Promotorunun pGEM-T Easy Plazmit Vektörüne Klonlanması

3.1.1 Genomik DNA İzolasyonu

İnsan *ADAMTS2* promotor bölgesinin klonlanması amacıyla öncelikle bölüm 2.2.2.1’de belirtildiği şekilde Saos hücre hattından genomik DNA izolasyonu yapıldı. İzole edilen DNA %0,8’lik agaroz içeren jelde, 80 volt akım uygulanarak yürütüldü ve görüntüledi. Genomik DNA’nın konsantrasyonu ve saflığı spektrofotometrik olarak belirlendi.



Şekil 3.1: İzole edilen genomik DNA'lara ait agaroz jel elektroforezi görüntüsü
M: 1kb marker (Fermentas; SM03111), 1-4: genomik DNA'lar.

3.1.2 Primer Tasarımı

Primer tasarımı için öncelikle insan *ADAMTS2* genine ait muhtemel promotor bölgesi, gen bankasında bulunan kayıtlardan yararlanılarak belirlendi. Daha sonra bu

promotor bölgesinin restriksiyon haritalaması yapıldı (bkz Ek-D). Böylece promotor bölgesini kesen ve kesmeyen restriksiyon enzimleri saptandı. Promotor dizisini kesmeyen enzimlerden pMetLuc haberci vektörünün klonlama bölgesinde lusiferaz için uygun yerleşimde bulunan enzimler belirlendi. Uygun enzimlerin tanıma dizileri, primerler dizilerine tanıtıldı. Primerlerin saç tokası analizi, Tm analizi, %GC analizi ve NCBI Blast analizleri yapıldı. Tasarlanan primerlerin özellikleri Tablo 3.1’de belirtilmektedir. (Primerlerin adları, başlangıç noktaları dikkate alınarak oluşturulan genel terminolojiye göre belirtildi. Parantez içinde belirtilen isimler laboratuvar çalışmalarında kullanılan adlandırma şeklidir).

Tablo 3.1: İnsan *ADAMTS2* promotor bölgesinin amplifikasyonu için tasarlanan primer dizileri

Primerin Adı	Tm(°C)	(bç)	Primer Dizisi (5’- 3’)
Adamts2pro_+112 F (HuADAMTS2 pro Forward3Jan 2010)	64,1	25	5’- <u>TTC GAA</u> GAT CCA TGG CAG CCG GAC T- 3’
Adamts2pro_+112F2 (Adamts2 pro forward_20910)	72	23	5’- <u>AAG CTT</u> GAT CCA TGG CAG CCG GA-3’
Adamts2pro_+112F3 (Adamts2_pro forward27.01.11)	68	21	5’-ATC CAT GGC AGC CGG ACT GCA-3’
Adamts2pro_+112F4 (Adamts2 pro forw mart2010)	68.3	30	5’ <u>TTCGAA</u> GATCCATGGCAGCCGGACTGCAGC- 3’
Adamts2pro_-1367 R (Adamts2-Reverse PRO- ocak2)	63,8	29	5’- <u>CTC GAG</u> CTG CTG TGT AAG TCG TGT TTC CC-3’
Adamts2pro_-656 R (Adamts2_promoter_Rev3)	62,5	29	5’- <u>CTC GAG</u> GAC TTC AGA GGA AGA GGA ACT GG-3’
Adamts2pro_-1899R (HuADAMTS2proR3Jan 2010)	60,4	27	5’- <u>CTC GAG</u> CGC TGT GTA AAG AAA TAC CCA- 3’
Adamts2pro_-915R (ADAMTS2proRev_20910)	70	23	5’- <u>CTC GAG</u> GAC AGA ATG CAT ACG TG-3’
Adamts2pro_-94R (ADAMTS2 pro 27.01.11 rev)	80	20	5’- CGC TCG CTC CTT CCC TCT CC-3’
Adamts2pro_-368R (Adamts2 pro 490bç rev)	62,4	21	5’- <u>CTC GAG</u> CTC TAG GTG GGG ACG-3’
Adamts2pro_-180R (180bç reverse)	84	24	5’- <u>CTC GAG</u> TTC CCT CCG CGC TCC CCC-3’
Adamts2pro_-530R (530bç reverse)	74	24	5’- <u>CTC GAG</u> TGA ATT CCA GGG CTG ATG-3’

Öncelikli olarak [-1899/+112], [-1367/+112], [-915/+112] arasındaki bölgeler çoğaltılmaya çalışıldı. Sekonder yapıların oldukça kompleks olması, GC baz içeriğinin yüksek olması ve ardışık tekrarların yoğun olarak bulunmasından dolayı [-658/+112], [-530/+112], [-368/+112] ve [-180/+112] arasında belirlenen bölgenin amplifikasyonu için primerler dizayn edildi (Tablo 3.1). Şekil 3.2 tasarlanan primerlerin promotor bölgesi üzerinde bağlandığı bölgeleri göstermektedir.

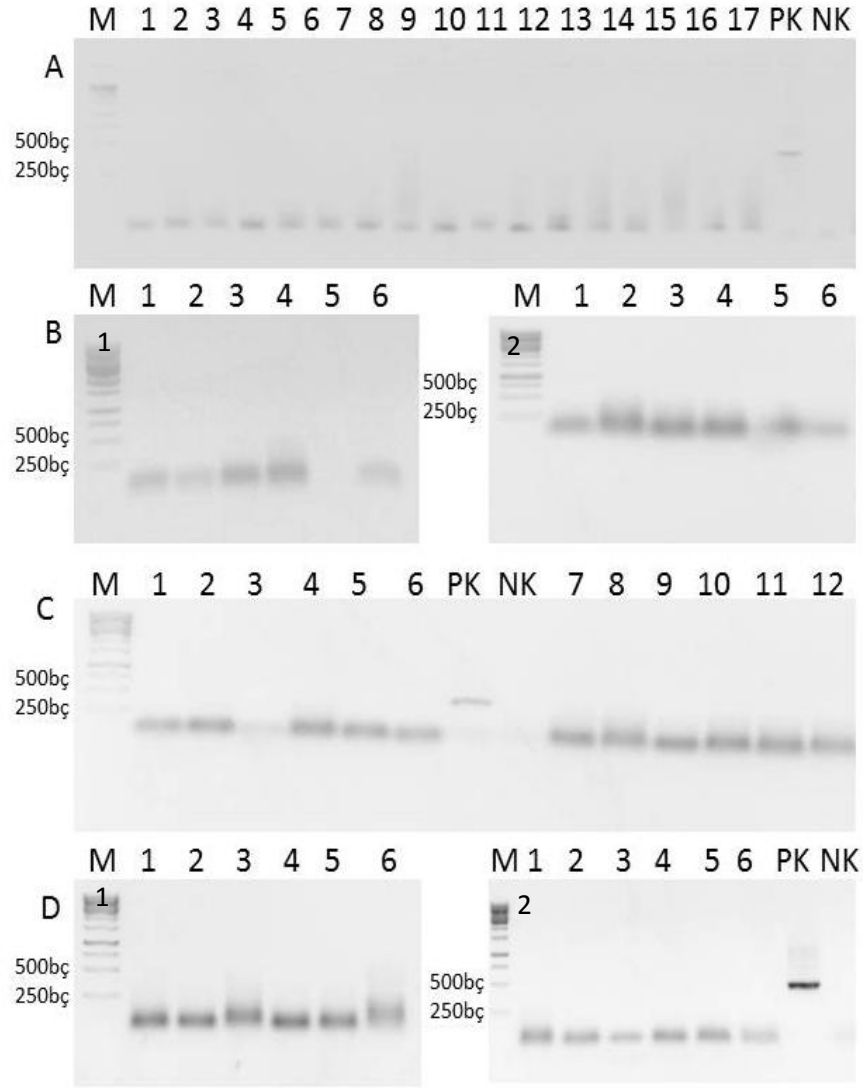


Şekil 3.2: *ADAMTS2* promotor amplifikasyonu için tasarlanan primerlere ait diyagram

3.1.3 *ADAMTS2* Promotorunun Klonlanması İçin Kullanılan Yüksek GC Baz Oranına Sahip Dizilere Özel PCR Stratejileri

3.1.3.1 Farklı Enzim Sistemleri

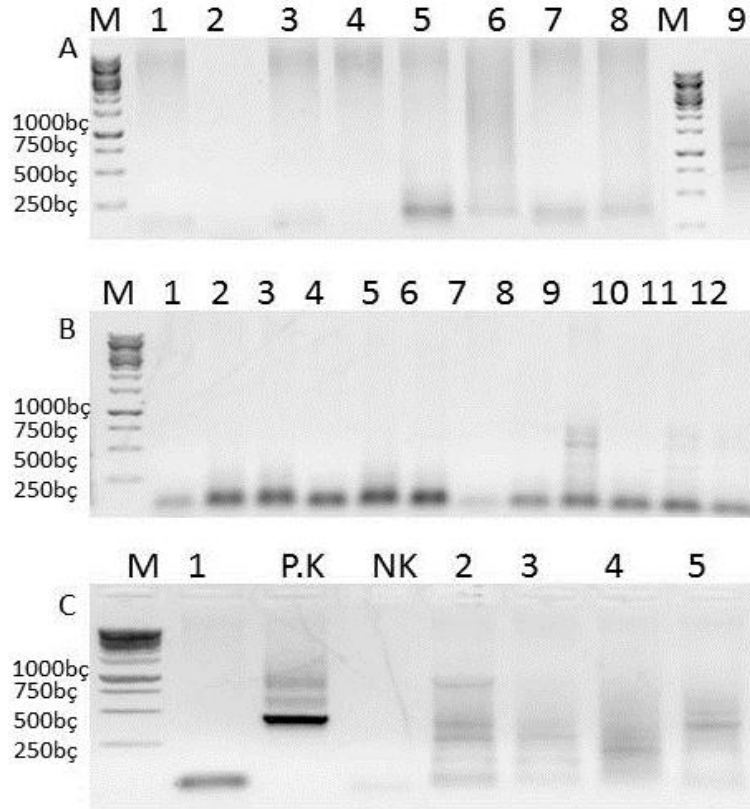
ADAMTS2 promotor bölgesinin PCR ile çoğaltılabilmesi için öncelikle *Taq* DNA polimeraz enzimi (Fermentas) kullanıldı. Bu amaçla PCR amplifikasyonları Bölüm 2.2.2.2’de belirtildiği şekilde kuruldu. *Taq* DNA polimeraz enzimi kullanılarak farklı bağlanma sıcaklığı, farklı PCR tampon sistemleri, farklı primer kombinasyonları, farklı genomik DNA konsantrasyonları ve PCR kuvvetlendiricisi olarak sadece DMSO ortama eklenerek amplifikasyon çalışmaları yapıldı. Şekil3.3’te yapılan PCR sonuçlarına ait toplu bir agaroz jel görüntüsü verilmektedir. Bu çalışmalarda *Adamts2pro_+112* forward, *Adamts2pro_-1367* reverse ve *Adamts2pro_-1899* reverse primerleri kullanıldı. 1899bç ve 1479bç büyüklüğünde ürün eldesi amaçlanmaktadır. Genomik DNA ve $MgCl_2$ konsantrasyon gradiyenti yapıldı. Amonyum sülfat ve potasyum klorür içeren tampon sistemi tercih edildi. Ayrıca pozitif kontrol olarak GAPDH çalışıldı. Şekilde A, B, C ve D ile belirtilen jel görüntülerinde sırasıyla; 58 °C, 60 °C, 62 °C ve 65 °C bağlanma sıcaklıklarıyla çalışıldı. Ancak istenilen büyüklükte amplifikasyon elde edilemedi.



Şekil 3.3: *Taq* DNA polimeraz enzimi kullanılarak yapılan PCR çalışmaları. A: 58 °C Tm ile çalışılan grup; 1-6 Adamts2pro_ +112 F ve Adamts2pro_-1899R primerleri ile çalışıldı., 6-12: Adamts2pro_ +112 F ve Adamts2pro_-1367R primerleri ile çalışıldı., 12-17: Adamts2pro_+112F2 ve Adamts2pro_-1367R primerleri ile çalışıldı. B: 60 °C Tm ile çalışılan grup; B1: Adamts2pro_ +112 F ve Adamts2pro_-1899R primerleri ile çalışıldı., B2: Adamts2pro_ +112 F ve Adamts2pro_-1367R primerleri ile çalışıldı. C: 62°C Tm ile çalışılan grup; 1-6: Adamts2pro_ +112 F ve Adamts2pro_-1899R primerleri ile çalışıldı., 6-12: Adamts2pro_ +112 F ve Adamts2pro_-1367R primerleri ile çalışıldı., D: 65°C Tm ile çalışılan grup; D1: Adamts2pro_+112F2 ve Adamts2pro_-1367 R primerleri ile çalışıldı., D2: Adamts2pro_+112F2 ve Adamts2pro_-1899R primerleri ile çalışıldı.

Ayrıca PCR çalışmalarında DNA çoğaltımındaki zorluk nedeniyle farklı firmalara ait özel polimeraz enzimleri de kullanıldı. Bunlar Platinum *Taq* DNA

Polimeraz (Invitrogen), Expand High Fidelity (Roche), Dream Taq Green (Fermentas) ve Long Range (Qiagen) enzim sistemleridir. Şekil 3.4'te bu enzimler kullanılarak yapılan PCR sonuçlarına ait agaroz jel görüntüleri verilmektedir. Bu çalışmalarda Adamts2pro_+112 forward, Adamts2pro_-1367 reverse ve Adamts2pro_-1899 reverse primerleri kullanıldı. 1899bp ve 1479bp büyüklüğünde ürün beklenmektedir.

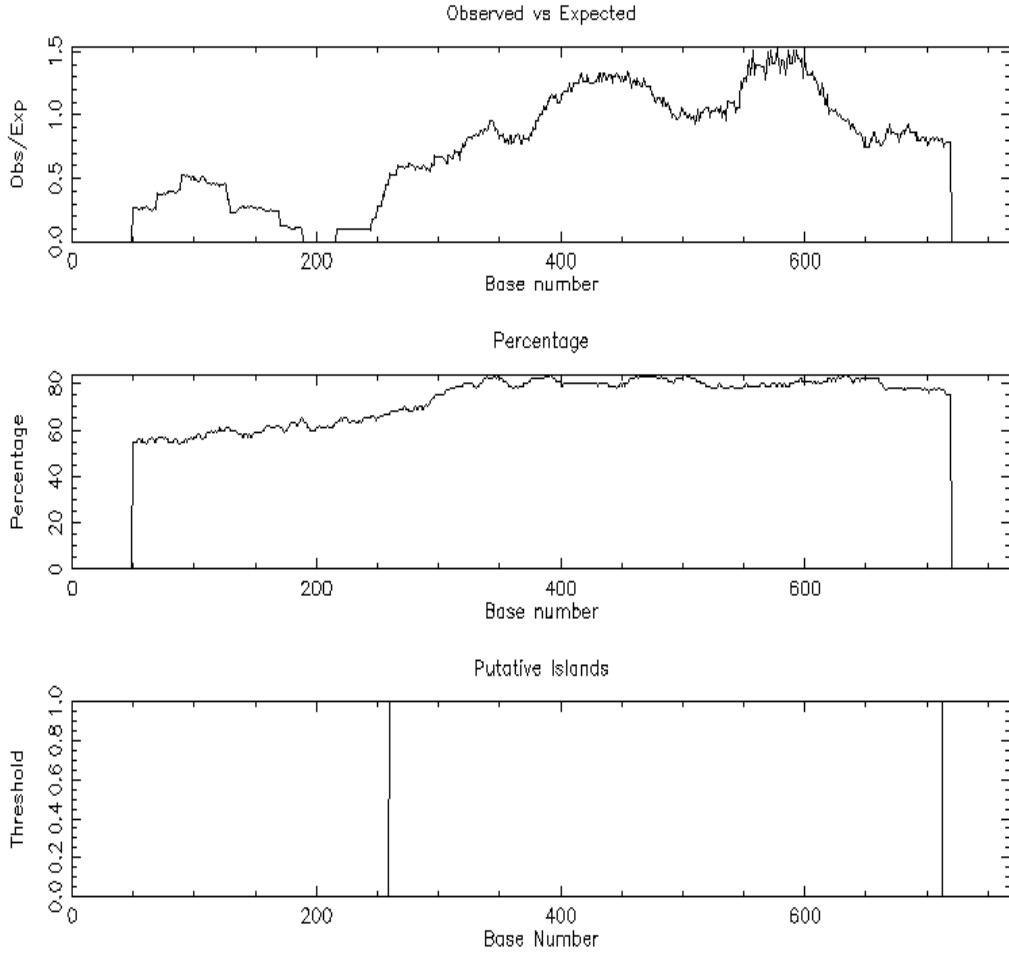


Şekil 3.4: Farklı DNA polimeraz enzimleri kullanılarak yapılan PCR çalışmaları. A: Platinum Taq DNA polimeraz enzimi kullanılarak çalışılan PCR, B : Expand High Fidelity DNA Polimeraz kullanılarak çalışılan PCR sonucu, C: Dream Taq Green DNA polimeraz enzimi kullanılarak çalışılan PCR sonucu.

3.1.3.2 Farklı PCR Yöntemleri

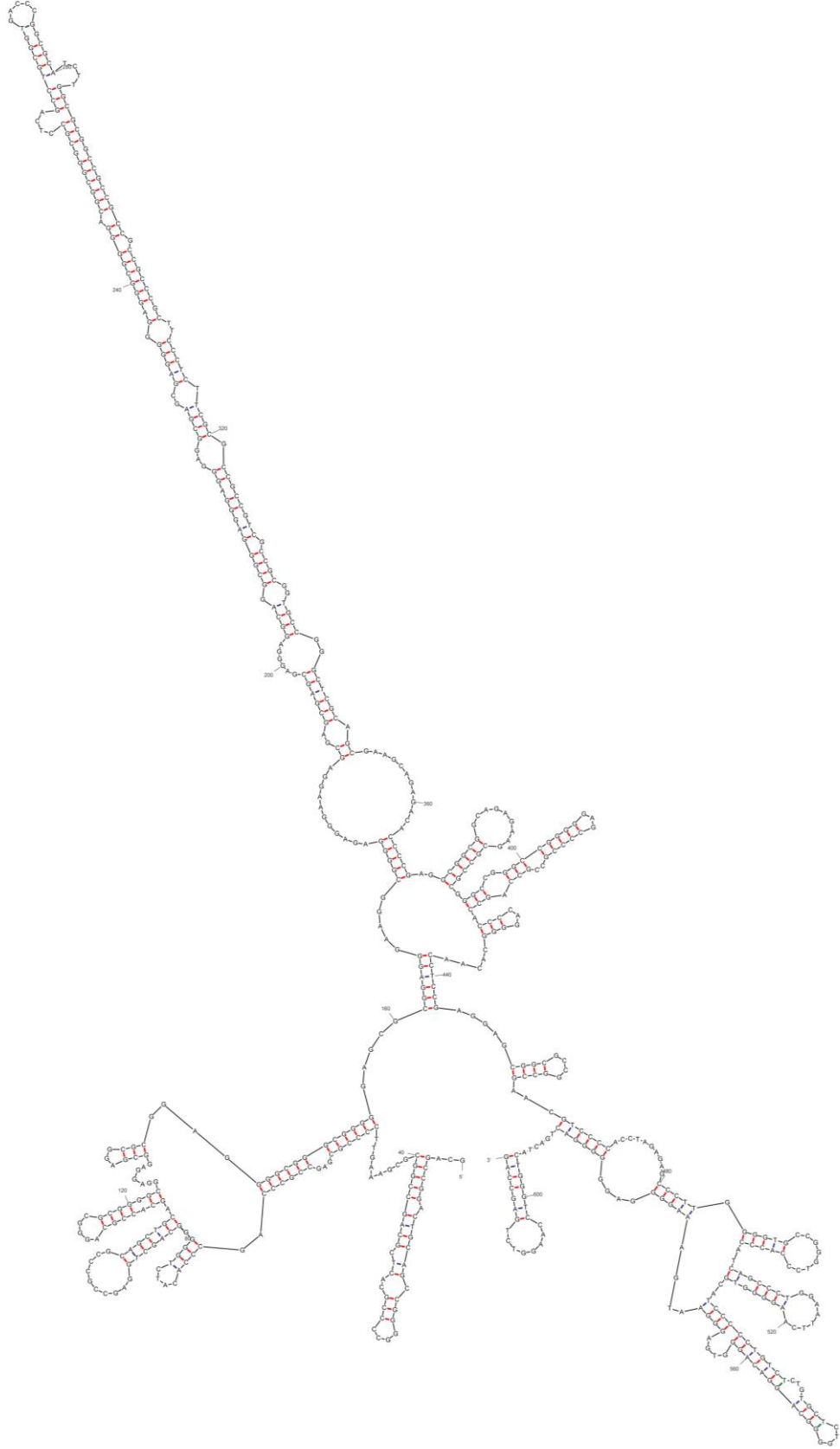
Bölgenin GC baz içeriği web tabanlı programlar (Emboss) kullanılarak analiz edildiğinde %72 oranında GC içeriği olan bir bölge olduğu anlaşıldı [65]. *ADAMTS2* promotor bölgesinin CpG adası analizi yapıldığında çalışılan bölgenin %80 CpG adası oluşturma potansiyeli olduğu belirlendi (Şekil 3.5) [66]. Bölgenin sekonder

yapı analizleri yapıldığında bu bölgenin oldukça fazla sekonder yapı ve tekrarlar içeren bir bölge olduğu anlaşıldı. (Şekil 3.6).



Şekil 3.5: *ADAMTS2* promotör bölgesi olası CpG adası bölgesi.

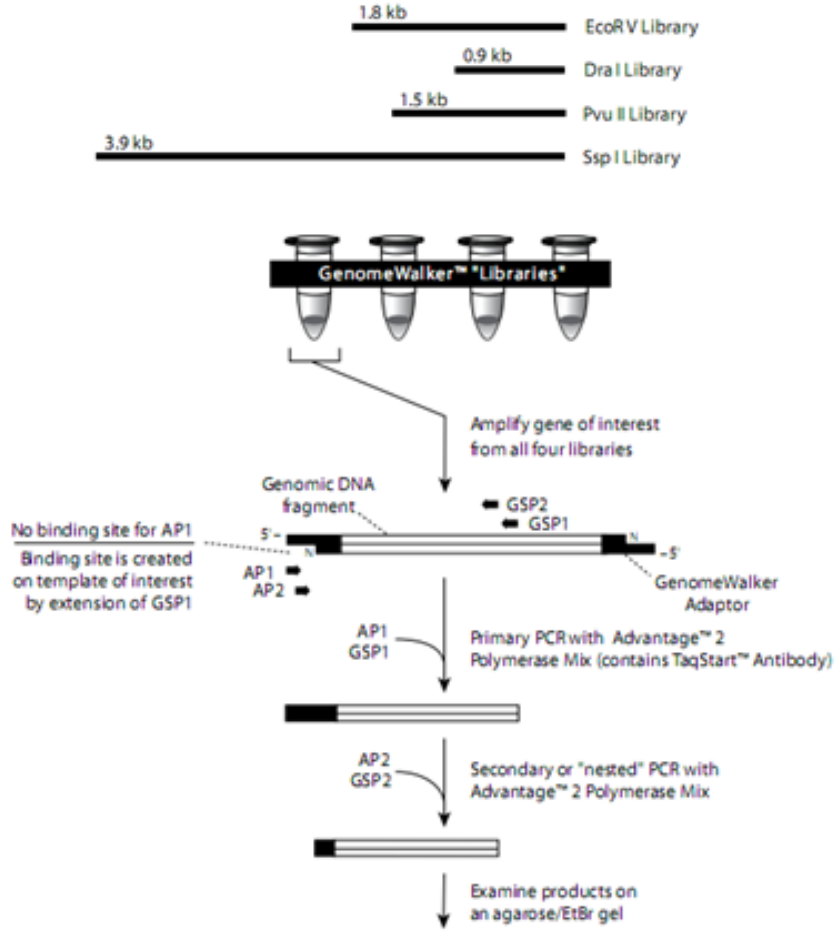
Bu analizler doğrultusunda GC bazları açısından zengin sekansların çoğaltılmasında oldukça fazla kullanılan Hot-Start PCR yöntemi, Hot-Start ile kombine edilmiş touch-down PCR yöntemi Bölüm 2.2.2.2 ve Tablo 2.14’te belirtildiği koşullarda uygulandı [67]. İstenilen büyüklükte amplifikasyon gözlenemedi.



Şekil 3.6: *ADAMTS2* promotor bölgesine ait olası sekonder yapı oluşumu.

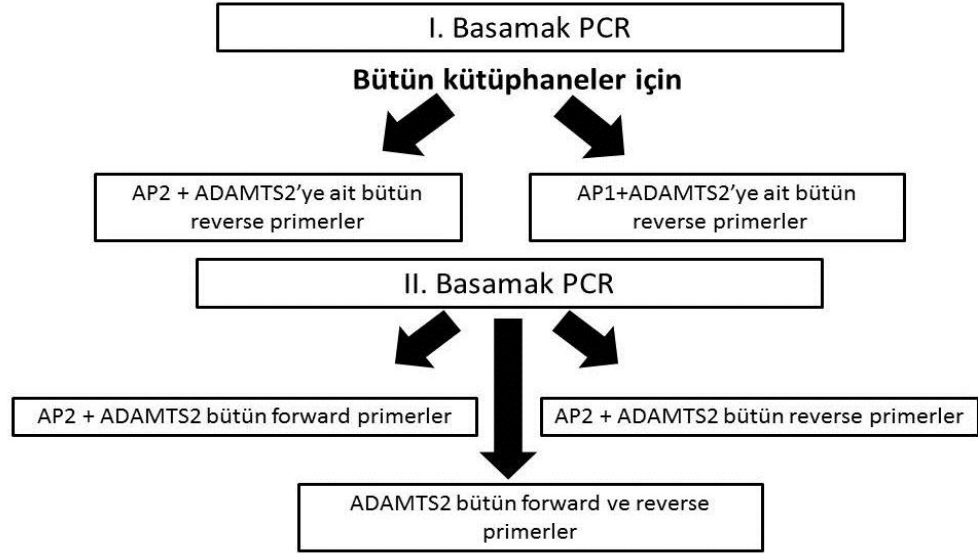
3.1.3.3 İnsan Genome Walker Stratejisi

Genome Walker Human Kit (Clontech) EcoRV, DraI, PvuII ve SspI restriksiyon enzimleriyle hazırlanmış çeşitli büyüklüklerde insan genomik DNA fragmentleri ve iki adet adaptör primeri içermektedir (Şekil 3.7). Bu kitede önerilen PCR çalışmaları iki basamaktan oluşmaktadır; ilk basamakta insan Genome walker kitede bulunan bu 4 kütüphane kalıp olarak kullanıldı. PCR adaptör primer I (API) ve *ADAMTS2* promotor forward primerleri ile Bölüm 2.2.2.2, Tablo 2.12’de belirtildiği şekilde çalışıldı.

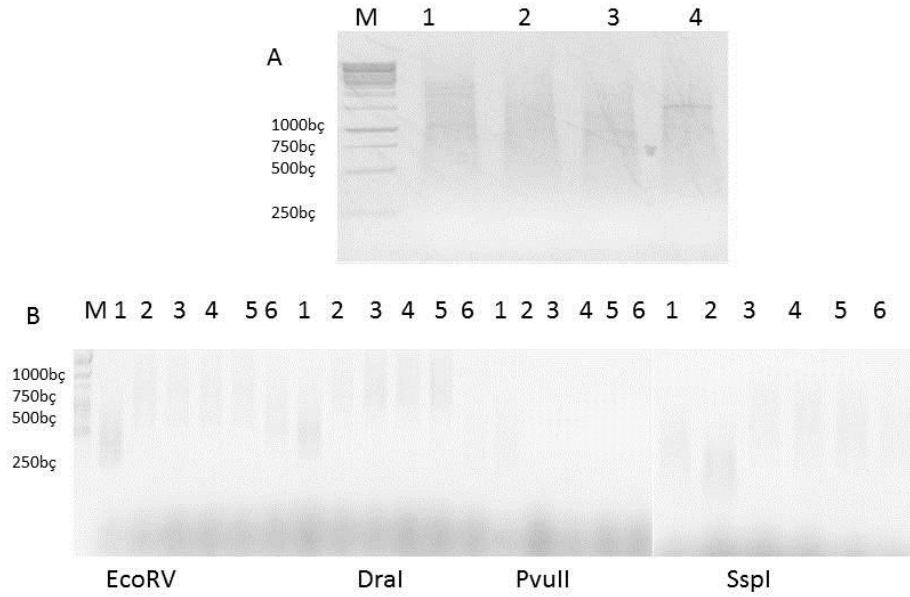


Şekil 3.7: Genome Walker Human Kit (Clontech) çalışma basamakları [68].

İkinci basamak PCR’da ise birinci basamak PCR sonuçları 50 kat sulandırılarak kalıp olarak kullanıldı. Olası tüm forward ve reverse primer kombinasyonları II. Basamak PCR’da kullanıldı (bkz. Şekil 3.8).



Şekil 3.8: İnsan genome walker kitinde I.ve II. basamakta kullanılan primerler.



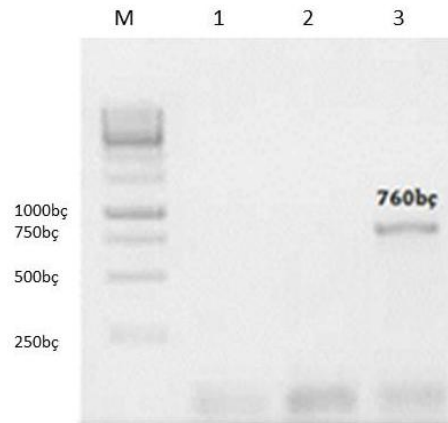
Şekil 3.9: Genome walker I. ve II. Basamak sonuçlarıA; I. Basamak PCR sonuçları; M: Büyüklük belirteci (Fermentas SM0311) 1: EcoRV kütüphanesi, 2: DraI kütüphanesi, 3:PvuII kütüphanesi ve 4: kütüphanesi SspI Kütüphanesi. B; II.Basamak PCR sonuçları; 1-6: EcoRV kütüphanesi, 1-6: DraI kütüphanesi, 1-6:PvuII kütüphanesi, 1-6 SspI kütüphanesi.

3.1.3.4 Genomik DNA'nın Restriksiyon Enzimleriyle Kesilmesiyle Elde Edilen Ürünün Kalıp Olarak Kullanıldığı PCR Amplifikasyonları

ADAMTS2 promotör bölgesinde 2000 bç'lik bölgeyi kesmediği bilinen *XhoI* ve *Hind III* restriksiyon enzimleri kullanılarak bölüm 2.2.2.6'da belirtildiği koşullarda genomik DNA kesime uğrattıldı. Agaroz jel elektroforezinde kontrol edildikten sonra PCR amplifikasyonlarında kalıp olarak kullanıldı.

3.1.3.5 PCR Kuvvetlendiricileri

Literatürde rastlanan bazı çalışmalarda DMSO, 7-Deaza-GTP, Etilen Glikol, Betain ve Propandiol gibi bazı maddelerin PCR verimini arttırdığı aydınlatılmıştır [69]. PCR kuvvetlendiricilerinden reaksiyon ortamına çeşitli konsantrasyonlarda eklenerek çalışmalar tekrarlandı. Çalışmalar sonucu promotör bölgesine ait [-658/+112] bölge Bölüm 2.2.2.2'de belirtilen bileşen ve koşullarda başarılı bir şekilde çoğaltıldı. (bkz. Şekil 3.10)



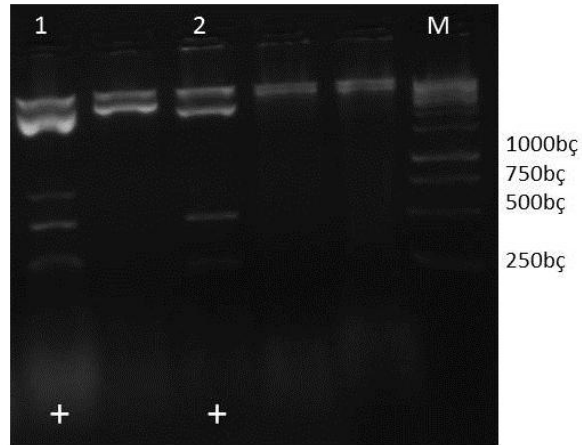
Şekil 3.10: *ADAMTS2* promotörü amplifikasyonu agaroz jel elektroforezi görüntüsü. M: 1kb Büyüklük belirteci (Fermentas, SM0311), 1:[+112/-1899] PCR sonucu, 2: [+112/-1367] PCR sonucu, 3:[-658/+112] PCR sonucu.

3.1.4 PCR Ürünlerinin pGEM-T Easy Vektör Sistemi'ne Ligasyonu ve *DH5a* Hücrelerine Transformasyonu

ADAMTS2 promotoruna ait 760bç büyüklüğündeki bant agaroz jelden geri kazanıldı (Bölüm 2.2.2.4). PCR ürünlerinin pGEM-T Easy vektör sistemi'ne (Promega) ligasyonu Bölüm 2.2.2.8'de belirtildiği koşullarda yapıldı. Ligasyon ürünleri ertesi gün bekletilmeden *E.coli DH5a* kompetan hücrelerine Bölüm 2.2.1.4'te anlatıldığı şekilde transforme edildi. Amfisilinli petrilere IPTG ve X-Gal yayılarak mavi-beyaz koloni seçimi uygulandı.

3.1.5 pGEM-T Easy Vektörüne Yapılan Ligasyonun Kontrolü

760bç'lik ligasyonun kontrolü amacıyla seçilen beyaz kolonilerden ön kültür hazırlanarak plazmit izolasyonu yapıldı. Daha sonra pGEM-T Easy vektör sisteminde çoklu klonlama bölgesinin her iki yanında tanıma bölgesi bulunan *EcoRI* restriksiyon endonükleaz enzimi kullanılarak Bölüm 2.2.2.6'da belirtildiği koşullarda kesim yapıldı (Şekil 3.11). Bu koloniden Bölüm 2.2.1.5'te anlatıldığı şekilde gliserol stok hazırlanıp -80 °C'de muhafaza edildi. Plazmitler dizilemeye gönderilerek kontrol edildi.



Şekil 3.11: *ADAMTS2* [+112/-658] promotor parçasının pGEMT Easy vektörüne ligasyonunun kontrolü. M: 1kb Büyüklük belirteci (Fermentas, SM0311), 1: 1 numaralı koloninin *EcoRI* kesim sonucu, 2: 2 numaralı koloninin *EcoRI* kesim sonucu.

3.1.6 Dizi Analizi

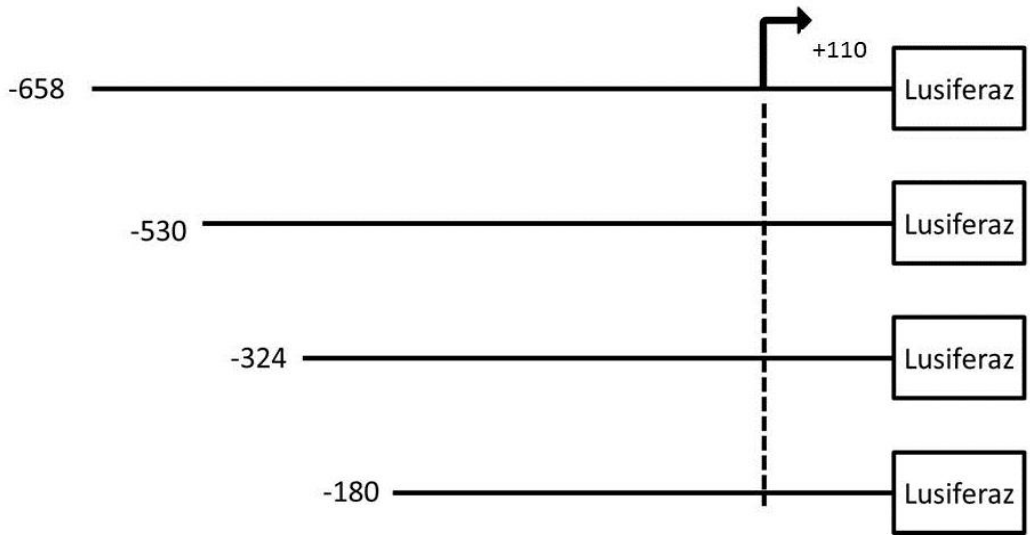
İnsan *ADAMTS2* promotor bölgesine ait 760bç'lik bölgeyi içeren plazmit PCR sırasında herhangi bir mutasyonun olup olmadığını kontrol edilmesi amacıyla REFGEN Biyoteknoloji'ye (Ankara) dizilemeye gönderildi. Dizileme sonuçları gen bankasında bulunan ve biyoinformatik olarak belirlenen muhtemel *ADAMTS2* promotor bölgesi olan dizi ile karşılaştırıldı (Şekil 3.12).

NCBI	4	GATCCAIGGCAGCCGGACTGCAGCCGGGGCCCCGCACTCGCAGCCGGCGGAAAAGTTCCC	63
ADAMTS2	1	GATCCAIGGCAGCCGGACTGCAGCCGGGGCCCCGCACTCGCAGCCGGCGGAAAAGTTCCC	60
NCBI	64	CGCGAGCCGCCAGCCACATCTGGGGGCAGCTGGAGCCGCCCCGCAGCTGCAGCACCGCA	123
ADAMTS2	61	CGCGAGCCGCCAGCCACATCTGGGGGCAGCTGGAGCCGCCCCGCAGCTGCAGCACCGCA	120
NCBI	124	GGGCGCGGGCGGAGGAGGCGAGGCGCGGAGGGGGCGGGGAGCGCGGAGGGAAGGC	183
ADAMTS2	121	GGGCGCGGGCGGAGGAGGCGAGGCGCGGAGGGGGCGGGGAGCGCGGAGGGAAGGC	180
NCBI	184	GGGGAGAGGGAAGGAGCGAGCGAGCGAGGGAGGCAGGCGGGAGGGAGGGAGCGAGCGAG	243
ADAMTS2	181	GGGGAGAGGGAAGGAGCGAGCGAGCGAGGGAGGCAGGCGGGAGGGAGGGAGCGAGCGAG	240
NCBI	244	GGGGAGGGCGGGGACGCGGGCGCCTCAGCCTGCGGTGACCCGCGCCTCTTGGCGCGGC	303
ADAMTS2	241	GGGGAGGGCGGGGACGCGGGCGCCTCAGCCTGCGGTGACCCGCGCCTCTTGGCGCGGC	300
NCBI	304	CGCCGCGCGCCCGCCCTTCCCTCTTCGCGCCGCGGTGCGCGGGTCCCGGGCTCGCAGCG	363
ADAMTS2	301	CGCCGCGCGCCCGCCCTTCCCTCTTCGCGCCGCGGTGCGCGGGTCCCGGGCTCGCAGCG	360
NCBI	364	AAGCAGAGACACCCCGAGGCGCGGCAAGAGAAAGCGCCGCGGGCCGGGGAGCCCC	423
ADAMTS2	361	AAGCAGAGACACCCCGAGGCGCGGCAAGAGAAAGCGCCGCGGGCCGGGGAGCCCC	420
NCBI	424	GCCGCCAGCCACCCAGGGGCAACCTCCGAGGAGCGCGCCGGCCGACGTCGCCACC	483
ADAMTS2	421	GCCGCCAGCCACCCAGGGGCAACCTCCGAGGAGCGCGCCGGCCGACGTCGCCACC	480
NCBI	484	TAGAGAGCCCTTGGGGTGCCGGTCCACCCATCAGCCCTGGAATTCAAGGGTGCATCC	543
ADAMTS2	481	TAGAGAGCCCTTGGGGTGCCGGTCCACCCATCAGCCCTGGAATTCAAGGGTGCATCC	540
NCBI	544	CCCTGTCTCTGTGCTCTGGGGCAGGACAGGTTGAGGGAATGAAAGGGGAGGGGGACTGA	603
ADAMTS2	541	CCCTGTCTCTGTGCTCTGGGGCAGGACAGGTTGAGGGAATGAAAGGGGAGGGGGACTGA	600
NCBI	604	CTACTGGGTCCAAGGTCTGAGCCAGGCCGAATGCCCAAATAGAGGCCGCAAGGCCAGAA	663
ADAMTS2	601	CTACTGGGTCCAAGGTCTGAGCCAGGCCGAATGCCCAAATAGAGGCCGCAAGGCCAGAA	660
NCBI	664	GATGCTGTTAGGAGGGTACACCCAGGGCGCGACCCCAAAGATCAACTTTTGCCTTACTG	723
ADAMTS2	661	GATGCTGTTAGGAGGGTACACCCAGGGCGCGACCCCAAAGATCAACTTTTGCCTTACTG	720
NCBI	724	AGAGAGGCAAGGCTCCTTCAGTCCCCAGTTCCTTCTTCTCTGAAGTCCC	772
ADAMTS2	721	AGAGAGGCAAGGCTCCT-CAGTCCCCAGT-CCTC-TCCTTCTGAAGTCCC	766

Şekil 3.12: pGEM-T Easy vektörüne ligasyonu yapılan 760bç'lik *ADAMTS2* promotor bölgesinin dizileme sonuçlarının gen bankasındaki dizi ile karşılaştırılması.

3.2 Kısaltılarak Yapılan ADAMTS2 Promotor Parçalarının Oluşturulması

Bazal aktivitenin belirlenebilmesi amacıyla kısaltılarak mutasyona uğratılmış promotor parçaları oluşturuldu. Bu amaçla oluşturulması planlanan parçalar Şekil 3.13'te gösterilmektedir. Bunun için PCR'a dayalı sistem ya da restriksiyon kesimine dayalı strateji kullanıldı. Aşağıda Tablo 3.2'de hangi konstrakta hangi yaklaşımın kullanıldığı özet olarak belirtilmektedir. Takip eden bölümlerde konu detaylandırılacaktır.



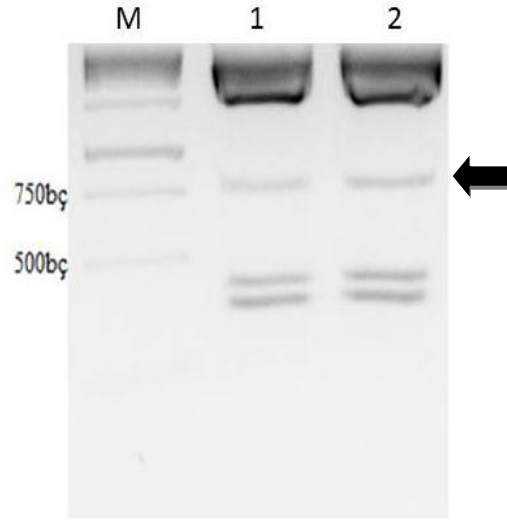
Şekil 3.13: Kısaltılarak oluşturulan ADAMTS2 promotor parçaları.

Tablo3.2: ADAMTS2 promotor parçalarının klonlama stratejileri.

Promotor Büyüklük	pGEMT Easy'e Klonlama	Klonlanacak DNA Parçası	pMetLuc Vektöre Klonlama Hazırlanması	Adlandırma
760 [-658/+112]	Genomik DNA'dan PCR.	pGEMT-Easy 760 <i>SacII/ XhoI</i> kısmi kesimi	<i>SacII /XhoI</i>	pMET_TS2_760_düz
324 düz [-324/+112]		pGEMT-Easy760 <i>ApaI/BamHI</i> kesimi	<i>ApaI/BglII</i>	pMET_TS2_324_düz
530 [-530/+112]	pGEMT Easy 760'dan	pGEMT Easy 530 <i>XhoI/HindIII</i> kesimi	<i>XhoI/HindIII</i>	pMET_TS2_530
180 [-180/+112]	pGEMT-Easy760'dan PCR	pGEMT Easy 180 <i>XhoI/HindIII</i> kesimi	<i>XhoI/HindIII</i>	pMET_TS2_180

3.2.1 *ADAMTS2* Promotorunun 760bç'lik Bölgesinin Kısmi Kesim Stratejisi ile pMetLuc Haberci Gen Vektörüne Klonlanması

ADAMTS2 promotorunun, 760bç'lik kısmının pMetLuc haberci gen vektörüne alt klonlanması amacıyla, pGEMT-Easy vektörüne klonlanmış 760bç'lik *ADAMTS2* promotoruna ait rekombinant plazmit Bölüm 2.2.2.6'da belirtildiği şekilde *SacII* ve *XhoI* enzimleriyle kısmi kesime uğratıldı. Kısmi kesim, uygun olmayan reaksiyon koşulları sağlayarak, DNA havuzunda farklı büyüklükte bantların görülmesidir. Bu amaçla *SacII* enzim miktarı 5 kat daha az kullanılmıştır. Koşullar Tablo 2.15'te belirtilmektedir. pMETLuc haberci gen vektörü Bölüm 2.2.2.6'da belirtildiği normal kesim şartları altında *SacII* ve *XhoI* enzimleri ile kesilerek hazırlandı. Kesimler agaroz jel elektroforezinde yürütülüp UV'de görüntüledikten sonra (Şekil 3.14) Bölüm 2.2.2.4'te anlatıldığı işlem basamaklarına göre jelden geri kazanıldı.



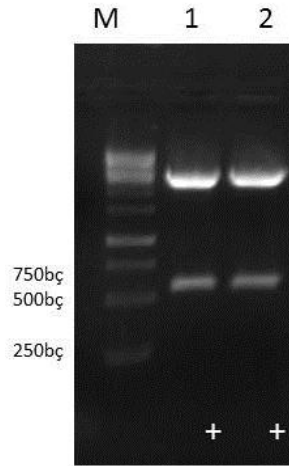
Şekil 3.14: Kısmi kesim agaroz jel görüntüsü.M: Büyüklük belirteci 1kb (Fermentas SM0311), 1-2:760bç'lik promotor parçası.

ADAMTS2 promotoruna ait 760bç'lik parçaya ait ligasyonun kontrolü dizi analizi ile yapıldı. Bu amaçla pMetLuc vektörü üzerinde yönü bilinen bir dizileme primeri tasarlandı (Tablo 2.11). Dizileme sonucu gen bankasında bulunan muhtemel *ADAMTS2* promotor bölgesi ile karşılaştırıldı. Yapılan biyoinformatik analiz sonucunda 760bç'lik bölgenin haberci gen vektörü içerisine transkripsiyonun başlangıç bölgesinin uygun yerleşimli klonlandığı tespit edildi. Rekombinant olduğu

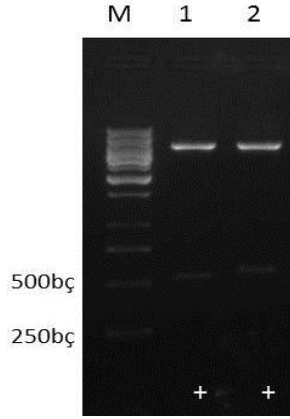
tespit edilen kolonilerden Bölüm 2.2.1.5'te anlatıldığı şekilde gliserol stok hazırlanarak -80 °C dondurucuda muhafaza edildi.

3.2.1 *ADAMTS2* Promotorunun 530bç'lik Bölgesinin pMetLuc Haberci Gen Vektörüne Klonlanması

ADAMTS2 promotoruna ait 760bç'lik parça kalıp olarak kullanılarak 530bç'lik reverse ve forward primerler kullanılarak (Tablo 3.1) Bölüm 2.2.2.2'de belirtildiği koşullarda PCR yapıldı. Amplifikasyon ürünleri agaroz jele yüklenerek kontrol edildi ve sonra jelden geri kazanıldı. Öncelikle T:A klonlama stratejisine göre pGEM-T Easy vektörü ile Bölüm 2.2.2.8'de belirtildiği şekilde ligasyon kurularak bir gece +4°C'de inkübasyona bırakıldı. Ligasyon *XhoI/HindIII* kesimi ile Bölüm 2.2.1.6'da belirtildiği koşullarda kontrol edildi (Şekil 3.15).



Şekil 3.15: 530bç'lik *ADAMTS2* promotor parçasının pGEMT Easy vektöre olan ligasyonunun kontrolü. M: 1kb büyüklük belirteci (Fermentas, SM0311).



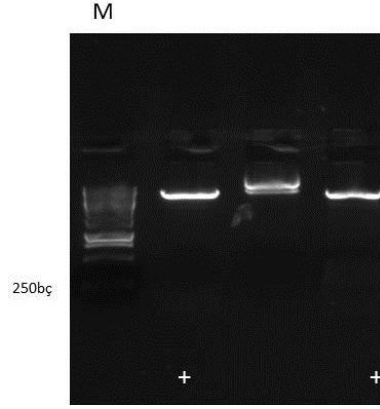
Şekil 3.16: 530bç'lik ADAMTS2 promotor parçasının pMetLuc haberci gen vektörüne ligasyonunun kontrolü, M: 1kb büyüklük belirteci (Fermentas, SM0311).

530bç'lik parçanın pMetLuc haberci gen vektörüne alt klonlanması amacıyla pGEM-T Easy vektör 'den 530 bç'lik *ADAMTS2* promotor parçası *XhoI/HindIII* kesimi ile Bölüm 2.2.2.6'da belirtildiği gibi kesilerek çıkarıldı. pMetLuc vektörü de aynı enzimlerle kesilerek hazırlandı ve Bölüm 2.2.2.8'de belirtildiği şekilde ligasyona bırakıldı. Ligasyon ürünleri kompetan hücrelere Bölüm 2.2.1.4'te belirtildiği şekilde transforme edilerek oluşan kolonilerin rekombinant olup olmadığı restriksiyon endonükleaz enzim kesimi ile tarandı (Şekil3.16).

3.2.2 *ADAMTS2* Promotorunun 324bç'lik Bölgesinin pMetLuc Haberci Gen Vektörüne Klonlanması

ADAMTS2 promotorunun, 324bç'lik kısmının pMetLuc haberci gen vektörüne düz oryantasyonda alt klonlanması amacıyla, önceden pMetLuc vektörüne klonlanmış olan 760bç'lik *ADAMTS2* promotoruna ait bölge *ApaI* ve *BglII* ile pMetLuc vektörü ise *ApaI* ve *BamHI* restriksiyon enzimleri ile kesime uğratıldı (Bölüm 2.2.2.6). 324bç'lik bölge jelden kesilerek geri kazanıldı. Kazanılan ürünler Fermentas T4 DNA Ligaz enziminde belirtilen koşullara göre Bölüm 2.2.2.8'de belirtildiği koşullarda +4 °C'de bir gece ligasyona bırakıldı. Ligasyon ürünleri kompetan *E.coli*, *DH5α* hücrelerine Bölüm 2.2.1.4'te belirtildiği şekilde transforme edildi. Transformasyon kültürü rekombinant kolonilerin seçilebilmesi amacıyla kanamisin içeren LB agar petrilere yayıldı ve 1 gece boyunca 37 °C'de ters

çevrilerek inkübasyona bırakıldı. 324bç'lik ligasyonun kontrolü amacıyla ön kültür hazırlanarak küçük ölçekli plazmid izolasyonları yapıldı ve restriksiyon endonükleaz kesimleri uygulandı. Bu amaçla **i.PstI/EcoRI** , **ii.PstI/XhoI** restriksiyon enzimleri ile Bölüm 2.2.2.6'da belirtildiği koşullarda kesim yapıldı.

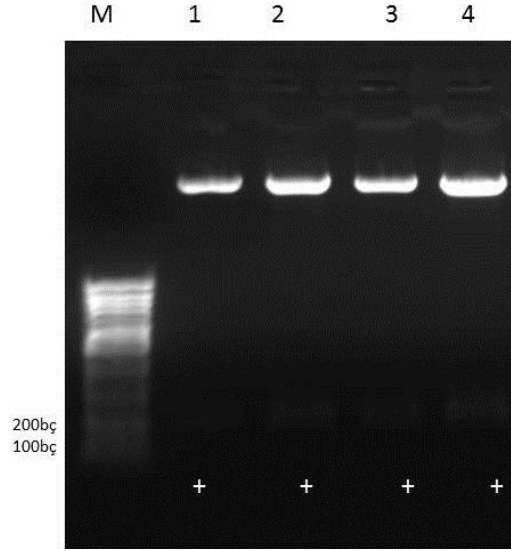


Şekil 3.17: 324bç'lik *ADAMTS2* promotor parçasının pMetLuc haberci gen vektörüne ligasyonunun kontrolü. M: 1kb büyüklük belirteci (Fermentas, SM0311).

Kesimler agaroz jel elektroforezinde yürütülüp UV'de görüntülendi ve fotoğraflandı. Buna göre 2. koloniye ait her iki kontrol kesiminde de 250bç'lik bölgede bant gözlemlendi (Şekil 3.17). Gliserol stoklar hazırlanarak -80 °C'de muhafaza edildi.

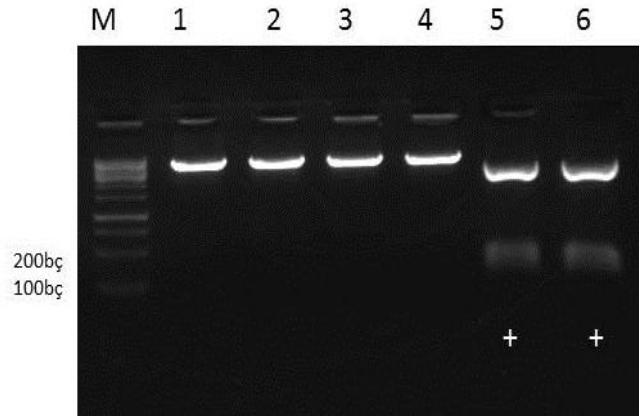
3.2.3 *ADAMTS2* Promotorunun 180bç'lik Bölgesinin pMetLuc Haberci Gen Vektörüne Klonlanması

ADAMTS2 promotoruna ait 760bç'lik parça kalıp olarak kullanılarak Bölüm 2.2.2.2'de belirtildiği koşullarda PCR çalışıldı. Forward primeri olarak *Adamts2pro_+112F2* ve reverse primeri olarak *Adamts2pro_-180R* kullanıldı (Tablo 3.1). Amplifikasyon ürünleri agaroz jele yüklenerek kontrol edildi ve jelden geri kazanıldı. Öncelikle T:A klonlama stratejisine göre pGEM-T Easy vektöre Bölüm 2.2.2.8'de belirtildiği şekilde ligasyon kurularak bir gece +4°C'de inkübasyona bırakıldı. Ligasyon *XhoI/HindIII* kesimi ile Bölüm 2.2.2.6'da belirtildiği koşullarda kontrol edildi (Şekil 3.18).



Şekil 3.18: 180bç'lik *ADAMTS2* promotor parçasının pGEMT Easy vektöre olan ligasyonunun kontrolü. M: 100bç büyüklük belirteci (Fermentas).

180bç'lik parçanın pMetLuc haberci gen vektörüne alt klonlanması amacıyla pGEMT Easy vektör'den 530 bç'lik *ADAMTS2* promotor parçası *XhoI/HindIII* kesimi ile Bölüm 2.2.2.6'da belirtildiği gibi kesilerek çıkarıldı. pMetLuc vektörü de aynı enzimlerle kesilerek hazırlandı ve Bölüm 2.2.2.8'de belirtildiği şekilde ligasyona bırakıldı. Ligasyon ürünleri kompetan hücrelere Bölüm 2.2.1.4'te belirtildiği şekilde transforme edilerek oluşan kolonilerin rekombinant olup olmadığı *EcoRI* enzim kesimi ile tarandı (Şekil3.19).



Şekil 3.19: 180bç'lik *ADAMTS2* promotor parçasının pMetLuc haberci gen vektörüne ligasyonunun kontrolü. M: 100bç büyüklük belirteci (Fermentas).

3.3 İnsan ADAMTS2 Promotorunun Karakterizasyonu

ADAMTS2 promotorunun dizilemeden gelen sonuçlarının karşılaştırılması ile klonlanan son dizi ve dizi üzerinde transkripsiyonun başlangıç bölgesi belirlendi. Bu amaçla ADAMTS2 cDNA dizisi ile ADAMTS2 promotor dizisi karşılaştırıldı. Klonlanan promotor dizisi ve transkripsiyonun başlangıç bölgesi (+1) Şekil 3.20’de gösterilmektedir. Yapılan biyoinformatik analizler sonucu ADAMTS2 promotorunun TATA kutusu içermeyen bir promotor olduğu belirlendi. Bunun yerine TATA kutusu içermeyen ökaryotik promotorlarda bulunan korunmuş GA kutusu motiflerinin oldukça yoğun olarak bulunduğu belirlendi.

Sıçan ve fare ADAMTS2 promotor bölgeleri gen bankasında tam olarak dizilenemediğinden sadece 5’UTR kısımları insan ADAMTS2 5’UTR bölgeleri ile karşılaştırıldı. Yapılan bu karşılaştırmada UTR kısımlarının oldukça korunmuş olduğu olduğu fakat insan ADAMTS2 5’UTR bölgesinin diğer türlere göre daha uzun bir bölge olduğu belirlendi (Şekil 3.20)

Ayrıca promotor üzerinde olası transkripsiyon faktörü bağlanma bölgeleri de belirlendi (Mathinspector). Bu bölgede transkripsiyon faktörü bağlanma motiflerinin oldukça yoğun olarak bulunduğu gözlenmektedir. Bunlardan bazıları Tablo 3.3’te belirtilmektedir. Ayrıca bazı diziler promotor üzerinde de gösterilmektedir. Bu bağlanma motiflerinin fonksiyonel olup olmadığının aktivite deneyleri ile test edilmelidir.

rat 5UTR	1	-----	-----	-----	-----	1
mouse 5UTR	1	-----	-----	-----	-----	1
human 5UTR	1	TCTTCCGCC	CGCGCCCTGC	GGTGCTGCAG	CTGCCGGGCGG	40
rat 5UTR	1	-----	-----GT	GGGCTGGGCG	GCGCGCGGGG	22
mouse 5UTR	1	-----	-CCCAGATGT	GGGCTGGGCA	GCGCGCGGGG	29
human 5UTR	41	CTCCAGCTGC	CCCCAGATGT	GGGCTGGGCG	GCTCGCGGGG	80
rat 5UTR	23	AACTTTCGCG	CCGGCTGCGA	GTGCGGGGCC	CCGGCTGCGG	62
mouse 5UTR	30	AACTTTCGCG	CCGGCTGCGA	GTGCGGGGCC	CCGGCTGCGG	69
human 5UTR	81	AACTTTCGCG	CCGGCTGCGA	GTGCGGGGCC	CCGGCTGCGA	120
rat 5UTR	63	TCCGGCTGCC	ATG-----	-----	-----	75
mouse 5UTR	70	TCCGGCTGCC	ATG-----	-----	-----	82
human 5UTR	121	TCCGGCTGCC	ATG-----	-----	-----	133

Şekil 3.20: İnsan ADAMTS2 5’UTR bölgesinin diğer türleri ile karşılaştırılması.

- 658 GACTTCAGAGGAAGAGGAACTGGGGACTGA - 629
Reverse Primer

- 628 AGGAGCCTTGCCTCTCTCAGTAAGGGCAAA - 599

- 598 AGTTGATCTTTGGGGTCGCGCCCTGGGTGT - 569

- 568 ACCCTCCTAACAGCATCTTCTGGCCTTTGC - 539
Testis spesifik TF

- 538 GGCCTCTATTTGGGCATTCGGCCTGGCTCA - 509
Krueppel benzeri Östrojen RE

- 508 GACCTTGGACCCAGTAGTCAGTCCCCCTC - 479
Glukokortikoid RE

- 478 CCCTTTCATTCCCTCACCTGTCCTGCCCC - 449
cEBP Sp1

- 448 AGAGCACAGAGACAGGGGGATGCACCCCTT - 419
NF-KB

- 418 GAATTCCAGGGCTGATGGGTGGGACCCGGC - 389

- 388 ACCCCAAGGGCTCTCTAGGTGGGGACGTTC - 359
HIF

- 358 GGCCGGCGCCGCTCCTCGGAGGTTGTGCC - 329

- 328 CTGGGGTGGCTGGCGGGGGCTCCCCGG - 299
NF-KB

- 298 CCCGGCCCGCGGCGCTTCTCTGCCGCCGCC - 269

Şekil 3.21: *ADAMTS2* [-658/+112] promotoru üzerinde muhtemel transkripsiyon faktörü bağlanma bölgeleri ve motifleri.

Tablo 3.3: *ADAMTS2* promotoru üzerinde bağlanma motifleri bulunan transkripsiyon faktörleri ve bağlanma bölgeleri.

TF	Motif	Bağlanma Bölgesi
E2F	AGCCGGCGCGAAAGTTC	(+52/+68)(-25/-9)
GC/sp1	CGGAGGGGCGGGCGGGG	(-54/-37)
GA kutusu	CGGGGAGAGGGAAGGAGCGAGCGAG	(-110/-68),(-211/-203)
AP4	GGGGGCAGCTGGAGCCG	(+26/+10)
Krueppel like	GAATGCCCAAATA	(-532/-520)(-141/-125)
Testis spesifik TF	AGGAGGGTACA	(-575/-567)
cEBP	AGGGTGAGGGAATGA	(-473/-459)
Glukokortikoid RE	TTCCCTCACCTGTCCTGC	(-470/-452)
Sp1	CTCTGGGGCAGGACAGG	(-461/-446)(-148/-132)
HIF	GTGGGGACGTTCCGCCG	(-370/-354)
NF-κB	AGGGGGATGCACCCC	(-434/-420)(-300/-314)
Östrojen RE	GTCCAAGGTCTGAGCCAGGCCG	(-522/-5039)

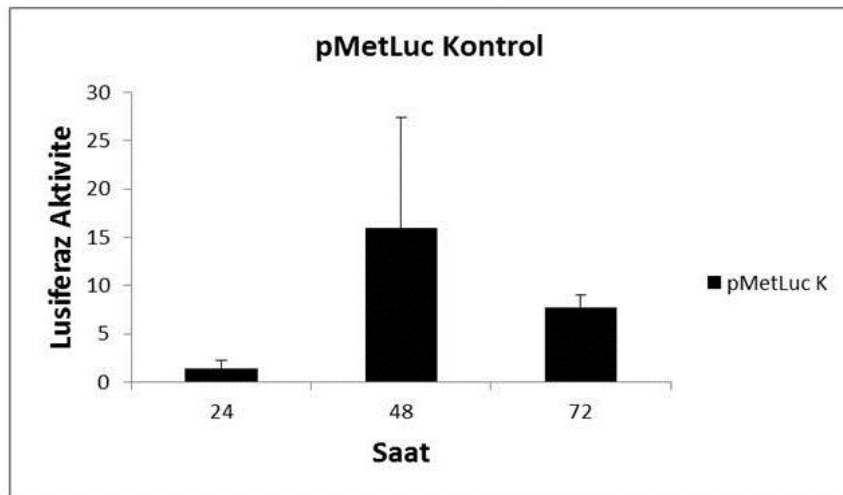
3.4 İnsan *ADAMTS2* Promotorunun Fonksiyonel Analizi

3.4.1 Saos Hücrelerinde Kalsiyum-Fosfat Presitasyonu ile Geçici Transfeksiyonun Salınan Lusiferaz Sisteminde Optimize Edilmesi

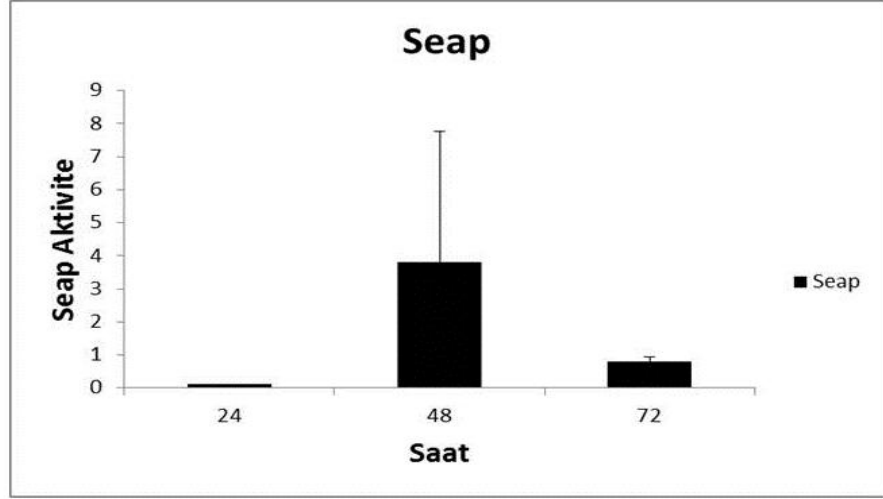
Geçici transfeksiyon çalışmalarında ön ekspresyon çalışmaları ile *ADAMTS2*'yi ifade ettiği belirlenen Saos hücreleri model olarak seçildi. Geçici transfeksiyon deneyleri, kalsiyum-fosfat presipitasyonu yöntemiyle bu hücre hattında çalışıldı. Bu hücrelerde transfeksiyonun optimizasyonu amacıyla öncelikle pMetLuc Kontrol, pMetLuc Reporter ve pSeap2-Kontrol vektörleri (bkz. Şekil 2.2, Şekil 2.3 ve Şekil 2.5) kalsiyum fosfat presipitasyonu yöntemi ile Bölüm 2.2.4'te belirtildiği gibi

hücrelere transfekte edildi. pMetLuc Kontrol vektörü viral promotor içermektedir ve transfeksiyonda oldukça yüksek aktivite göstermesi beklenmektedir. Bu nedenle transfeksiyon etkinliğinin ölçülmesi amaçlı kullanılan pozitif kontroldür. pMetLuc Reporter vektörü, *ADAMTS2* promotor parçalarını klonladığımız normalde promotor içermeyen bir vektördür. Klonlama yapılmamış olan (boş) pMetLuc vektörü arka plan aktivite verip vermediği konusunda negatif kontrol olarak kullanılmaktadır. pSeap2-Kontrol vektörü ise yine viral promotora sahip transfeksiyon sonucunda yüksek alkalen fosfataz aktivitesi veren bir vektördür. Tüm kuyucuklara 0,5 µg olacak şekilde *ADAMTS2* promotor parçalarıyla birlikte normalizasyon amaçlı verilmektedir. Elde edilen lusiferaz aktivitesi Seap verilerine oranlanarak relatif lusiferaz aktivitesi elde edilmektedir.

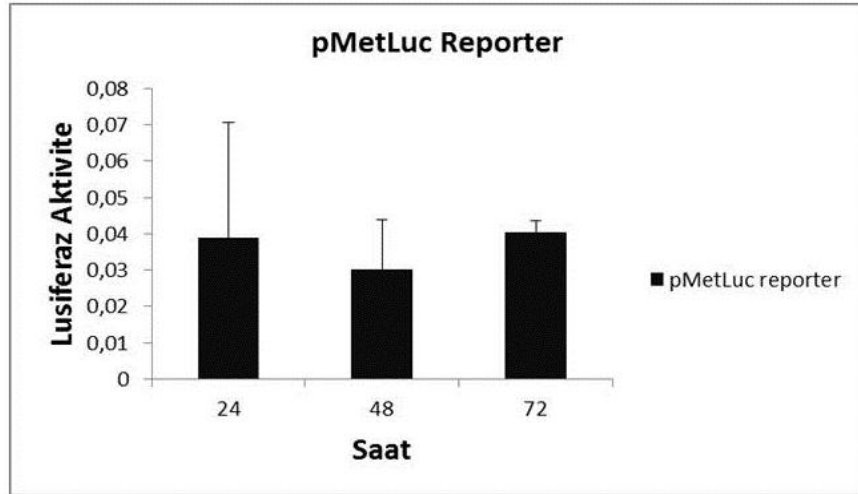
Kalsiyum-fosfat presipitasyonu ile geçici transfeksiyon çalışmaları Bölüm 2.2.4'te anlatıldığı üzere 12 kuyucuklu plakalarda ve her kuyucuk için 500.000 hücre ile yapıldı. Kontrol plazmitleri transfeksiyonda 0,5 µg kullanıldı. 48 ve 72 saat inkübasyon süreleri sonunda 100 µl medyum alınarak lusiferaz ve seap aktiviteleri Bölüm 2.2.4.1.1 ve 2.2.4.22'de belirtildiği şekilde ölçüldü. Saos hücre hattına transfeksiyonu yapılan kontrol gruplarının lusiferaz ve Seap aktiviteleri Şekil 3.22, Şekil 3.23 ve Şekil 3.24'te verilmiştir.



Şekil 3.22: pMetLuc kontrol vektörü lusiferaz aktivitesi.



Şekil 3.23: Seap kontrol vektörü salınan alkalın fosfataz aktivitesi.

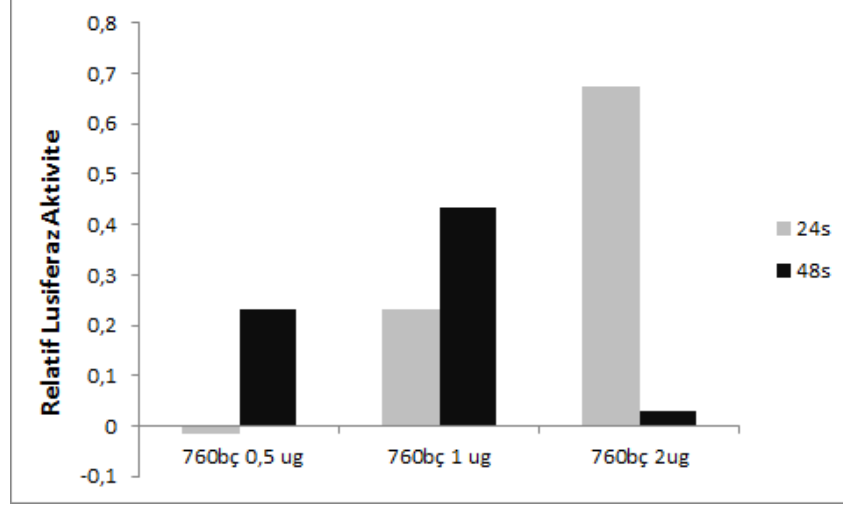


Şekil 3.24: pMetLuc haberci gen vektörü lusiferaz aktivitesi.

3.4.2 Bazal Promotor Aktivitesinin Belirlenmesi

Transfeksiyon çalışmalarında kullanılacak optimum plazmit miktarının belirlenebilmesi amacıyla klonlanan en büyük 760bc'lik *ADAMTS2* promotor parçası 0,5 µg, 1 µg ve 2 µg olacak şekilde 0,5 µg pSEAP kontrol vektörüyle birlikte Bölüm 2.2.4'te anlatılan şekilde hücrelere transfekte edildi. 24, 48 ve 72 saat inkübasyon süreleri sonrasında hücrelerden 100µl hücre kültürü medyumunu alınarak Bölüm

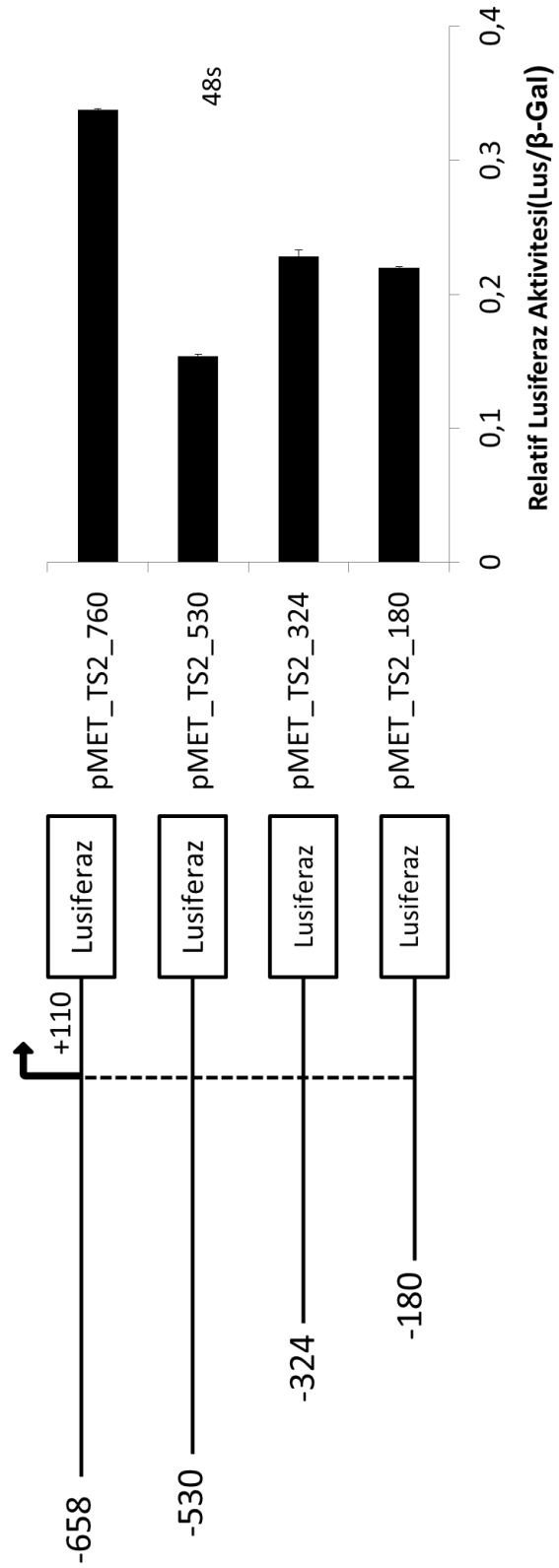
2.2.4'te belirtilen şekilde lusiferaz ve alkalın fosfataz aktiviteleri ölçüldü. Lusiferaz aktivitesi SEAP aktivitesi ile normalize edilerek hesaplandı (Şekil3.25).



Şekil 3.25: ADAMTS2 760bç promotor parçasının lusiferaz aktivite sonuçları.

Şekil 3.24'te görüldüğü gibi transfekte edilen DNA miktarının artırılması genel olarak ölçülen lusiferaz aktivitesinin de artmasını sağlamıştır. Yapılan bu optimizasyon daha sonraki basamaklarda transfeksiyon çalışmalarında kullanılabilir plazmit DNA miktarının belirlenmesinde etkili olmuştur.

Tüm promotor parçalarının bazal aktivitelerinin belirlenmesi amacıyla ADAMTS2 promotor parçaları 1 µg olacak şekilde transfeksiyonda kullanıldı. Lusiferaz değerleri β-galaktozidaz enzim sistemi ile normalize edildi. Buna göre hem 48 saat ölçümlerinde tüm promotor parçalarının aktiviteye sahip oldukları gözlemlenmiştir. Tüm lusiferaz aktiviteleri göz önünde bulundurulduğunda 760bç, 324bç ve 180 bç'lik promotor parçalarının yüksek aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir (Şekil 3.26).

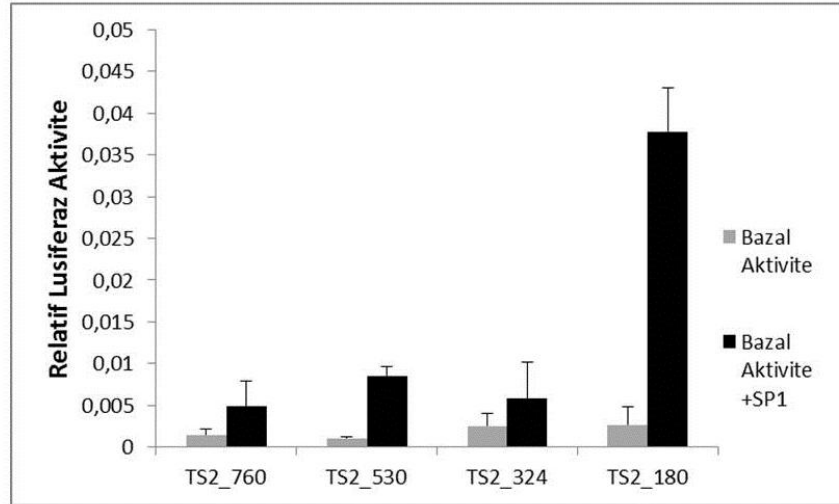


Şekil 3.26: ADAMTS2 promotör parçalarının karşılaştırmalı bazal aktiviteleri.

3.4.3 Kotransfeksiyon Çalışmaları

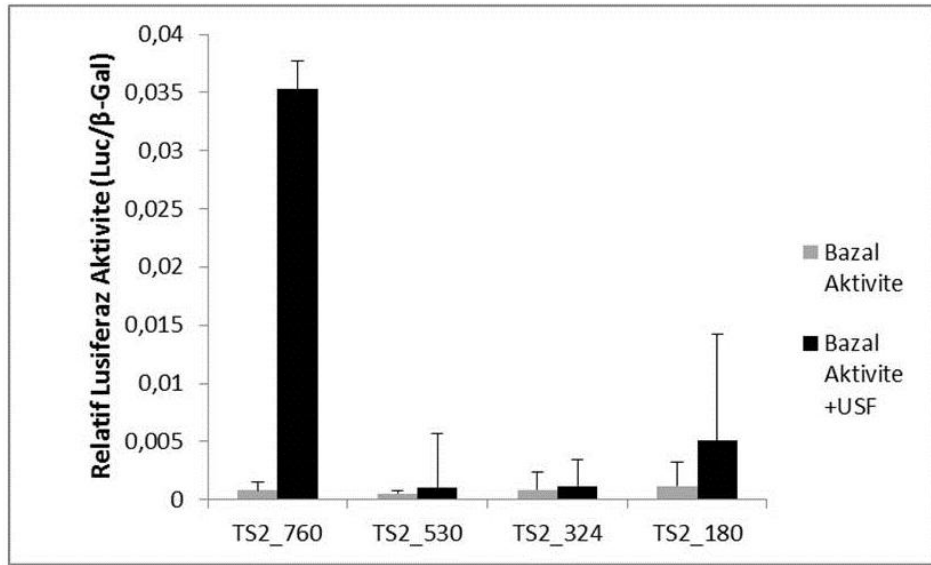
MatInspector programı ile insan *ADAMTS2* geni promotoruna bağlanması muhtemel transkripsiyon faktörleri belirlendi (bkz EK-E). Belirlenen bu bölgelerden Sp1 ve Usf'nin fonksiyonel olup olmadığı kotransfeksiyon çalışmalarıyla belirlendi. Bu transkripsiyon faktörlerinden hSp1 ve hUsf'yi içeren ekspresyon vektörleri kotransfeksiyon çalışmalarında kullanıldı (Bu plazmitler Dr. Dipak Ramji, Cardiff Üniversitesi, İngiltere'den temin edilmiştir).

Kotransfeksiyon analizlerinde 0,5 µg *ADAMTS2* promotor parçalarıyla birlikte, ilgili transkripsiyon faktörünün hücrede ektopik ekspresyonunu sağlayacak olan ekspresyon plazmitlerinden 0,5 µg ve normalizasyon amacıyla da 0,5 µg Seap kontrol plazmiti Saos hücrelerine kalsiyum fosfat presipitasyonu ile birlikte hücrelere Bölüm 2.2.4'te anlatıldığı şekilde transfekte edildi. Bazal aktivite sonuçları, ekspresyon vektörü transfekte edilen hücrelerdeki lusiferaz aktivitesi sonuçlarıyla karşılaştırılarak değerlendirildi (Şekil 3.27 ve Şekil 3.28).



Şekil 3.27: *ADAMTS2* promotor parçalarının hSP1 ile kotransfeksiyonu sonucu 48 saat karşılaştırmalı lusiferaz aktiviteleri.

Kotransfeksiyon sonuçları *ADAMTS2* promotor parçalarının bazal aktiviteleriyle karşılaştırıldığında Sp1 transkripsiyon faktörünün transkripsiyonel aktiviteyi arttırıcı yönde etki gösterdiği belirlendi. Özellikle en fazla 180 bç'lik *ADAMTS2* promotor parçası üzerinde arttırıcı yönde etkisi olduğu belirlendi. Bu sonuç çalışılan bu bölgede fonksiyonel Sp1 bağlanmalarının olabileceğine işaret etmektedir.



Şekil 3.28: *ADAMTS2* promotor parçalarının hUSF ile kotransfeksiyonu sonucu 48 saat karşılaştırmalı lusiferaz aktiviteleri.

Kotransfeksiyon sonuçları *ADAMTS2* promotor parçalarının bazal aktiviteleriyle karşılaştırıldığında hUsf transkripsiyon faktörünün transkripsiyonel aktiviteyi arttırıcı yönde etki gösterdiği belirlendi

3.4.4 EMSA

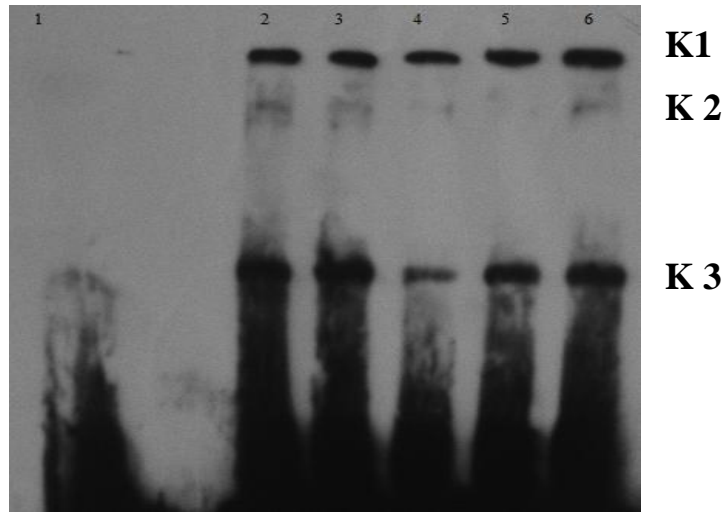
İnsan *ADAMTS* promotoruna bağlanması muhtemel transkripsiyon faktörleri biyoinformatik analizlerle belirlenmiştir. Transkripsiyon faktörlerinden Sp1, Usf, C/EBP ve Ap1'in *ADAMTS2* promotorunda ilgili bölgeye bağlanıp bağlanmadığının belirlenebilmesi amacıyla EMSA çalışmaları yapıldı. EMSA ile incelenen bölge Şekil 3.29'da gri ile işaretlenmiştir.

Tablo 3.4: EMSA çalışmalarında kullanılan primer dizileri.

ADAMTS2F*	CCCGCCTGCCTCCCTCGCTCGCTCGCTCCTTCCCTCT CCCCGCCTTCC CTCCGCG	Prob
ADAMTS2R	GGGCGGACGGAGGGAGCGAGCGAGCGAGGAAGGG AGAGGGGCGGA AGGGAGGCGCGAGGGG	Prob
DC_EBPF	TGCAGATTGCGCAAT	Yarışma deneyleri
DC_EBPR	TGCATTGCGCAATCT	Yarışma deneyleri
AP1F	GATCCTTCGTGACTCAGCGGGATCCTTCGTGAC	Yarışma deneyleri
AP1R	CCGCTGAGTCACGAAGGATCCCGCTGAGTCACG	Yarışma deneyleri
USFF	TCGACGGTGTAGGCCACGTGACCGGGTGT	Yarışma deneyleri
USFR	CGCACACCCGGTCACGTGGCCTACACCGT	Yarışma deneyleri
SP1F	TAGATTCGATCGGGGCGGGGCGAG	Yarışma deneyleri
SP1R	GCCCTCGCCCCGCCCGATCGAAT	Yarışma deneyleri

Oda sıcaklığında 20 dk inkübasyondan sonra bağlanma reaksiyonları denatüre olmayan jele yüklenerek 100 V akımda yürümesi sağlandı. Daha sonra naylon membrana transfer edildi. Proteinlerin membrana sabitlenmesinden sonra (cross-link) membran bloklanarak HRP bağlı streptavidin ile işaretlendi. Komplekslerin görüntülenmesi amacıyla membran ECL ile muamele edilip karanlıkta X-Ray filmine basıldı. Film tab edilerek kompleksler görüntüldü. Buna göre oluşan DNA-protein kompleksleri Şekil 3.30'da görülmektedir (K1, K2, K3). Sonuçlara göre; 4 numaralı kuyucukta 100 kat fazla olarak kullanılan biyotinsiz Usf probunun biyotinli *ADAMTS2* ile yarışarak ilgili bölgeye daha yüksek afinite gösterdiği ve bu nedenle oluşan kompleks³'te azalma meydana geldiği belirlendi. Elde edilen bu sonuçlar doğrultusunda Usf transkripsiyon faktörünün incelenen bölgeye fonksiyonel olarak bağlandığı sonucuna varıldı.

	1	2	3	4	5	6
ADAMTS2* prob	+	+	+	+	+	+
Saos nükleer ekstrakt	--	+	+	+	+	+
Biyotinsiz prob (100kat)	--	--	+	+	+	+
			Sp1	Usf	Cebp	Ap1



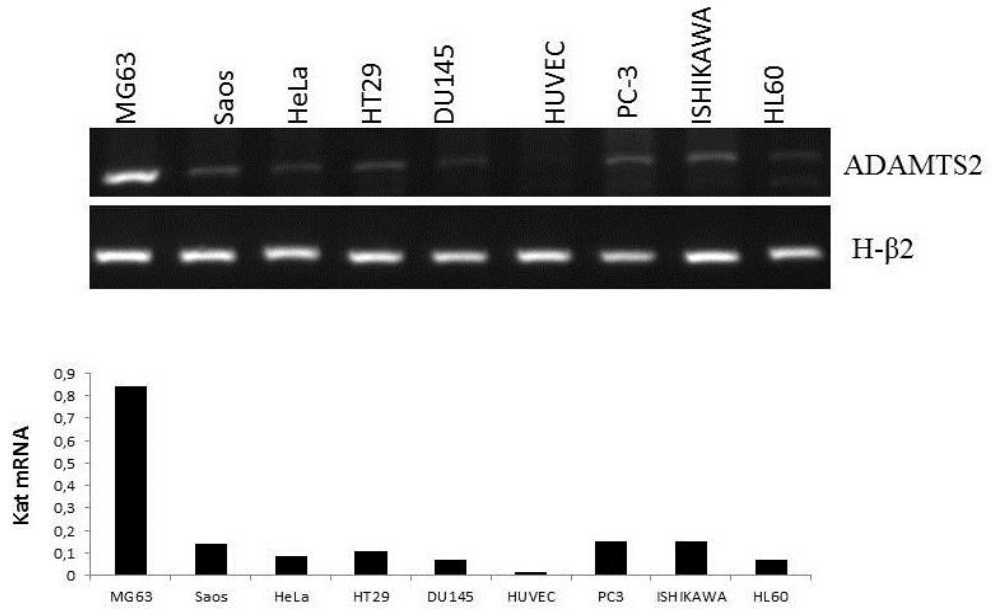
Şekil 3.30: *ADAMTS2* EMSA sonucu.

3.5 *ADAMTS2* mRNA Ekspresyon ve Protein Düzeyindeki Çalışmalar

3.5.1 *ADAMTS2*'nin Farklı Hücre Hatlarındaki Ekspresyon Seviyesinin Belirlenmesi

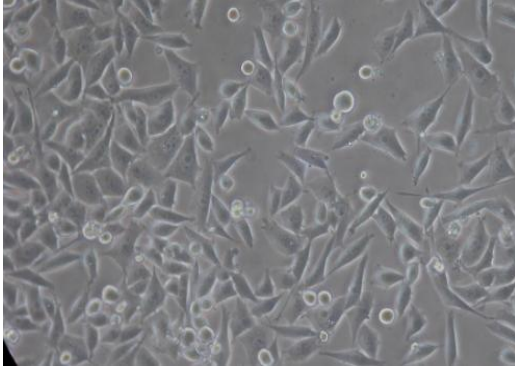
ADAMTS2'nin farklı hücre hatlarındaki ekspresyon seviyesinin belirlenebilmesi amacıyla MG-63 (İnsan osteosarkoma), Saos (İnsan osteosarkoma), HeLa (İnsan serviks kanseri), HT-29 (İnsan kolon kanseri), DU-145 (İnsan prostat kanseri), HUVEC (İnsan kordon endotel hücreleri), PC-3 (İnsan prostat kanseri), Ishikawa (İnsan endometrial adenokarsinoma) ve HL-60 (İnsan myeloid lösemi) hücreleri Bölüm 2.2.3.3'te anlatıldığı gibi büyütüldükten sonra RNA izolasyonu için pellet haline getirildi. Hazırlanan pelletlerden RNA izolasyonları yapıldı. RNA'ların miktar tayini, florimetrik ve spektrofotometrik olarak belirlendikten sonra cDNA

sentezi 1 µg RNA kullanılarak Bölüm 2.2.5.5'te belirtildiği şekilde yapıldı. PCR amplifikasyonları için için sentezlenen cDNA'ların 1 µl'si kalıp olarak kullanıldı. PCR çalışmalarında normalizasyon amaçlı olarak insan β-2 mikroglobulin geni kullanıldı. Şekil 3.31'de ADAMTS2'nin farklı hücre hatlarındaki analizleri verilmektedir. Ekspresyon çalışmalarında kullanılan hücre hatlarının fotoğrafları Şekil 3.32'de verilmiştir. Kullanılan primerler Tablo 3.5'te belirtilmektedir.

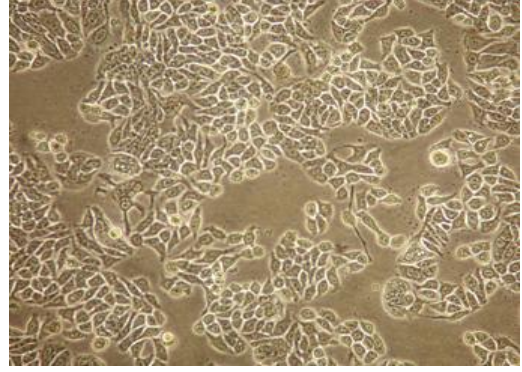


Şekil 3.31: ADAMTS2'nin farklı hücre hatlarındaki ekspresyon analizi.

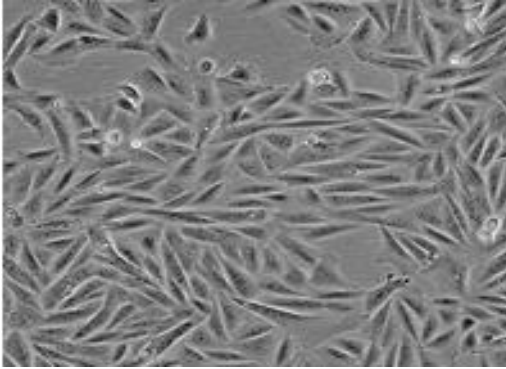
PCR sonuçları eşit miktarda agaroz jele yüklenerek yürütüldü ve görüntülendi. Sonuçlar densitometrik olarak analiz edildi. Normalizasyon amacıyla insan β-2 mikroglobulin verilerine oranlanlandı. Buna göre ADAMTS2 çalışılan hücre hatlarının hepsinde ifade edilmektedir. ADAMTS2 ifadesinin MG63 osteosarkoma modelinde en fazla olduğu, bunun yanısıra HUVEC kordon endotel hücrelerinde çalışılan diğer hücrelere göre oldukça az ifade olduğu belirlendi.



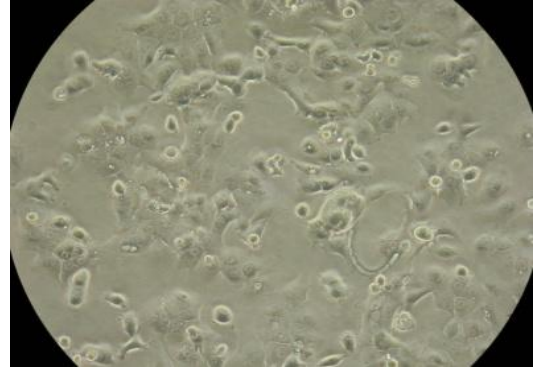
PC-3



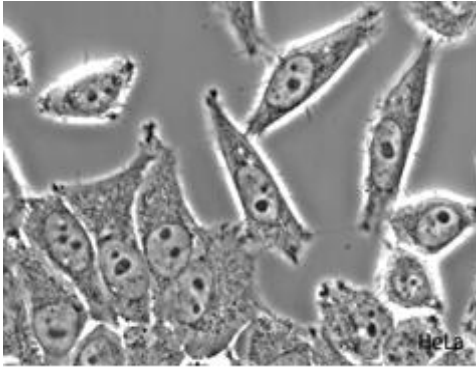
HT-29



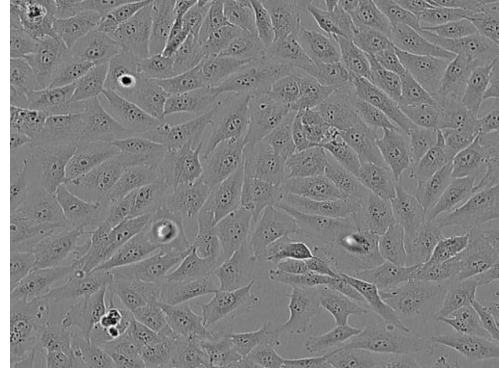
Saos



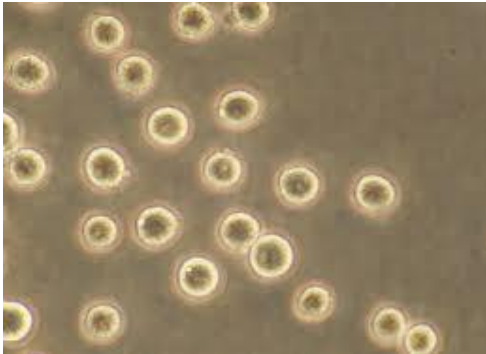
DU-45



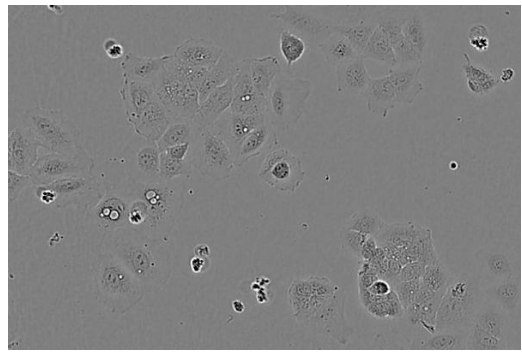
HeLa



MG-63



HL-60



Ishikawa

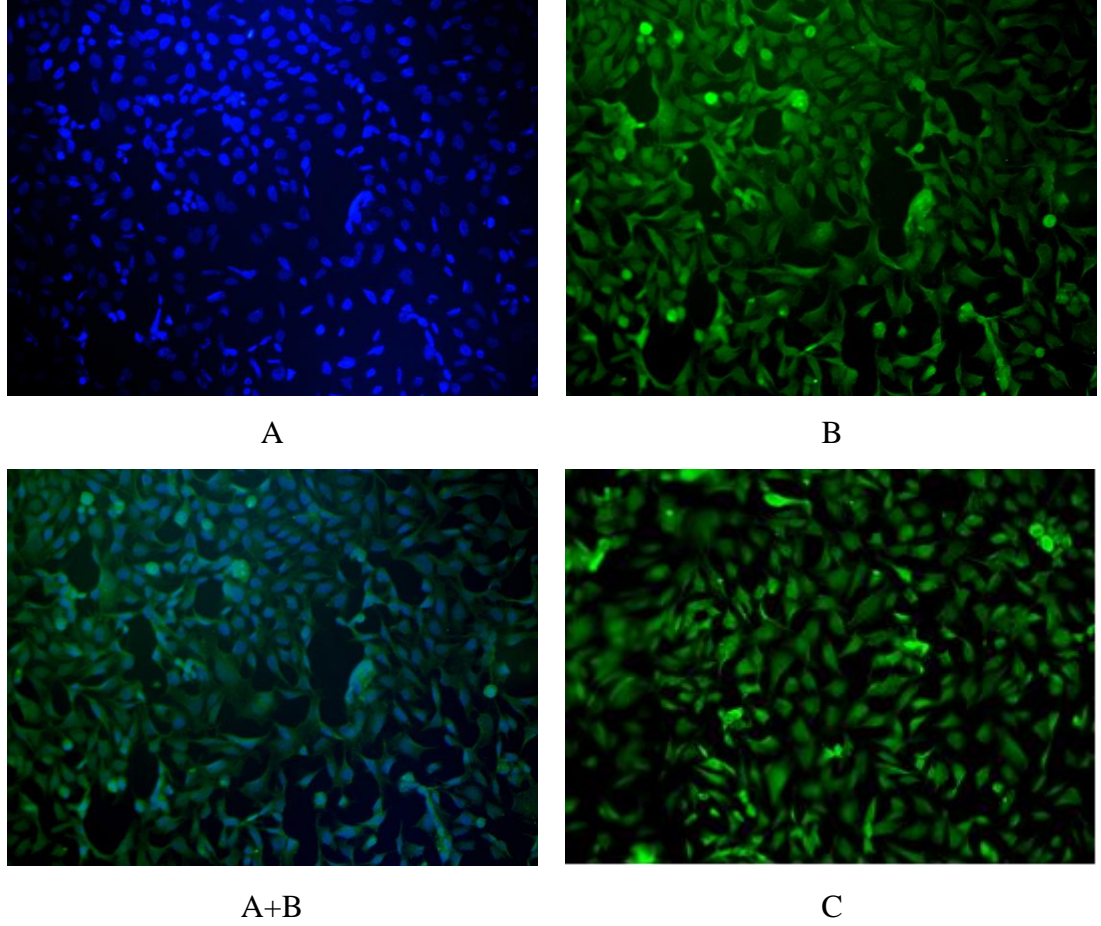
Şekil 3.32: Ekspresyon çalışmalarında kullanılan hücre hatları.

Tablo 3.5: Ekspresyon çalışmalarında kullanılan primer bilgileri.

Primer	Tm	Bç	Ürün	Primer dizisi
ADAMTS2Forward	61,8°C	18bç	455bç	5'-CTGTGGCGACGAGGTGCG-3'
ADAMTS2Reverse	60,2°C	21bç	455bç	5'-GGTGCACACATAGTCCCGTCC-3'
ADAMTS3Forward	64°C	21bç	400bç	5'-TCAGTGGGAGGTCCAAATGCA-3'
ADAMTS3Reverse	66°C	21bç	400bç	5'-GCAAAGAAGGAAGCAGCAGCC-3'
Hβ-2MForward	60°C	20bç	315bç	5-TTTCTGGCCTGGAGGCTATC-3
Hβ-2 MReverse	60°C	22bç	315bç	5-CATGTCTCCATCCCCTTAAC-3

3.5.2 Saos Hücrelerinde ADAMTS2 Proteininin İmmü Floresans ile Gösterilmesi

Saos modelinde ADAMTS2 proteininin immü floresans yöntemiyle işaretlenmesi amacıyla hücreler kuyucuklara sayıca 125×10^3 olacak şekilde paylaştırıldıktan sonra daha önce Bölüm 2.2.6.2'de anlatıldığı şekilde işlem basamakları takip edildi. Kullanılan primer ve sekonder antikorlar Tablo 2.1'de verilmiştir. Hücrelerde ADAMTS2 proteininin işaretlenmesinin yanısıra DAPI boyası kullanılarak nükleusların da gözlenmesi sağlandı. Ayrıca sekonder antikor kalıntısının olup olmadığının gözlenmesi amacıyla sadece sekonder antikorun kullanıldığı negatif kontrol grupları da çalışıldı. Yapılan boyamalar Olympus görüntülere fotoğrlandı. Boyama sonuçlarına göre ADAMTS2 proteininin hücrelerin sitoplazmasının yanı sıra nükleusunda da bulunduğu belirlendi. Yapılan immü floresans boyamaya ait fotoğraflar Şekil 3.33'te verilmiştir.



Şekil 3.33: ADAMTS2 immünfloresans boyama sonuçları. A: Saos hücrelerinde DAPI boyaması; mavi renkli kısımlar nükleusları göstermektedir. B: Saos hücrelerinde yeşil olarak boyanan kısımlar ADAMTS2 proteinini göstermektedir. Sekonder antikor olarak anti-rabbit Alexa Fluor 488 bağlı goat, anti-rabbit kullanılmıştır. A+B: DAPI ve Alexa Flour 488 boyamalarının üst üste getirilmiş görüntüsü. C: Saos hücrelerinde yeşil olarak boyanan kısımlar ADAMTS2 proteinini göstermektedir. Sekonder antikor olarak anti-rabbit Alexa Fluor 488 bağlı goat, anti-rabbit kullanılmıştır.

3.5.2.1 Western Blot Optimizasyon Çalışmaları

mRNA düzeyindeki çalışmalardan sonra Saos hücrelerinde immunfloresan tekniği ile varlığı gösterilen ADAMTS2 proteininin, kantitatif analizler için protein düzeyindeki ifadesi westernblotla tekrar gösterildi. Westernblot optimizasyonu için uygulanan çalışmalar şu şekilde özetlenmiştir;

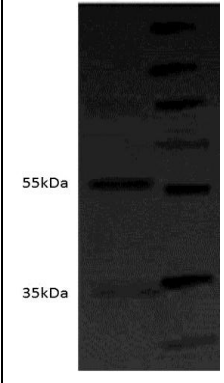

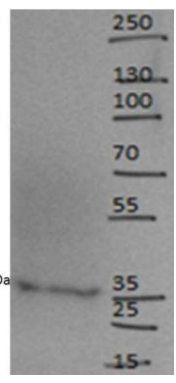

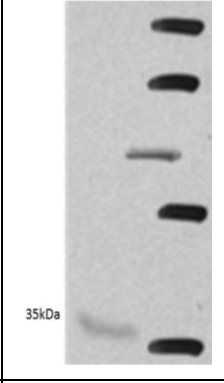

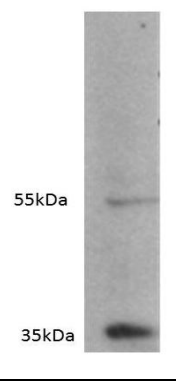
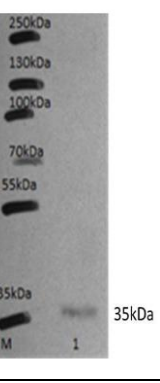
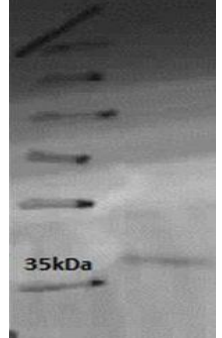
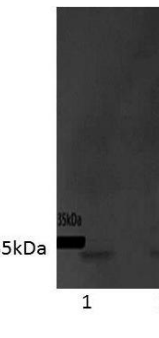
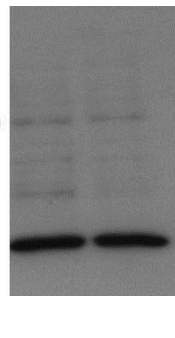
- i. Primer/sekonder antikor dilüsyonunun optimizasyonu,
- ii. Protein ekstraktı hazırlamada kullanılan yöntem ve tampon sisteminin optimizasyonu,
- iii. Transfer etkinliğinin belirlenmesine yönelik çalışmalar,
- iv. Sekonder antikor kalıntısının kontrolüne yönelik optimizasyon çalışmaları.

3.5.2.1.1 Primer/sekonder Antikor Konsantrasyonunun Optimizasyonu

Westernblot çalışmalarında ADAMTS2 proteinini etiketlemek amacıyla üç farklı firmaya ait primer antikor kullanıldı. Bunlar; monoklonal goat anti-mouse (18Q sc-100479), monoklonal goat anti-mouse (sigma) ve poliklonal goat, anti-rabbit (Abcam) antikorlarıdır. Sekonder antikor olarak ise Santa Cruz firmasına ait goat, anti-mouse (sc-2031) ve abcam firmasına ait goat, anti-rabbit antikorları kullanıldı. Westernblot çalışmaları Bölüm 2.2.6.1’de belirtildiği şekilde yapıldı. Optimizasyon çalışmalarında oldukça geniş bir aralıkta primer/sekonder antikor dilüsyonları denenerek çalışıldı.

Filmde zimojen haldeki ADAMTS2 proteininin 130-140 kDa ve aktif formdaki ADAMTS2 proteinin 94-105 kDa büyüklüğünde gözlenmesi beklenmektedir. Bunun yanı sıra ADAMTS2’nin alternatif kesilip işlenmeyle oluşan 70 kDa büyüklüğünde ikinci bir izoformunun bulunduğu da gen bankasında belirtilmektedir. Bu antikorlardan Sigma, S.Cruz ve Abcam firmasına ait primer antikorlar kullanılarak yapılan çalışmalar Tablo 3.6’da verilmektedir.

Tablo 3.6: Farklı antikor dilüsyonlarında farklı firmalara ait antikorlarla yapılan westernblot çalışmaları

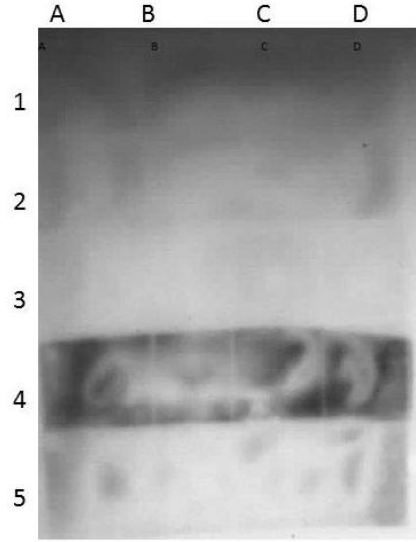
Pr.A/Sek.A	1:100-1:10000	1:100/1:8000	1:100/1:5000	1:100/1:2500
Primer Antikor: Monoklonal goat, anti-mouse (Sigma), İnkübasyon süresi: 2 saat (oda sıcaklığı)				
Büyükük	35kDa, 55kDa	---	35kDa	35kDa,55kDa,120kDa
Saos				
Pr.A/Sek.A	1:200/1:10000	1:200/1:8000	1:200/1:5000	1:200/1:2500
Primer Antikor: Monoklonal goat, anti-mouse (Sigma), İnkübasyon süresi :2 saat (oda sıcaklığı)				
Büyükük	35kDa	35kDa,55kDa	35kDa,55kDa	35kDa
Saos				
Pr.A/Sek.	1:200/1:2000	1:400/1:2000		
Primer Antikor: Monoklonal goat, anti-mouse (S.Cruz), İnkübasyon süresi :2 saat (oda sıcaklığı)			Primer Antikor: Poliklonal goat, anti-rabbit (Abcam), İnkübasyon süresi :2 saat	
Büyükük	~ 35 kDa	~ 35 kDa	35kDa,70kDa,100kDa	
				
	MG-63 (30µg)	Saos (20 µg)	Saos (20µg)	

Dot-Blot Analizi

Çok sayıda primer/sekonder antikor dilüsyonlarını deneyebilmek amacıyla dot-blot analizi yapıldı. Bu amaçla MG-63 hücrelerine ait protein ekstraktı PVDF membran üzerine mikropipet yardımıyla 2 µg-20 µg konsantrasyon aralığında damlatılarak kuruması beklendi. Membran daha sonra oda sıcaklığında bloklanıp 1X TBS+Tween 20 tamponunda üç kez beşer dakikalık aralarla yıkandı. Membran belirli bölgelerden kesilerek 1 saat süresince farklı konsantrasyonlarda primer antikorla ve sonrasında farklı konsantrasyonlardaki sekonder antikorlarla inkübasyona bırakıldı. Uygulanan dilüsyonlar ve protein miktarları Tablo 3.7’de verildiği gibidir. Dot-Blot sonuçları Şekil 3.34’te verilmektedir.

Tablo 3.7: Dot-Blot analizinde uygulanan antikor dilüsyonları ve protein miktarları.

Primer/sekonder antikor dilüsyonu	Protein Miktarı A	Protein Miktarı B	Protein Miktarı C	Protein Miktarı D
1:1000/1:2000	2µg	4µg	10µg	20µg
1:1000/1:4000	2µg	4µg	10µg	20µg
1:1000/1:8000	2µg	4µg	10µg	20µg
1:400 /1:800	2µg	4µg	10µg	20µg
1:400 /1:2000	2µg	4µg	10µg	20µg



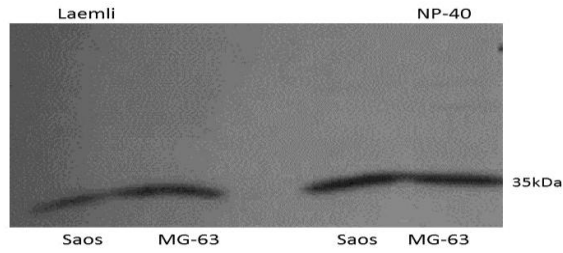
Şekil 3.34: Dot-blot analizi film görüntüsü. A1:1/1000/1/2000, 2 µg protein, A2: 1:1000/1:4000 2 µg protein, A3: 1:1000/1:8000, A4: 1:400/1:800, A5:1:400/1:2000, B1: 1:1000/1:2000, 4 µg protein, B2: 1:1000/1:4000 4 µg protein, B3: 1:1000/1:8000 4 µg protein, B4: 1:400/1:800 4 µg protein, B5:1:400/1:2000 protein, C1: 1:1000/1:2000, 10 µg protein, C2: 1:1000/1:4000 10 µg protein, C3: 1:1000/1:8000 10 µg protein, C4: 1:400/1:800 10 µg protein, C5:1:400/1:2000 10 µg protein, D1: 1:1000/1:2000, 20 µg protein, D2: 1:1000/1:4000 20 µg protein, D3: 1:1000/1:8000 20 µg protein, D4: 1:400/1:800 20 µg protein, D5:1:400/1:2000 20 µg protein

3.5.2.1.2 Protein Ekstraktı Hazırlamada Kullanılan Yöntem ve Tampon Sisteminin Optimizasyonu

Protein ekstraktlarının hazırlanmasında çalışılan proteinin özelliklerine ve lokalizasyonuna göre belirlenebilen çeşitli hücre ekstraksiyon tampon sistemleri bulunmaktadır. Hücre ekstraksiyonunun amacı proteinlerin çözünebilir forma geçirilmesidir. Protein ekstraksiyonunda dikkat edilmesi gereken bir önemli bir nokta bazı antikorların yalnızca denatüre edilmemiş haldeki proteinleri tanıyabilme yeteneğinde olmasıdır. Bu durumda denatüre şartlar altında hazırlanmış hücre ekstraktının ilgili antikorlar tarafından tanınması imkansızdır. Bu nedenle hücre ekstraksiyonu hazırlanırken kullanılan antikorun özellikleri de göz önünde bulundurulmalıdır. Laemli ve NP-40 tampon sistemleri sitoplazmik veya membrana bağlı proteinler için kullanılan ekstraksiyon tamponlarıdır. NP-40, Laemli de bulunan SDS'ye göre daha yumuşak bir deterjandır.

NP-40 ve Laemli tamponuyla hazırlanan protein ekstraktlarının karşılaştırılması amacıyla MG-63 ve Saos hücrelerinden Bölüm 2.2.6.1.2’de anlatıldığı şekilde iki farklı tampon ile protein ekstraktları hazırlandı. NP-40 ekstraktları, hacimce 1/20 12,3 M β -Merkaptoetanol ekstraktları ise β -Merkaptoetanol eklenmemiş yükleme boyası ile karıştırılıp 95 °C’de 5 dk ısı ile denatüre edildikten sonra SDS-PAGE jeline yüklendi.

Western Blot çalışmaları Bölüm 2.2.6.1’de belirtildiği şekilde yapıldı. Primer/sekonder antikor dilüsyon oranı; 1:400/1:2500 (S.cruz/Sigma) olacak şekilde oda sıcaklığında horizontal çalkalayıcıda 1 saat çalkalandı. ECL substratı (Pierce) kullanılarak bantlar görünür hale getirildi ve X-Ray filmine basıldı. Film tab edilerek sonuçlar gözlemlendi (Şekil3.35). Protein büyüklük belirteci ile karşılaştırılarak bant büyüklükleri 35kDa olarak belirlendi.

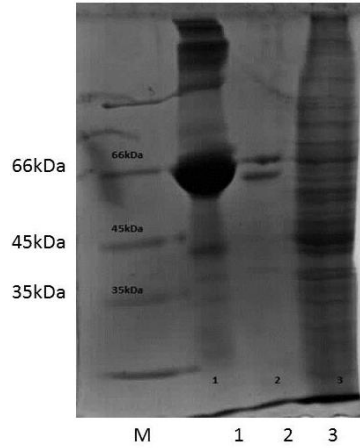


Şekil 3.35: Laemli ve NP-40 tamponu ile hazırlanan ekstraktlara ait westernblot sonucu .

3.5.2.1.3 Transfer Etkinliğinin ve Yüklenen Protein Kalitesinin Belirlenmesine Yönelik Çalışmalar

Jele yüklenen protein kalitesinin belirlenebilmesi amacıyla SDS-PAGE jelinin bir kısmı kontrol paneli olarak ayrıldı. Kontrol paneline, hazırlanan hücre ekstraktı ile birlikte moleküler ağırlıkları bilinen albumin ve β -Glukozidaz’da yüklendi. Jel yürütüldükten sonra kontrol paneli olarak ayrılan kısım transfere koyulmadan boyanarak renk açma (Tablo 2.9) işlemine tabi tutuldu ve görüntülendi. Bu sayede hazırlanan hücre ekstraktının kalitesi ve moleküllerin jeldeki hareket durumları kontrol edildi (Şekil3.36).

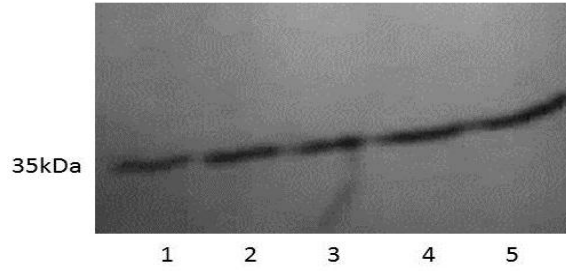
Bunun yanı sıra transfer etkinliğinin kontrol edilmesi amacıyla transferden alınan jeller de boyanarak renk açma işlemine tabi tutuldu. Kontrol panelindeki protein miktarları ile jelde, transferden sonra kalan protein miktarları karşılaştırılarak transfer etkinliği kontrol edildi. Ayrıca bu amaçla transfer sonrası membran Ponceu çözeltisi (Tablo 2.9) ile yarım saat boyanıp durularak membrandaki proteinlerin varlığı kontrol edildi.



Şekil 3.36: Westernblot kontrol paneli.M: protein büyüklük belirteci, 1: Albumin, 2: β -Glukozidaz ve 3: MG-63 protein ekstraktı.

3.5.2.1.4 Özgün Olmayan Sekonder Antikor Kalıntılarının Kontrolü

Westernblot çalışmalarında 35kDa büyüklüğünde işaretlenen bantın sekonder antikor kalıntısı olup olmadığının belirlenmesi amacıyla westernblot çalışmaları Bölüm 2.2.6.1’de belirtildiği şekilde yapıldı. Ancak transfer sonrası membran sadece 1:2000 dilüsyonunda hazırlanan sekonder antikor ile inkübasyona bırakıldı. Bunun sonucu filmde yine 35kDa büyüklüğünde bantlar gözlemlendi (Şekil 3.37). Bu nedenle S.Cruz ve Sigma primer antikorlarıyla yapılan çalışmalarda elde edilen 35 kDa hizasındaki bantların sekonder antikor kalıntısı olduğu sonucuna varıldı.

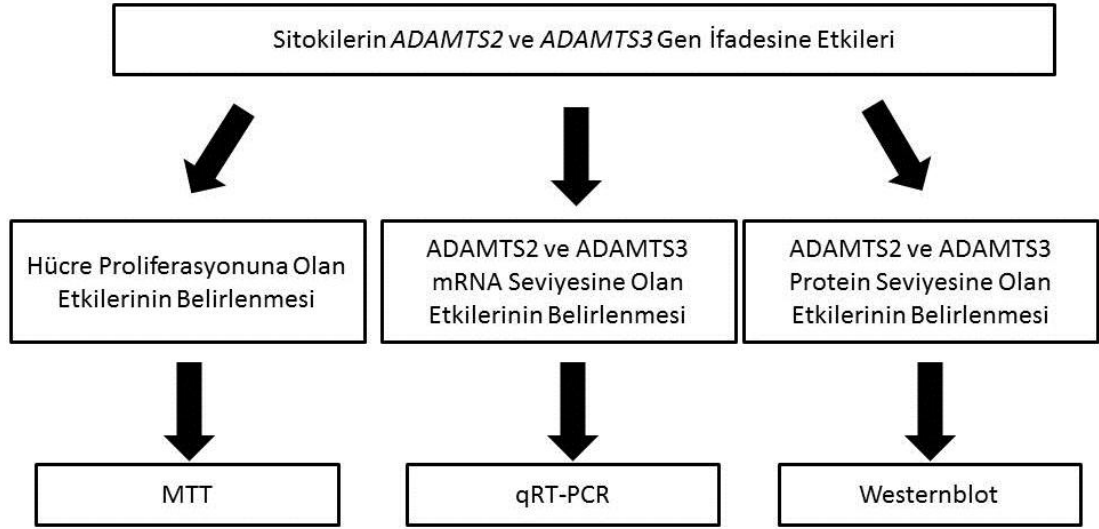


Şekil 3.37: Sadece sekonder antikor ile muamele edilen membran görüntüsü 1:10 µg Saos protein ekstraktı, 2: 20 µg Saos protein ekstraktı, 3: 30 µg Saos protein ekstraktı, 4:40 µg Saos protein ekstraktı, 5:50 µg protein ekstraktı.

Yapılan bu optimizasyonlar sonucunda Sigma ve Abcam firmasına ait antikorlarda ADAMTS2'ye spesifik bantlar elde edildi. Sigma antikor ile yapılan çalışmalarda istenilen özgün işaretlenme sürekli olarak sağlanamadığı için deney gruplarına ait çalışmalar Abcam firmasına ait poliklonal, goat anti-rabbit primer antikor 5µg/ml son konsantrasyonda ve 1 gece süresince +4°C'de inkübe edilerek kullanıldı. ADAMTS2'ye spesifik ~70kDa ve 100kDa büyüklüğünde işaretlenen bantlar sonuçların değerlendirilmesinde kullanıldı.

3.5.3 IL-6 Sitokinin *ADAMTS2* ve *ADAMTS3* Gen İfadesine Etkileri

Seçilen sitokinlerin osteosarkoma modelinde *ADAMTS2* gen ifadesine olan etkilerinin belirlenebilmesi amacıyla takip edilen çalışma planı ve uygulanan yöntemler Şekil 3.38'de özetlenmiştir. Seçilen sitokinlerin *ADAMTS2* gen ifadesine olan etkisinin yanısıra pNp ailesinin diğer bir üyesi olan *ADAMTS3*'ün ifadesine olan etkileri de araştırıldı.



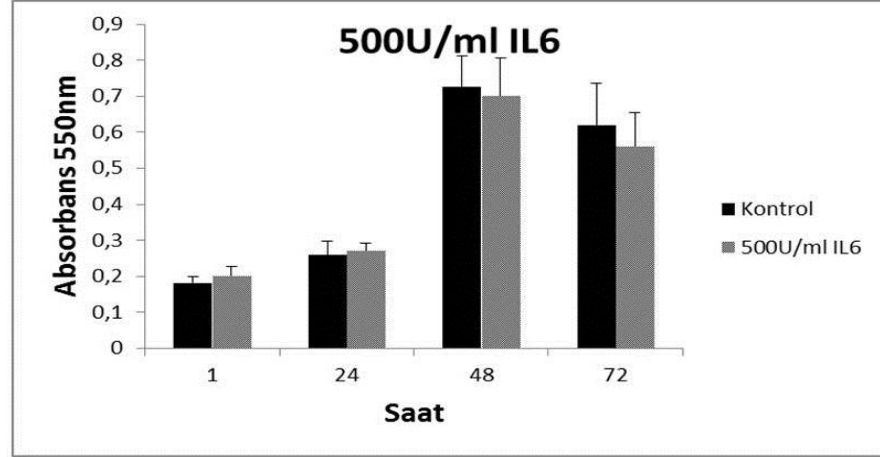
Şekil 3.38: Sitokinlerin *ADAMTS2* ve *ADAMTS3* gen ifadesine etkilerinin belirlenebilmesi amacıyla takip edilecek çalışma planı ve uygulanacak yöntemler

3.5.3.1 IL-6 Sitokininin Saos Hücre Proliferasyonuna Etkisinin Belirlenmesi

IL-6 pro-enflamatuar ve anti-enflamatuar olarak görev yapan bir sitokindir. Enfeksiyon, travma gibi durumlar sonrası immun cevabın oluşması amacıyla T hücrelerinden ve makrofajlardan salgılanır. Bunun yanısıra kaslardan salgılanan bir miyokin olarakta bilinmektedir. Osteoblastlardan salgılanan IL-6'nın osteoklast oluşumunu uyardığı bilinmektedir [39].

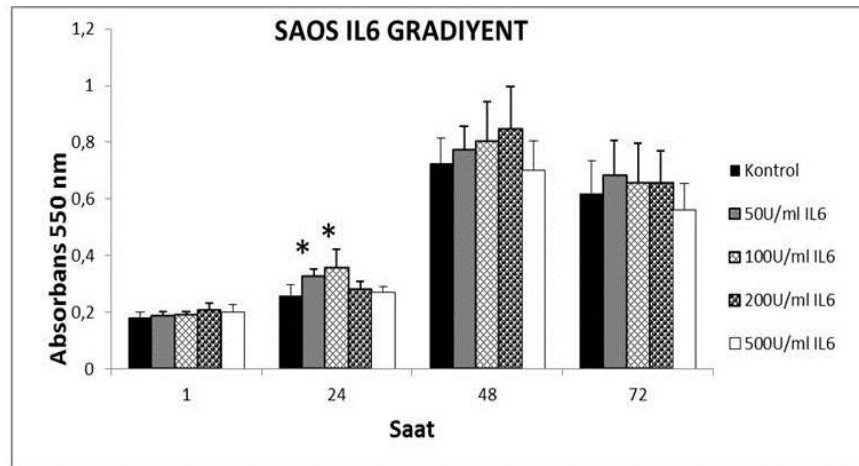
Saos hücrelerinde IL-6 sitokininin hücre proliferasyonuna olan etkisi MTT analizi ile belirlendi. Bu amaçla hücreler 96 kuyucuklu plakalara her kuyucukta sayıca 5000 olacak şekilde paylaştırıldı. Bölüm 2.2.5.1'de anlatıldığı gibi sitokin uygulama deneyleri kuruldu. IL-6 sitokini 500U/ml son konsantrasyonda hücrelerin bulunduğu kuyucuklara uygulandı. Bunun yanı sıra IL-6'nın Saos hücrelerinde doza bağlı bir proliferasyon etkisinin olup olmadığının belirlenebilmesi amacıyla 50Ü/ml, 100Ü/ml, 200Ü/ml ve 500Ü/ml olacak şekilde bir konsantrasyon gradiyenti oluşturularak MTT çalışmaları tekrarlandı. Sitokin uygulanmayan hücreler kontrol grubu olarak kullanıldı. 1, 24, 48 ve 72 saat'lik inkübasyon sürelerinin sonunda

Bölüm 2.2.3.3.3'te anlatıldığı gibi MTT analizi uygulandı. Bütün deneyler en az üç tekrarlı olarak çalışıldı ve sonuçlar Minitab (One way ANOVA) programı ile istatistiksel olarak değerlendirildi (Şekil 3.39-Şekil 3.40).



Şekil 3.39: IL-6 sitokininin Saos hücre proliferasyonuna etkisinin zamana bağlı olarak değerlendirilmesi

Yapılan istatistiksel analizlerde $p \leq 0,05$ olarak hesaplanan gruplar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Buna göre; 72 saate kadar olan sonuçlar değerlendirildiğinde 500Ü/ml son konsantrasyonda uygulanan IL-6 sitokininin hücre canlılığı üzerinde belirgin bir etkisi olmadığı gözlemlendi.



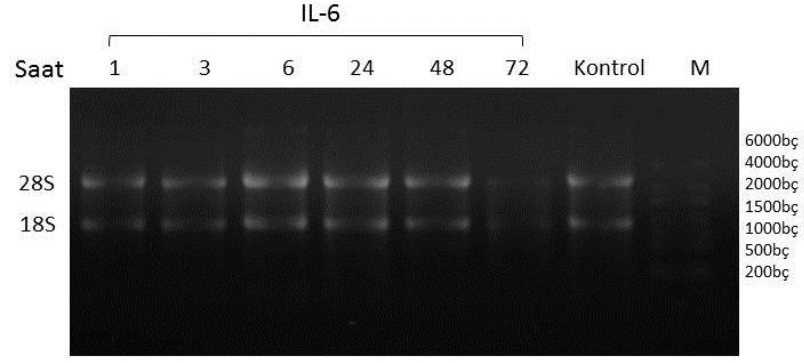
Şekil 3.40: IL-6 sitokininin Saos hücre proliferasyonuna etkisinin doza ve zamana bağlı olarak değerlendirilmesi

Yapılan istatistiksel analizlerde $p \leq 0,05$ olarak hesaplanan gruplar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Buna göre; 72 saate kadar olan sonuçlar değerlendirildiğinde 24 saatte 50 Ü/ml ve 100 Ü/ml konsantrasyonlarda gözlenen etkiler anlamlı bulundu.

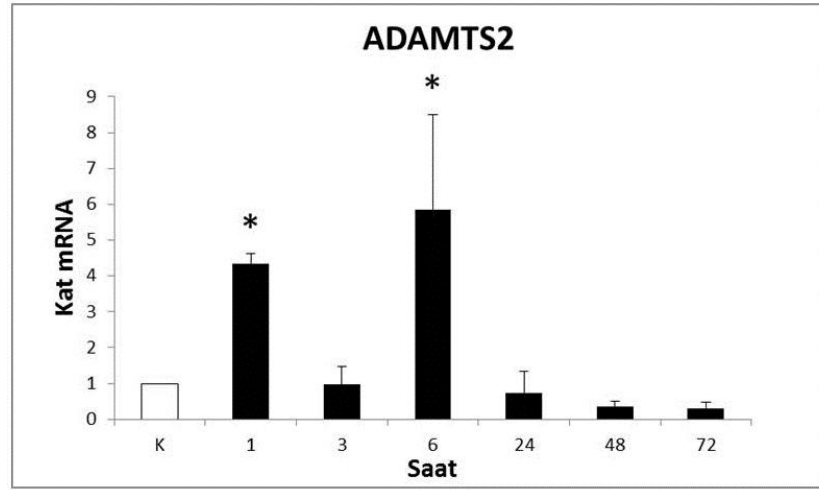
3.5.3.2 Saos Hücrelerinde IL-6 Sitokininin ADAMTS2 ve ADAMTS3 mRNA Ekspresyonuna Etkisinin Kantitatif Realtime PCR ile Belirlenmesi

Saos hücrelerinde IL-6'nın ADAMTS2 ve ADAMTS3 mRNA düzeyine olan etkilerinin belirlenebilmesi amacıyla Bölüm 2.2.5.1'de anlatıldığı şekilde sitokin uygulama deneyleri kuruldu. 1, 3, 6, 24, 48 ve 72 saat inkübasyon süreleri sonunda Bölüm 2.2.5.2'de belirtildiği şekilde kontrol ve deney gruplarından RNA izolasyonları yapıldı. İzole edilen RNA'lar formaldehit agaroz jelde Bölüm 2.2.5.4'te açıklandığı üzere görüntülendi (Şekil 3.41). RNA konsantrasyonu ve saflığı spektrofotometrik olarak belirlendi.

cDNA sentezi Bölüm 2.2.5.5'te belirtildiği şekilde 1 µg RNA kalıp alınarak yapıldı. Kantitatif real time PCR çalışmaları Bölüm 2.2.5.6'da belirtildiği şekilde sentezlenen cDNA'nın 1 µl'si kalıp alınarak yapıldı. Çalışmalarda ADAMTS2, ADAMTS3 ve sonuçların normalizasyonu amacıyla insan β-2 mikroglobulin primerleri kullanıldı. Primer bilgileri Tablo 3.5'te verilmektedir. Deneyler birbirinden bağımsız iki farklı hücre grubu ile tekrarlandı. qRT-PCR çalışmaları en az üç tekrarlı olacak şekilde yapıldı. Sonuçlar Bölüm 2.2.5.7'de anlatıldığı şekilde Livak metoduna göre değerlendirildi. İstatistiksel analiz için Mini Tab (One Way ANOVA) programı kullanıldı. Buna göre $p \leq 0,05$ olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

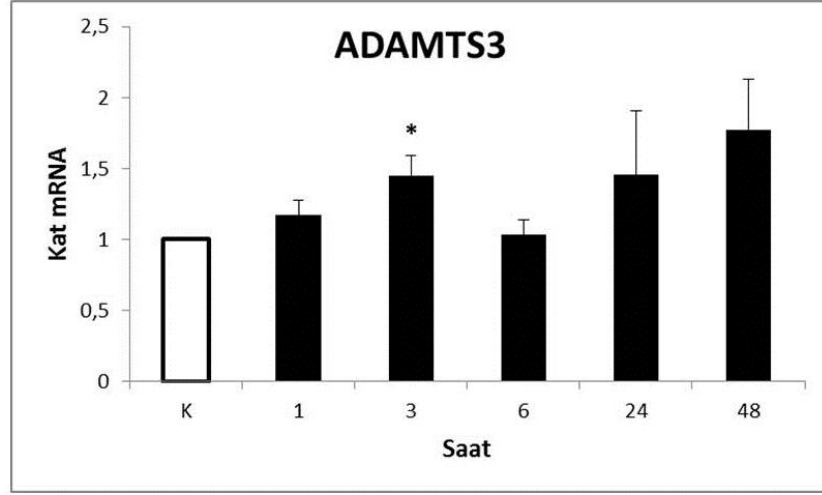


Şekil 3.41: Saos 500 Ü/ml IL-6 uygulanan deney ve kontrol gruplarına ait RNA'ların formaldehit agaroz jel görüntüsü.



Şekil 3.42: Saos hücrelerinde IL-6 sitokininin, ADAMTS2 mRNA ekspresyon seviyesine etkileri.

Yapılan istatistikler değerlendirildiğinde; IL-6, ADAMTS2 mRNA seviyesini 1 saat inkübasyon süresinin sonunda 4 kat arttırmaktadır. Bunun yanısıra 6. saatte de mRNA düzeyi istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde 6 kat artış göstermektedir. (Şekil 3.42).

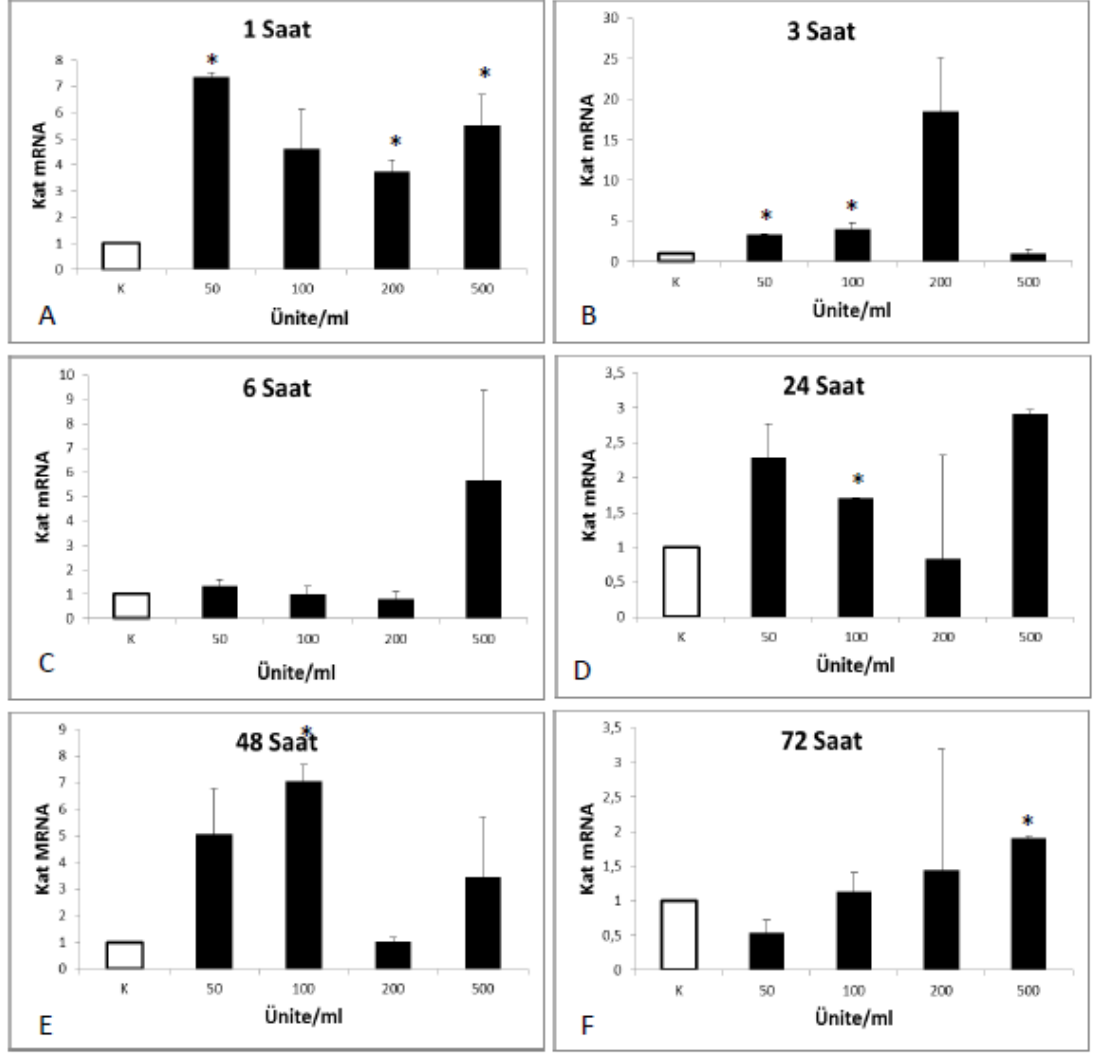


Şekil 3.43: Saos hücrelerinde IL-6 sitokininin, ADAMTS3 mRNA ekspresyon seviyesine etkileri.

ADAMTS3 için sonuçlar değerlendirildiğinde IL-6 stimülasyonunu takiben ADAMTS3 mRNA seviyesinde 48 saate kadar süren bir artış söz konusudur. Özellikle 3. saatte gözlenen artış istatistiksel olarak anlamlıdır (Şekil 3.43).

3.5.3.3 Saos Hücrelerinde IL-6 Sitokininin Doza ve Zamana Bağlı Olarak ADAMTS2 mRNA Düzeyine Etkisinin Kantitatif Realtime PCR ile Belirlenmesi

Saos hücre modelinde IL-6 sitokininin doza ve zamana bağlı olarak ADAMTS2 ifadesine etkilerinin qRT-PCR ile belirlenmesi amacıyla, Bölüm 2.2.5.1’de belirtildiği şekilde sitokin deneyleri daha önceki bölümlerde bahsedilen hücrelerden bağımsız olarak kuruldu. IL-6 sitokini; 50 Ü/ml, 100 Ü/ml, 200 Ü/ml ve 500 Ü/ml olacak şekilde hücrelere uygulandı. Sırasıyla; RNA izolasyonu, cDNA sentezi ve qRT-PCR çalışmaları Bölüm 2.2.5’te belirtildiği şekilde yapıldı. Sonuçlar Minitab (One Way ANOVA) ile istatistiksel olarak değerlendirildi.

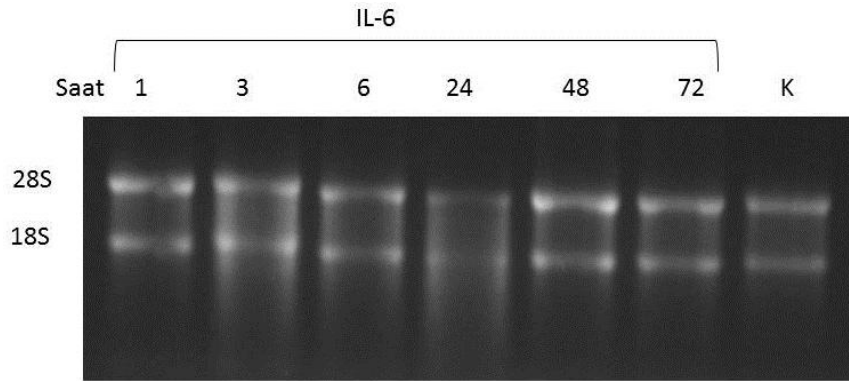


Şekil 3.44: Saos-2 hücrelerinde ADAMTS2 mRNA seviyesinin IL6 sitokin uygulaması sonucu doza bağlı değişimi. (A: 1 saat, B: 3 saat, C:6 saat, D:24 saat,E:48 saat,F:72 saat).

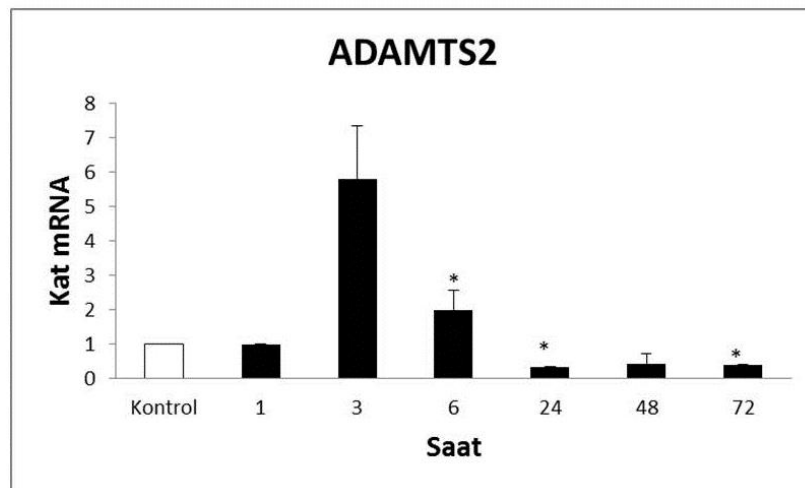
Bu analizlere göre istatistiksel olarak anlamlı bulunan değerler grafik üzerinde yıldız ile belirtilmektedir (Şekil 3.44).

3.5.3.4 Benzer MG-63 Hücre Modelinde IL-6 Sitokininin ADAMTS2 ve ADAMTS3 mRNA Seviyesine Etkisinin Belirlenmesi

Benzer model olarak seçilen MG-63 hücrelerinde IL-6 sitokininin mRNA seviyesine olan etkileri qRT-PCR ile araştırıldı. Bu amaçla takip edilen çalışma basamakları Bölüm 3.5.3.2’de belirtildiği şekilde uygulandı. Kontrol ve deney grubuna ait RNA’lar Şekil 3.45’te verilmektedir. Sonuçlar Minitab (One Way ANOVA) ile istatistiksel olarak değerlendirildi. Sonuçlar Şekil3.46 ve Şekil 3.47’de verilmektedir.

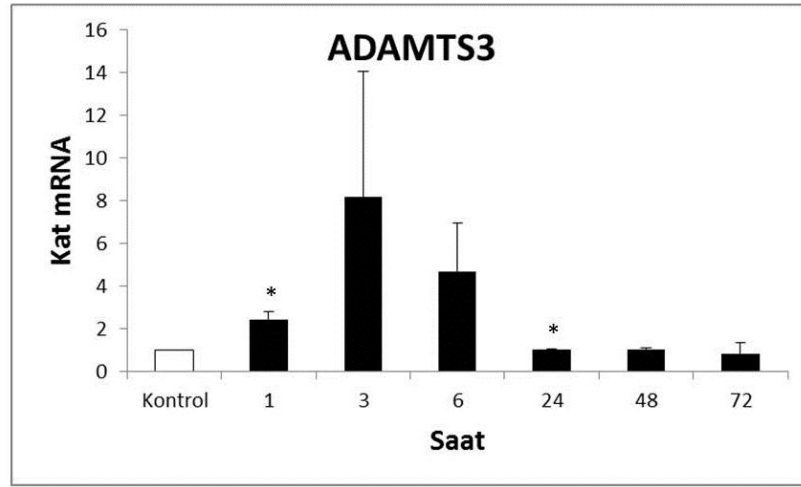


Şekil 3.45: MG-63 500 Ü/ml IL-6 uygulanan deney ve kontrol gruplarına ait RNA’ların formaldehit agaroz jel görüntüsü.



Şekil 3.46: MG-63 hücrelerinde IL-6 sitokininin, ADAMTS2 mRNA ekspresyon seviyesine etkileri.

Sonuçlar değerlendirildiğinde ADAMTS2 mRNA seviyesinde 6. saate kadar istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu gözlemlendi.



Şekil 3.47: MG-63 hücrelerinde IL-6 sitokininin, ADAMTS3 mRNA ekspresyon seviyesine etkileri.

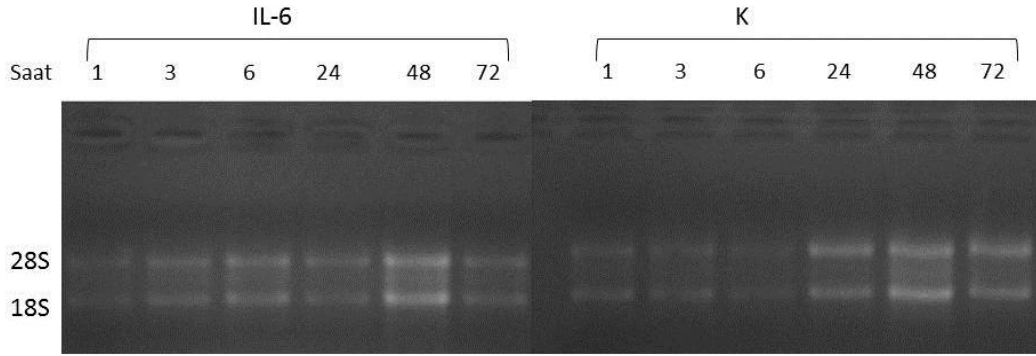
ADAMTS3 mRNA düzeyinde ise 6. saate kadar bir artış olduğu belirlendi (Şekil3.47).

3.5.3.5 Farklı HT-29 Kolon Kanseri Hücre Modelinde IL-6 Sitokininin ADAMTS2 mRNA Seviyesine Etkisinin Belirlenmesi

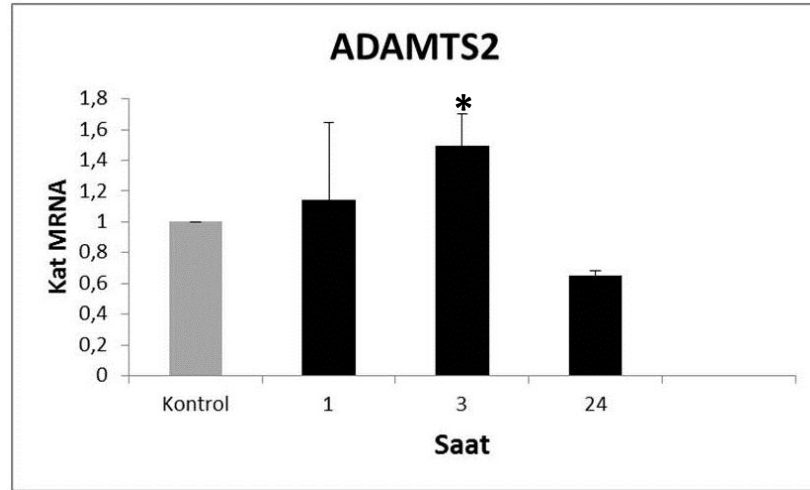
Farklı model olarak seçilen HT-29 kolon kanseri modelinde IL-6'nın ADAMTS2 mRNA düzeyine olan etkilerinin belirlenebilmesi amacıyla Bölüm 2.2.5.1'de anlatıldığı şekilde sitokin uygulama deneyleri kuruldu. 1, 3, 6, 24, 48 ve 72 saat inkübasyon süreleri sonunda Bölüm 2.2.5.2'de belirtildiği şekilde kontrol ve deney gruplarından RNA izolasyonları yapıldı. İzole edilen RNA'lar formaldehit agaroz jelde Bölüm 2.2.5.4'te açıklandığı üzere görüntülendi (Şekil 3.48). RNA konsantrasyonu ve saflığı spektrofotometrik olarak belirlendi.

cDNA sentezi Bölüm 2.2.5.5'te belirtildiği şekilde 1 µg RNA kalıp alınarak yapıldı. Kantitatif real time PCR çalışmaları Bölüm 2.2.5.6'da belirtildiği şekilde sentezlenen cDNA'nın 1 µl'si kalıp alınarak yapıldı. Çalışmalarda ADAMTS2, sonuçların normalizasyonu amacıyla insan β-2 mikroglobulin primerleri kullanıldı.

Primer bilgileri Tablo 3.5’de verilmektedir. Sonuçlar normalize edilerek elde edilen sonuçlar Şekil3.49’da verilmektedir.



Şekil 3.48: HT-29 500 Ü/ml IL-6 uygulanan deney ve kontrol gruplarına ait RNA’ların formaldehit agaroz jel görüntüsü.



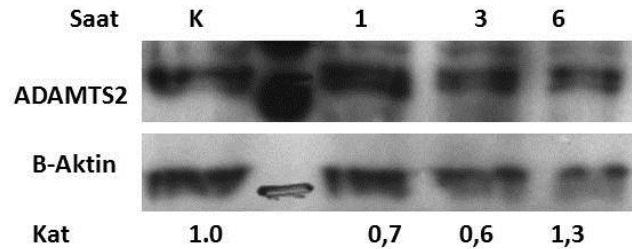
Şekil 3.49: HT-29 hücrelerinde IL6 sitokininin, ADAMTS2 mRNA ekspresyon seviyesine etkileri.

Buna göre 500Ü/ml son konsantrasyonda kolon karsinomu hücrelerine uygulanan IL-6 sitokininin ADAMTS2 mRNA seviyesini erken saatlerde arttırdığı belirlendi. İstatistiksel olarak anlamlı artışlar yıldız ile işaretlenmiştir.

3.5.4 Saos Osteosarkoma Hücre Modelinde ADAMTS2 ve ADAMTS3 Protein Düzeyinin Western blot ile Belirlenmesi

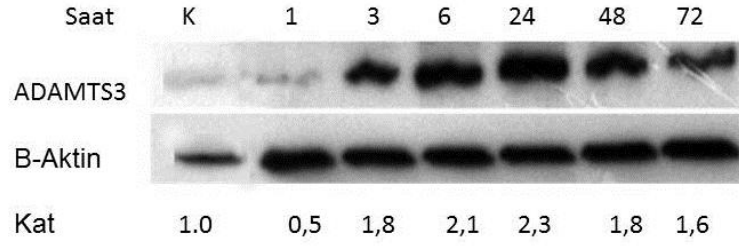
3.5.4.1 Saos Osteosarkoma Hücre Modelinde IL-6 Sitokininin ADAMTS2 ve ADAMTS3 Protein Düzeyine Olan Etkilerinin Westernblot ile Belirlenmesi

Saos hücrelerine IL-6 sitokini uygulama deneyleri 500Ü/ml olacak şekilde Bölüm 2.2.6.1.1’de belirtildiği şekilde kuruldu. ADAMTS2 ve ADAMTS3 proteinleri Bölüm 2.2.6.1’de belirtilen şekilde westernblot yöntemi ile işaretlendi. Bu amaçla poliklonal goat, anti-rabbit (Abcam) antikoru primer antikor olarak 5 µg/ml son konsantrasyonda kullanıldı. Membran +4 °C’de gece boyunca primer antikor ile inkübasyona bırakıldı. Sekonder antikor olarak goat, anti-rabbit poliklonal (sigma) antikoru 1/10.000 dilüsyonda kullanıldı. Membran 1 saat süresince oda sıcaklığında sekonder antikor ile inkübasyona bırakıldı. Normalizasyon amacıyla β-aktin proteini kullanıldı. Sonuçlar Image J programı ile analiz edilerek değerlendirildi (Şekil 3.50 ve 3.51).



Şekil 3.50: Saos hücrelerinde IL-6 sitokininin ADAMTS2 protein düzeyine etkisi.

Yapılan densitometrik analizlere göre 500 Ü/ml son konsantrasyonda uygulanan IL-6 sitokininin ADAMTS2 protein düzeyini arttırdığı belirlendi.

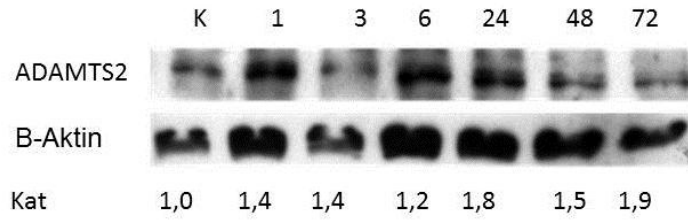


Şekil 3.51: Saos hücrelerinde IL-6 sitokininin ADAMTS3 protein düzeyine etkisi.

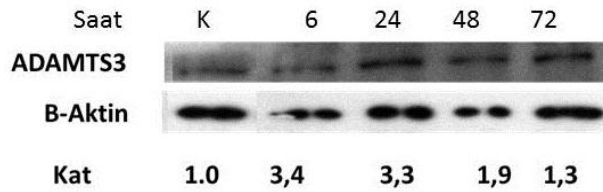
Yapılan densitometrik analizler sonucunda IL-6 sitokininin ADAMTS3 protein seviyesinde 72 saate kadar artışa neden olduğu belirlendi. En fazla artışın 6 ve 24 saatlerde olduğu belirlendi.

3.5.4.2 Benzer MG-63 Hücre Modelinde IL-6 Sitokininin ADAMTS2 ve ADAMTS3 Protein Düzeyine Olan Etkilerinin Westernblot ile Belirlenmesi

Benzer model olarak seçilen MG-63 hücrelerine IL-6 sitokini uygulama deneyleri 500Ü/ml olacak şekilde Bölüm 2.2.6.1.1’de belirtildiği şekilde kuruldu. ADAMTS2 ve ADAMTS3 proteinleri Bölüm 2.2.6.1’de belirtilen şekilde westernblot yöntemi ile işaretlendi. Bu amaçla poliklonal goat, anti-rabbit (Abcam) antikoru primer antikor olarak 5 µg/ml son konsantrasyonda kullanıldı. Membran +4 °C’de gece boyunca primer antikor ile inkübasyona bırakıldı. Sekonder antikor olarak goat, anti-rabbit poliklonal (sigma) antikoru 1/10.000 dilüsyonda kullanıldı. Membran 1 saat süresince oda sıcaklığında sekonder antikor ile inkübasyona bırakıldı. Normalizasyon amacıyla β-aktin proteini kullanıldı. Sonuçlar Image J programı ile analiz edilerek değerlendirildi. Sonuçlar Şekil 3.52 ve Şekil 3.53’te gösterilmektedir.



Şekil 3.52: MG-63 hücrelerinde IL-6 sitokininin ADAMTS2 protein düzeyine etkisi.

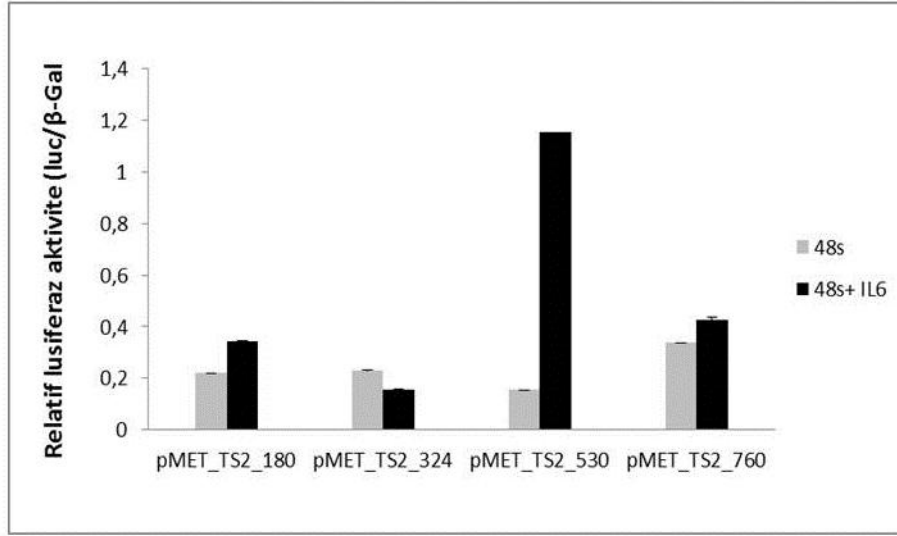


Şekil 3.53: MG-63 hücrelerinde IL-6 sitokininin ADAMTS3 protein düzeyine etkisi.

3.5.5 IL-6 Sitokininin ADAMTS2 Transkripsiyonel Aktivitesine Etkisinin Belirlenmesi

Osteosarkoma modellerinde IL-6 sitokini ADAMTS2 ifadesini hem mRNA hem de protein düzeyinde arttırmaktadır. IL-6 stimülasyonu ile oluşan bu etkinin transkripsiyonel regülasyon düzeyindeki etkisinin belirlenebilmesi amacıyla IL-6 sitokini transfeksiyon çalışmalarına dahil edilmiştir.

Bu amaçla ADAMTS2 promotor parçaları Bölüm 2.2.4'te belirtildiği şekilde Saos hücrelerine transfekte edildi. Transfeksiyondan 24 saat sonra IL-6 sitokini hücrelere uygulandı. 48 ve 72 saat inkübasyon sürelerinin sonunda deney ve kontrol gruplarının lusiferaz aktivitesi ölçüldü. Sonuçlar Seap verileri ile oranlanarak normalize edildi (Şekil 3.55).



Şekil 3.54: IL-6 sitokininin *ADAMTS2* promotor parçaları üzerine etkisinin karşılaştırılması.

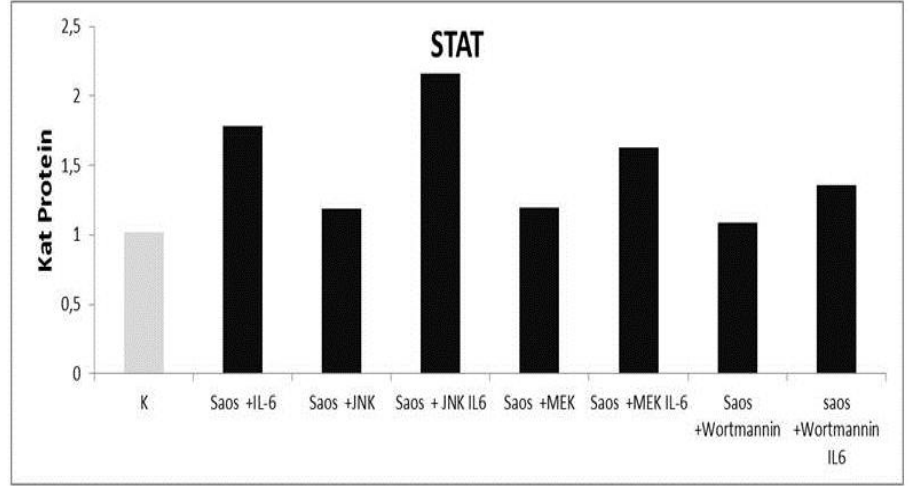
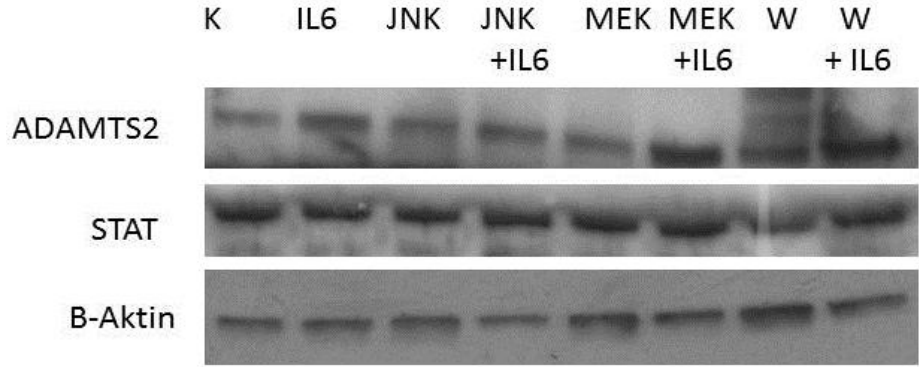
IL-6 uygulamasından 48 saat sonra elde edilen sonuçlar analiz edildiğinde sitokinin özellikle 180, 530 ve 760bp'lik *ADAMTS2* promotor parçalarının lusiferaz aktivitesinde artışa yol açtığı belirlendi. Bu artış özellikle 530bp'lik parçada 6 kata kadar yükselmiştir.

3.5.6 Yolak Çalışmaları

IL-6'nın *ADAMTS2* mRNA ve protein düzeyindeki artışını hangi yol üzerinden sağladığını belirleyebilmek için JNK, MEK ve Wortmannin inhibitörleri kullanılarak inhibisyon çalışmaları Bölüm 2.2.6.1.2'de belirtildiği şekilde kuruldu. 6 saatlik inkübasyon süresinin sonunda Bölüm 2.2.6.1.3'te belirtildiği şekilde total hücre ekstraktı hazırlandı. Westernblot çalışmaları Bölüm 2.2.6.1'de belirtildiği şekilde yapıldı. Sonuçlar ImageJ programı ile densitometrik olarak analiz edilerek değerlendirildi. Sonuçlar Şekil 3.54'te verilmektedir.

Sonuçlar değerlendirildiğinde IL-6 stimülasyonu sonucunda Saos hücrelerinde STAT bağlantılı yolun aktive olduğu belirlendi. İnhibitör uygulaması ile

birlikte yapılan IL-6 stimülasyonu sonucunda *de-novo* protein sentezinin başladığı sonucuna varıldı.



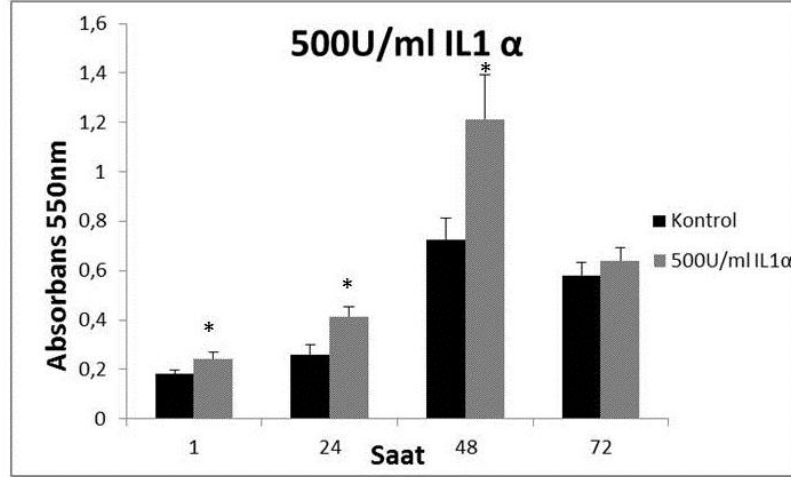
Şekil 3.55: ADAMTS2 inhibisyon çalışmaları.

3.5.7 IL-1 α Sitokininin ADAMTS2 ve ADAMTS3 Gen İfadesine Etkileri

3.5.7.1 IL-1 α Sitokininin Saos Hücre Proliferasyonuna Etkisinin Belirlenmesi

IL-1 α sitokininin Saos hücre proliferasyonuna olan etkisi MTT analizi ile belirlendi. Bu amaçla deney grubundaki hücelere 1-72 saat inkübasyon sürelerinde 500U/ml IL-1 α uygulanırken diğer bir gruptaki hücelere sitokin uygulaması yapılmadı. 1, 3, 6, 24, 48 ve 72 saat'lik inkübasyon sürelerinin sonunda Bölüm

2.2.3.3.3'de belirtilen protokole göre MTT analizi uygulandı. Bütün deneyler üç tekrarlı olarak çalışıldı ve sonuçlar Minitab (One way ANOVA) programı ile istatistiksel olarak değerlendirildi (Şekil 3.56). Sonuçlar değerlendirildiğinde IL-1 α 'nın Saos hücreleri üzerinde 1. saatten başlayıp 48. saate kadar artan istatistiksel açıdan önemli bir proliferasyon etkisinin olduğu belirlendi.

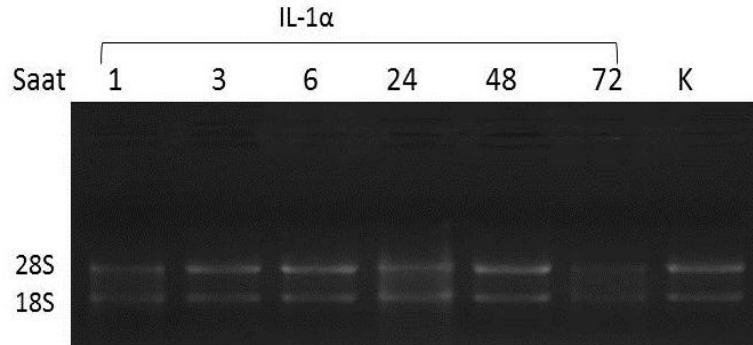


Şekil 3.56: IL-1 α sitokininin Saos hücre proliferasyonuna etkisinin zamana bağlı olarak değerlendirilmesi.

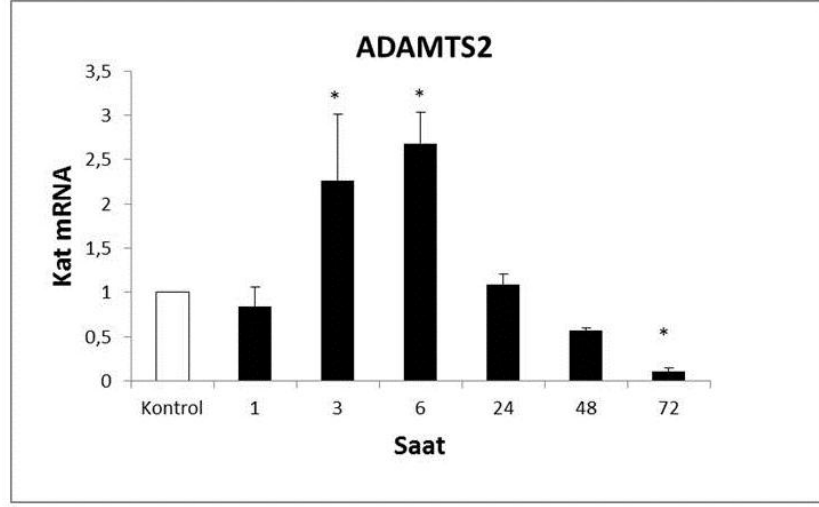
3.5.7.2 Saos Osteosarkoma Hücre Modelinde IL-1 α Sitokininin ADAMTS2 ve ADAMTS3 mRNA Ekspresyonuna Etkilerinin Kantitatif Realtime PCR ile Belirlenmesi

Saos-2 Hücrelerinde IL-1 α 'nın *ADAMTS2* ve *ADAMTS3* ekspresyonuna olan etkisinin belirlenebilmesi amacıyla hücreler önce 25 cm² lik flasklara 2.000.000 hücre olacak şekilde ve %10 FCS ve %1 L-Glutamin içeren DMEM besiyerine alındı. Hücrelerin flask yüzeyine tutunmaları yaklaşık 5saat beklendikten sonra %10 FCS içeren DMEM besiyeri alınarak %0,1 BSA içeren DMEM besiyeri ile değiştirildi. Ertesi gün hücrelerin halen yüzeye tutunup tutunmadıkları kontrol edildikten sonra medyumları %0,1BSA içeren DMEM ile tazelandı. Hücrelerin 1 saat inkübatörde bekletilmesini takiben son konsantrasyonu 500 Ü/ml olacak şekilde IL-1 α sitokini uygulandı. 1, 3, 6, 24, 48 ve 72 saat inkübasyon süreleri sonunda hücrelerin morfolojileri ve kontaminasyon durumunun olup olmadığı kontrol

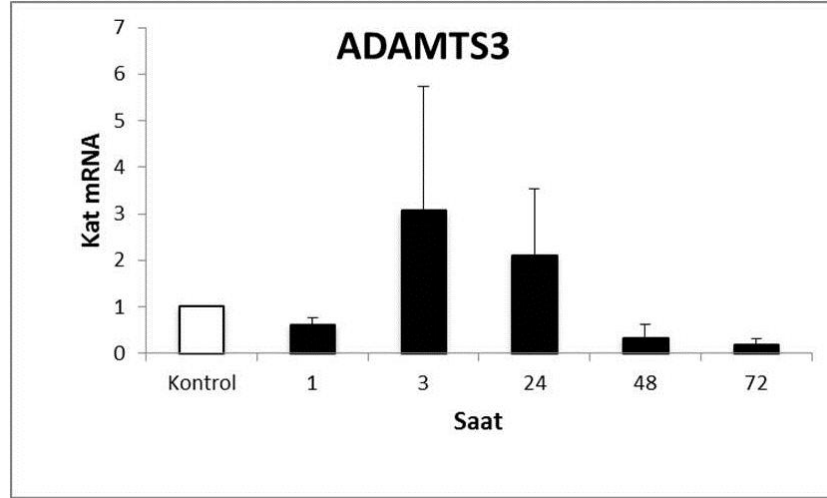
edildikten sonra Tripsin EDTA ile flask yüzeyinden ayrılması sağlandı Tripsin inktivasyonu amacıyla %10 FCS içeren DMEM eklenerek flask yüzeyi yıkandı ve yüzeyden tamamen ayrılan hücreler santrifüjle 1000 rpm’de 5 dakika santrifüj edildi. Fermentas RNA izolasyon kitindeki protokole göre RNA izolasyonları yapıldı. RNA konsantrasyonu ve saflığı spektrofotometre ile belirlendi. RNA’lara ait görüntü Şekil 3.57’de verilmektedir. cDNA sentezi Bölüm 2.2.5.2’te belirtilen şekilde ve deney ve kontrol gruplarından 1 µg RNA kullanılacak şekilde sentezlendi. qRT-PCR çalışmaları Bölüm 2.2.5.6’da belirtildiği şekilde yapıldı. Çalışmalar en az üç kez tekrarlandı. Sonuçların istatistiksel analizi Mini Tab (One Way ANOVA) programı kullanılarak yapıldı. İstatistiksel değerlendirme sonuçlarına Şekil 3.58 ve Şekil 3.59’de verilmektedir. Grafikler incelendiğinde IL-1α’nın *ADAMTS2* mRNA düzeyini özellikle 3. ve 6. saatlerde istatistiksel açıdan önemli bir şekilde arttırdığı anlaşılmaktadır.



Şekil 3.57: Saos 500 Ü/ml IL-1α uygulanan deney ve kontrol gruplarına ait RNA’ların formaldehit agaroz jel görüntüsü.



Şekil 3.58: Saos hücrelerinde IL-1 α sitokinininin, ADAMTS2 mRNA ekspresyon seviyesine etkileri.

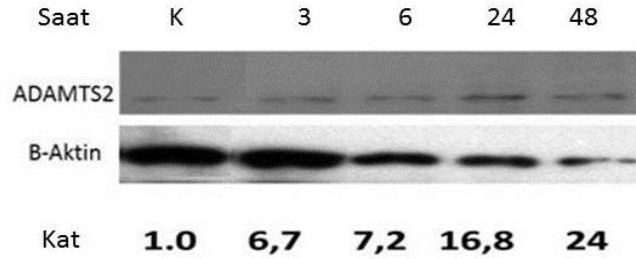


Şekil 3.59: Saos hücrelerinde IL-1 α sitokinininin, ADAMTS3 mRNA ekspresyon seviyesine etkileri.

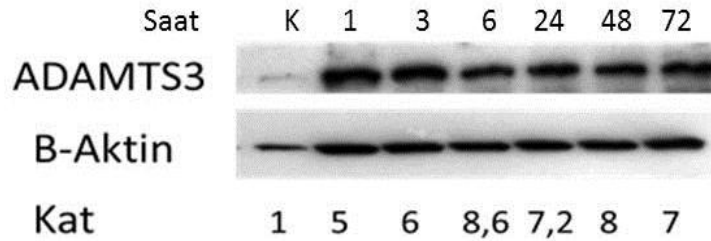
Sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirildiğinde IL-1 α 'nın ADAMTS2 ve ADAMTS3 mRNA düzeyini istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttırdığı belirlendi.

3.5.7.3 Saos Osteosarkoma Hücre Modelinde IL-1 α Sitokininin ADAMTS2 ve ADAMTS3 Protein Düzeyine Olan Etkilerinin Westernblot ile Belirlenmesi

Saos hücrelerine 500 Ü/ml IL-1 α sitokini Bölüm 2.2.6.1.1’de belirtildiği şekilde uygulandı. ADAMTS2 ve ADAMTS3 proteinleri Bölüm 2.2.6.1’de belirtilen şekilde westernblot yöntemi ile işaretlendi. Primer antikor olarak poliklonal, goat anti-rabbit (Abcam) antikorunu 5 µg/ml son konsantrasyonda, +4 °C’de gece boyunca inkübe edilip kullanıldı. Sekonder antikor olarak goat anti-rabbit poliklonal (sigma) antikorunu 1/10.000 dilüsyonda 1 saat süresince oda sıcaklığında inkübasyona bırakılarak kullanıldı. Sonuçlar β -Aktin ile normalize edilerek Image J programı ile değerlendirildi (Şekil 3.60 ve Şekil 3.61).



Şekil 3.60: Saos hücrelerinde IL-1 α sitokininin ADAMTS2 protein düzeyine etkisi.

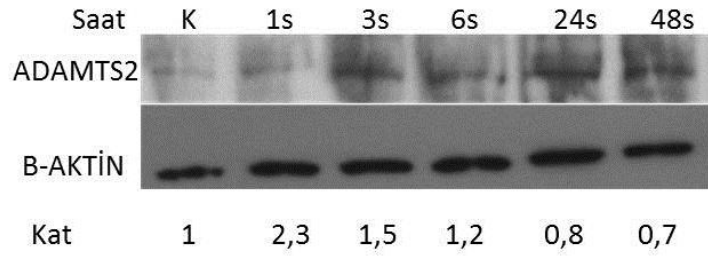


Şekil 3.61: Saos hücrelerinde IL-1 α sitokininin ADAMTS3 protein düzeyine etkisi.

500Ü/ml konsantrasyonda 72 saat süresince Saos hücrelerine uygulanan IL-1 α sitokininin hem ADAMTS2 hem de ADAMTS3 protein seviyesini arttırdığı belirlendi.

3.5.7.4 Benzer MG-63 Hücre Modelinde IL-1 α Sitokininin ADAMTS2 Protein Düzeyine Olan Etkilerinin Westernblot ile Belirlenmesi

Bölüm 3.5.6.3'te belirtildiği gibi MG-63 hücrelerinde de IL-1 α stimülasyonu ile ADAMTS2 protein seviyesindeki değişimler westernblot çalışmalarıyla analiz edildi. Sonuçlar İmaje ile densitometrik olarak analiz edildi ve β -Aktin ile normalize edilip değerlendirildi.



Şekil 3.62: MG-63 hücrelerinde IL-1 α sitokininin ADAMTS2 protein düzeyine etkisi.

4. SONUÇ VE ÖNERİLER

Kollajenler hücreler arası matriksin ve bağ dokunun fibröz proteinleridir. Dokulara güç ve destek sağlar. Özellikle cilt yapısının temel bileşeni olduğu bilinen kollajenin, aslında bulunmadığı hemen hemen hiçbir doku yoktur. Yüksek yapılı canlılarda 16 çeşit kollajen tipi bulunmaktadır. Vücuttaki kollajenlerden %80-90'ını Tip I,II ve III kollajenleri oluşturmaktadır. Tip I, II, III ve tip V kollajenlerinin her biri prokollajen halinde sentezlenir. Prokollajenlerin işlenmesi sırasında amino ve karboksi terminal peptid uzantıları kesilir. ADAMTS2 prokollajen moleküllerinin amino kısmının işlenmesinden sorumludur. Ciltte bu işlenmeden alternatifsiz olarak ADAMTS2 sorumludur. Cilt dokusunda ADAMTS2 eksikliğinde, kollajenin işlenmesinde görev yapan diğer proteazlar bile (ADAMTS3 ve ADAMTS14) bu eksikliği tolere edememektedir.

ADAMTS2 ile ilgili olarak literatürde yapılan çalışmalara bakıldığında protein yapı ve analizleri yapılmış, özellikle Ehler-Danlos Sendromu Tip VIIC ve dermatosparaksis ile doğrudan bağlantısından dolayı mutasyon analizleri çalışılmıştır [24]. ADAMTS2'nin spermatogenezde ve sağlıklı dentin yapısının oluşturulmasında rol oynamasının yanısıra son yapılan çalışmada anti-tümör ve anti anjiyogenik aktivitelerinin bulunabileceğine de değinilmiştir [26, 27].

Organizma için oldukça önemli görevleri üstlenen *ADAMTS2* geninin kendi regülasyonunun nasıl olduğu henüz bilinmemektedir. Transkripsiyonel regülasyonun, genin en önemli regüle edildiği basamak olduğu dikkate alındığında *ADAMTS2* promotörün nasıl regüle edildiği, bazal transkripsiyonu kontrol eden önemli transkripsiyonel aktivatörleri ya da baskılayıcıları hakkında literatürde herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Yapılan bu çalışma *ADAMTS2*'nin transkripsiyonel regülasyonu konusunda yapılan ilk çalışma olması bakımından önem taşımaktadır.

Yapılan biyoinformatik analizlerle *ADAMTS2* promotorunun GC bazları açısından oldukça zengin bir içeriğe sahip olduğu hatta çalışılan bölgede CpG adalarının oluşma potansiyelinin oldukça yüksek olduğu belirlenmiştir. Ayrıca yapılan incelemelerde bu bölgenin oldukça kompleks sekonder yapı oluşumlarına

açık olduğu da anlaşılmıştır. Bunun yanı sıra dizi oldukça yoğun ardışık tekrarları da içermektedir. Bu nedenlerle *ADAMTS2* promotor bölgesinin amplifikasyonu sadece *Taq DNA* polimeraz enzimi kullanılarak yapılamamıştır. Promotor bölgesinin amplifikasyonu için GC zengin sekanslar için üretilmiş DNA polimeraz enzimleri, yine sekonder yapıların açılmasına olanak sağlayan hot-start PCR yöntemleri, Genome Walker stratejileri kullanılmış olmasına rağmen amplifikasyon yine de başarılı olamamıştır. PCR reaksiyonlarında GC diziler ve sekonder yapılar bakımından zengin kalıpların çoğaltılmasında çeşitli PCR kuvvetlendiricilerinin kullanıldığı literatürde farklı araştırmacılar tarafından kayıt edilmiştir [67, 69]. Bu PCR kuvvetlendiricilerinden betain, DMSO ve 7-deaza-GTP'nin üçlü kombinasyonu PCR reaksiyonlarında kullanılarak *ADAMTS2* promotoruna ait 760bç'lik bölge çoğaltılabiliştir. Bu bakımdan GC bazları açısından zengin ve kompleks sekonder yapılar içeren DNA kalıplarının PCR ile amplifikasyonu için yeni bir yaklaşım sunulmuştur.

PCR amplifikasyonu ile çoğaltılan, transkripsiyon başlangıç bölgesinden itibaren 760bç'lik promotor bölgesi transkripsiyonel aktivitenin belirlenebilmesi amacıyla haberci vektör sistemi olan ve deniz kopepodu *Metridia*'ya ait salınan lusiferazı içeren pMetLuc vektörüne klonlanmıştır.

Transkripsiyonel ve translasyonel başlangıç bölgeleri biyoinformatik olarak belirlenmiştir. Yapılan analizlerde promotor bölgesinin 110bç'lik bir 5'UTR bölgesine sahip olduğu belirlenmiştir. Dizi hizalamalarında bu bölgenin fare ve sıçanda da oldukça korunmuş fakat insan *ADAMTS2* promotoruna ait 5'UTR bölgesinin diğerlerine göre daha uzun olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca promotorun TATA kutusu içermediği belirlenmiştir. Promotor bölgesinde bulunan GA kutuları, GC kutuları ve CpG adalarının potansiyel olarak transkripsiyonun başlatılmasında görev aldığı sonucuna varılmıştır. [70, 71].

En yüksek promotor aktivitesi gösteren parçanın bulunması amacıyla kısaltılarak oluşturulan 3 farklı *ADAMTS2* promotor parçası lusiferaz vektörüne klonlanmıştır. Bu promotor parçalarıyla Saos hücrelerinde yapılan geçici transfeksiyon analizlerinde parçaların hepsinin transkripsiyonel olarak aktif oldukları belirlenmiştir. Ayrıca oluşturulan en küçük parçanın [-180/+112] promotor aktivitesi için yeterli olduğu belirlenmiştir.

Transkripsiyon faktörleri hücreye özgün transkripsiyonel aktivitede önemli rol oynayan moleküllerdir. Genlerin ekspresyonu seviyeleri bu faktörlere bağlı olarak çeşitlilik gösterebilmektedir. Bu nedenle MatInspector programı kullanılarak promotor üzerinde bulunan transkripsiyon faktörü bağlanma motifleri de incelenmiştir. Yapılan bu incelemeler sonucunda E2F, GC/SP1, GA kutusu, AP4, Krueppel like, Testis spesifik TF, Östrojen RE, Glukokortikoid RE, SP1, HIF, NF- κ B, C/EBP gibi bazı önemli transkripsiyon faktörlerinin bağlanma motiflerinin bulunduğu belirlenmiştir.

SP1 (Specificity Protein 1) insanlarda bulunan çinko parmak motifine sahip bir transkripsiyon faktörüdür. Normal fizyolojik ve patolojik birçok durumda ilgili genlerin transkripsiyonunu baskılayarak ya da aktive ederek özellikle embriyonik gelişimin erken evrelerinde görev yapmaktadır. Ayrıca insülin ve diğer hormonlarla indüklenen genlerin regülasyonunda anahtar rol oynamaktadır [72]. *ADAMTS2* promotoru üzerinde de bağlanma motifinin oldukça yüksek oranda bulunduğu tespit edilen SP1 ko-transfeksiyon çalışmalarıyla *ADAMTS2* promotor parçaları aktiviteleri üzerine olan etkisi araştırılmıştır. Promotor parçalarının SP1 ORF'sini içeren ekspresyon vektörleriyle birlikte geçici olarak Saos hücrelerine transfeksiyonu yapılmıştır. SP1'in transkripsiyonel aktiviteyi arttırıcı yönde etkisi olduğu belirlenmiştir. Ailenin diğer bazı üyelerinde de SP1'in transkripsiyonel aktiviteyi arttırıcı yöndeki etkisinin bilinmesi ve *ADAMTS2* için de benzer durumun gözlenmesi oldukça ilgi çekicidir [73].

Ko-transfeksiyon analizleri USF (Upstream stimulatory factor 1) ekspresyon plazmiti ile de yapılmıştır. USF "Helix-Loop-Helix" Lösün fermuarı motifine sahip bir transkripsiyon faktörüdür. Stres, immün yanıt, hücre döngüsü ve proliferasyon gibi süreçlerde önemli görevleri üstlenmektedir. Inr elementleri (Initiator elements) ve E-box motifleri aracılığıyla ilgili genlerin transkripsiyonunu aktive ettiği bilinmektedir. USF'nin pigmentasyonla olan bağlantısı da aydınlatılmıştır [74]. USF ekspresyon plazmitleri *ADAMTS2* promotor parçalarıyla birlikte transfekte edildiğinde transkripsiyonel aktiviteyi arttırıcı yönde etki ettiği anlaşılmıştır.

Özellikle yapılan DNA-protein etkileşim analiziyle de transkripsiyon faktörü bağlanma programı ile belirlenen ve GA kutusu olarak bilinen bölgeye USF'nin fonksiyonel olarak bağlandığı yarışma deneyleri ile gösterilmiştir. Elde edilen bu

sonuçların antikör supershift deneyleri ile de doğrulanması gelecekte planlanan çalışmalar arasındadır.

Çalışmanın diğer bir kısmını ADAMTS2 ekspresyonunun regülasyonu oluşturmaktadır. Literatürde ADAMTS ile ilgili yapılan ekspresyon analizlerine bakıldığında normal dokularda; insana ait; aort, kemik, cilt, tendon, mesane, retina, böbrek, akciğer, barsak, karaciğer, iskelet kasında ve fibroblast hücrelerinde ekspre olduğu bulunmuştur [10]. Ayrıca fare embriyosunda, sığır cilt ve retina hücrelerinde de ADAMTS2'nin ifade olduğu gösterilmiştir [24]. Normal dokularda yapılan çalışmaların yanısıra bazı model hücre hatlarında da ekspresyon analizleri yapılmıştır. Monositler, CD14⁺⁺ ve alveolar makrofajlarda MM6 (mono Mac6) ve THP-1 (acute monocytic leukemia cell line) monositik hücre hatlarında. glukokortikoid stimülasyonu sonrasında ADAMTS2 ekspresyonunun arttığı bulunmuştur. Epitel karakterli A549 (adenocarcinomic human alveolar basal epithelial cells), calu-3 (lung adenocarcinoma), Colo320 (human colon adenocarcinoma), BT-20 (mammary gland/breast carcinoma) ve fibroblast karakterli MRC-5 (human fetal lung fibroblast cells), WI-38 (human fibroblast-like fetal lung cell) hücre hatlarında ADAMTS2 ifadesi gösterilmiştir.[42]. Yapılan diğer bir çalışmada osteosarkoma modeli olan MG-63 hücre hattında ADAMTS2'nin mRNA düzeyinde ifade olduğu, gösterilmiş ayrıca, *TGF-β1* stimülasyonu ile doza ve zamana bağlı olarak 8 kat arttığı bulunmuştur [43]. Göz retinal pigment epitel hücre modeli olan ARPE-19 ile yapılan çalışmalarda TNF-α stimülasyonu sonrasında ADAMTS2 mRNA ve protein düzeyinde artış olduğu aydınlatılmıştır.

Çalışmamızda ADAMTS2'nin farklı hücre hatlarındaki mRNA ekspresyon seviyesi semi-kantitatif RT-PCR ile belirlenmiştir. ADAMTS2'nin MG-63 (İnsan osteosarkoma), Saos (İnsan osteosarkoma), HeLa (İnsan serviks kanseri), HT-29 (İnsan kolon kanseri), DU-145 (İnsan prostat kanseri), HUVEC (İnsan kordon endotel hücreleri), PC-3 (İnsan prostat kanseri), Ishikawa (İnsan endometrial adenokarsinoma) ve HL-60 (İnsan myeloid lösemi) hücrelerinden en fazla MG-63'lerde daha sonra sırasıyla; Saos, Ishikawa, PC-3, HT-29, HeLa, DU-145, HL-60 ve HUVEC hücrelerinde ifade olduğu bulunmuştur.

Saos hücrelerinde immünfloresans tekniği kullanılarak yapılan ADAMTS2 protein etiketlemelerinde hücrelerin hem sitoplazmasında hem de nükleusunda bu proteinin varlığı tespit edilmiştir.

ADAMTS'lere yakın benzerlik gösteren MMP'lerin hücreler arası matriksin şekillenmesinde görev yaptıkları bilinmektedir. Sitokinlerin, MMP'lerin normal ve kanserli hücre hatlarındaki regülasyonuna etkileri oldukça geniş bir çerçevede çalışılmıştır [74]. MMP'lerin sitokin regülasyonunun patolojik durumlardaki etkisinin bilinmesi tedavi araçlarının geliştirilmesi açısından önem taşımaktadır. ADAMTS ailesi üyeleri de hücreler arası matriksle bağlantılı ve hücreler arası alanda görev yapma potansiyeline sahip matriks metalloproteazlardır. Bu açıdan bakıldığında ADAMTS2'nin sitokinlerle olan regülasyonu konusunda literatürdeki çalışmalar oldukça sınırlı sayıdadır. Çalışmalarımızda ADAMTS2'nin mRNA ve protein düzeyinde ifade olduğunu belirlediğimiz MG-63 ve Saos osteosarkoma hücreleri model olarak alınmıştır. Farklı osteosarkoma modeli kullanılarak elde edilen sonuçların hücreye özgün bir durum olup olmadığı da kontrol edilmiştir. Öncelikle bir enflamasyon sitokini olan IL-6'nın ADAMTS2 mRNA düzeyini arttırıcı yönde etki gösterdiği bulunmuştur. Bunun yanı sıra benzer model olarak seçilen diğer osteosarkoma modelinde (MG-63) IL-6 stimülasyonu sonrası ADAMTS2 mRNA düzeyinde diğer modele göre daha yüksek bir artış tespit edilmiştir.

mRNA düzeyindeki bu indüklemenin ilgisiz bir doku modelinde araştırılması amacıyla insan kolon karsinomu modeli olan HT-29 kullanılmıştır. ADAMTS2'nin bu hücre hattında da diğer hücre hatlarında ki kadar olmasa da bir upregülasyona neden olduğu tespit edilmiştir.

Yapılan çalışmalarda Saos ve MG-63 hücrelerinde IL-6 stimülasyonunu takiben mRNA düzeyindeki artış ailenin diğer bir üyesi olan ve pNP olarak görev yapan ADAMTS3 için de doğrulanmıştır.

Bunun yanı sıra IL-6'nın Saos hücre proliferasyonuna olan etkisi MTT analizleriyle araştırılmıştır. IL-6'nın Saos hücrelerinde herhangi bir proliferasyona neden olmadığı belirlenmiştir..

mRNA düzeyindeki artışın protein düzeyiyle de korelasyon gösterip göstermediğinin araştırılması için Western blot tekniği kullanılmıştır. Saos hücrelerinde IL-6 uygulamasına bağlı olarak ADAMTS2 protein seviyesinin arttığı bulunmuştur. Protein seviyesindeki artış benzer model olarak seçilen MG-63 osteosarkom modelinde de tespit edilmiştir. MG-63 modelinde protein seviyesinde gözlenen artışın Saos modeline göre daha fazla olduğu bulunmuştur.

IL-6'nın ADAMTS3 protein düzeyine olan katkıları da incelenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre ADAMTS3 protein seviyesinin de artış gösterdiği ve bu artışın MG-63 modelinde daha yüksek olduğu bulunmuştur.

IL-6 muamelesinin ADAMTS2 gen ifadesinde meydana getirdiği artışın hücre içi hangi sinyal yolağıyla gerçekleştirildiğinin belirlenmesi amacıyla farklı sinyal yolak inhibitörleri kullanılmıştır. Bölüm 1.6.1'de bahsedildiği üzere IL-6'nın farklı hücre içi sinyal yolaklarını kullandığı bilinmektedir. Bu yolakları tek tek kullanabileceği gibi aynı zaman içerisinde birkaç sinyal yolağını da kullanabilmektedir. İnhibisyon çalışmalarında kullanılan SP600125, c-Jun N-terminal kinaz'ı (JNK) doza bağımlı olarak inhibe edebilmektedir. JNK ise MAPK ailesinin bir üyesidir. Enflamasyona karşı cevabın oluşturulmasında kilit rol oynar. İnhibisyon çalışmalarında kullanılan diğer inhibitörler; bir PI3 kinaz inhibitörü olan Wortmannin ve MEK inhibitörüdür. İnhibisyon çalışmaları bölüm 3.5.4.3'te belirtildiği şekilde uygulandı. Özetlenecek olursa; bir grup hücreye kontrol grubu oluşturması amacıyla sadece DMSO, diğer bir gruba sadece inhibitörler, diğer bir gruba inhibitörler ve sonrasında 6 saat süresince IL-6 sitokini, diğer bir grup hücreye de sadece IL-6 sitokini uygulanmıştır. Bütün gruplar westernblot ile analiz edilmiştir. Saos hücrelerinde IL-6'nın dominant olarak STAT-3 α üzerinden genlerin transkripsiyonunu arttırdığı bilinmektedir [75]. IL-6'nın oluşturduğu hücrel cevabın kontrolü anlamında yapılan inhibisyon çalışmalarında ADAMTS2 protein seviyesiyle birlikte STAT-3 α protein seviyesi de belirlenmiştir. IL-6 indüksiyonuyla beklendiği üzere STAT-3 α seviyesinin arttığı gözlemlenmiştir. Bu da Saos hücrelerinde IL-6 uygulamasının STAT-3 α yolağını aktive ettiğini göstermektedir. ADAMTS2 protein seviyelerine baktığımızda IL-6 stimülasyonu sonrasında ADAMTS2 seviyesinde beklenildiği üzere artış gözlenmiştir. Bahsedilen inhibitörler

ile birlikte IL-6 hücrelere uygulandığında ADAMTS2 protein düzeyindeki artış durumunu korumuştur. Bu bakımdan inhibitör uygulamasını takiben eklenen IL-6'nın Saos hücrelerinde *de-novo* protein sentezini aktive ettiği düşünülmektedir.

mRNA ve protein düzeyindeki artışın transkripsiyonel seviyede de etkisinin belirlenebilmesi amacıyla 4 farklı *ADAMTS2* promotor parçasının transfeksiyonla aktarıldığı Saos hücrelerine 500 Ü/ml IL-6 sitokini uygulanmış ve promotor parçaları üzerinde transkripsiyonel aktiviteyi arttırıcı yöndeki etkisi gözlenmiştir.

Enflamasyon sitokini olan IL-6'nın *ADAMTS2* ve *ADAMTS3* genleri üzerinde yaptığı upregülasyon etkisinin spesifik olup olmadığının araştırılması için yine bir enflamasyon sitokini olan IL-1 α 'nın da bu genler üzerindeki etkileri araştırılmıştır. IL-1 α , NF- κ B ve AP-1 transkripsiyon faktörleri aracılığıyla hücre canlılığı, proliferasyonu ve anjiyogenez ile bağlantılı genlerin regülasyonunu kontrol eder [76]. Saos hücrelerinde IL-1 α indüksiyonu ile yapılan çalışmalar sonucunda IL-1 α 'nın *ADAMTS2* ve *ADAMTS3* mRNA seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bir artışa yol açtığı bulunmuştur. Bu artışın protein düzeyleri ile de korelasyon gösterdiği belirlenmiştir.

Yine benzer model olarak seçilen MG-63 osteosarkoma modelinde de IL- α stimülasyonu sırasında *ADAMTS2* protein seviyesindeki artış anlamlı bulunmuştur.

Bunun yanı sıra IL-1 α 'nın Saos hücrelerinde proliferasyona olan katkısı da araştırılmıştır. MTT analizi sonucunda elde edilen veriler IL-1 α stimülasyonunun hücre proliferasyonu üzerinde anlamlı bir etkiye sahip olduğunu göstermektedir.

Bu çalışma ile ilk kez *ADAMTS2* promotor bölgesine ait 760bp'lik bölgenin karakterizasyonu yapılmış fonksiyonel olarak aktif promotor parçaları oluşturulmuştur. Transkripsiyonel aktivitenin SP1 ve USF transkripsiyon faktörleri tarafından arttırıldığı USF'nin fonksiyonel olarak *ADAMTS2* promotor bölgesine bağlandığı ilk kez yapılan bu çalışma ile belirlenmiştir. Bunun yanı sıra IL-6 stimülasyonunun *ADAMTS2* transkripsiyonel aktivitesini arttırdığı bu çalışma ile

açıklanmıştır. Sonuç olarak bu çalışma ile ADAMTS2 transkripsiyonel regülasyonu ile ilgili olarak önemli veriler elde edilmiştir.

IL-6 ve IL-1 α sitokinlerinin ADAMTS2 mRNA ve protein seviyelerinde artışa neden olduğu ve yine bir pNP olan ADAMTS3m RNA ve protein düzeylerinin belirtilen sitokinler tarafından arttığı bu çalışma ile belirlenmiştir.

MG-63 hücrelerinde ADAMTS2 ve ADAMTS3'ün sitokin aracılı ekspresiyonel regülasyonu konusunda literatüre yeni bilgiler sağlanmıştır. Bu anlamda yapılan bu çalışma ADAMTS2 promotorunun karakterizasyonu ve enflamasyon durumundaki ekspresiyonel regülasyonu çalışmalarına temel bir basamak oluşturmaktadır.

5. KAYNAKLAR

- [1] Sekhon, B. S., "Matrix metalloproteinases – an overview", *Research and Reports in Biology*, 1 1-20, (2010).
- [2] Canty, E. G., Kadler, K. E., "Procollagen trafficking, processing and fibrillogenesis", *J Cell Sci*, 118 (Pt 7), 1341-53, (2005).
- [3] Greenspan, D., 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).
- [4] Jones, G., Riley, G., "ADAMTS proteinases: a multi-domain, multi-functional family with roles in extracellular matrix turnover and arthritis", *Arthritis Research & Therapy*, 7 (4), 160 - 169, (2005).
- [5] Tang, B. L., "ADAMTS: a novel family of extracellular matrix proteases", *Int J Biochem Cell Biol*, 33 (1), 33-44, (2001).
- [6] Colige, A., Beschin, A., Samyn, B., Goebels, Y., Van Beeumen, J., Nusgens, B. V., Lapiere, C. M., "Characterization and partial amino acid sequencing of a 107-kDa procollagen I N-proteinase purified by affinity chromatography on immobilized type XIV collagen", *J Biol Chem*, 270 (28), 16724-30, (1995).
- [7] Kadler, K. E., Lightfoot, S. J., Watson, R. B., "Procollagen N-peptidases: procollagen N-proteinases", *Methods Enzymol*, 248 756-71, (1995).
- [8] Kuno, K., Kanada, N., Nakashima, E., Fujiki, F., Ichimura, F., 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).
- [9] Apte, S. S., "A disintegrin-like and metalloprotease (reprolysin type) with thrombospondin type 1 motifs: the ADAMTS family", *Int J Biochem Cell Biol*, 36 (6), 981-5, (2004).
- [10] Porter, S., Clark, I. M., Kevorkian, L., Edwards, D. R., "The ADAMTS metalloproteinases", *Biochem J*, 386 (Pt 1), 15-27, (2005).
- [11] Seals, D. F., Courtneidge, S. A., "The ADAMs family of metalloproteases: multidomain proteins with multiple functions", *Genes Dev*, 17 (1), 7-30, (2003).
- [12] Takeda, S., "Three-dimensional domain architecture of the ADAM family proteinases", *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 20 (2), 146-152, (2009).
- [13] Wise, R. J., Barr, P. J., Wong, P. A., Kiefer, M. C., Brake, A. J., Kaufman, R. J., "Expression of a human proprotein processing enzyme: correct cleavage of the von Willebrand factor precursor at a paired basic amino acid site", *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87 (23), 9378-82, (1990).

- [14] Roebroek, A. J., Schalken, J. A., Leunissen, J. A., Onnekink, C., Bloemers, H. P., Van De Ven, W. J., "Evolutionary conserved close linkage of the c-fes/fps proto-oncogene and genetic sequences encoding a receptor-like protein", *Embo j*, 5 (9), 2197-202, (1986).
- [15] Kiefer, M. C., Tucker, J. E., Joh, R., Landsberg, K. E., Saltman, D., Barr, P. J., "Identification of a second human subtilisin-like protease gene in the fes/fps region of chromosome 15", *DNA Cell Biol*, 10 (10), 757-69, (1991).
- [16] Somerville, R. P., Longpre, J. M., Apel, E. D., Lewis, R. M., Wang, L. W., Sanes, J. R., Leduc, R., Apte, S. S., "ADAMTS7B, the full-length product of the ADAMTS7 gene, is a chondroitin sulfate proteoglycan containing a mucin domain", *J Biol Chem*, 279 (34), 35159-75, (2004).
- [17] Kubota, Y., Nagata, K., Sugimoto, A., Nishiwaki, K., "Tissue architecture in the *Caenorhabditis elegans* gonad depends on interactions among fibulin-1, type IV collagen and the ADAMTS extracellular protease", *Genetics*, 190 (4), 1379-88, (2012).
- [18] Lancellotti, S., De Cristofaro, R., "Structure and proteolytic properties of ADAMTS13, a metalloprotease involved in the pathogenesis of thrombotic microangiopathies", *Prog Mol Biol Transl Sci*, 99 105-44, (2011).
- [19] Somerville, R. P., Jungers, K. A., Apte, S. S., "Discovery and characterization of a novel, widely expressed metalloprotease, ADAMTS10, and its proteolytic activation", *J Biol Chem*, 279 (49), 51208-17, (2004).
- [20] 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).
- [21] Sadler, J. E., "Von Willebrand factor, ADAMTS13, and thrombotic thrombocytopenic purpura", *Blood*, 112 (1), 11-8, (2008).
- [22] Colige, A., Vandenberghe, I., Thiry, M., Lambert, C. A., Van Beeumen, J., Li, S. W., Prockop, D. J., Lapiere, C. M., Nusgens, B. V., "Cloning and characterization of ADAMTS-14, a novel ADAMTS displaying high homology with ADAMTS-2 and ADAMTS-3", *J Biol Chem*, 277 (8), 5756-66, (2002).
- [23] Colige, A., Ruggiero, F., Vandenberghe, I., Dubail, J., Kesteloot, F., Van Beeumen, J., Beschin, A., Brys, L., Lapiere, C. M., Nusgens, B., "Domains and maturation processes that regulate the activity of ADAMTS-2, a metalloproteinase cleaving the aminopropeptide of fibrillar procollagens types I-III and V", *J Biol Chem*, 280 (41), 34397-408, (2005).
- [24] 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., Nusgens, B. V., "Human Ehlers-Danlos syndrome type VII C and bovine dermatosparaxis are caused by mutations in the procollagen I N-proteinase gene", *Am J Hum Genet*, 65 (2), 308-17, (1999).
- [25] Porter, S., Scott, S. D., Sassoon, E. M., Williams, M. R., Jones, J. L., Girling, A. C., Ball, R. Y., Edwards, D. R., "Dysregulated expression of adamalysin-

thrombospondin genes in human breast carcinoma", *Clin Cancer Res*, 10 (7), 2429-40, (2004).

[26] Dubail, J., Kesteloot, F., Deroanne, C., Motte, P., Lambert, V., Rakic, J. M., Lapiere, C., Nusgens, B., 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).

[27] De Coster, P. J., Cornelissen, M., De Paepe, A., Martens, L. C., Vral, A., "Abnormal dentin structure in two novel gene mutations [COL1A1, Arg134Cys] and [ADAMTS2, Trp795-to-ter] causing rare type I collagen disorders", *Arch Oral Biol*, 52 (2), 101-9, (2007).

[28] Bursavich, M. G., Gilbert, A. M., Lombardi, S., Georgiadis, K. E., Reifenberg, E., Flannery, C. R., Morris, E. A., "Synthesis and evaluation of aryl thioxothiazolidinone inhibitors of ADAMTS-5 (Aggrecanase-2)", *Bioorg Med Chem Lett*, 17 (5), 1185-8, (2007).

[29] Kramerova, I. A., Kawaguchi, N., Fessler, L. I., Nelson, R. E., Chen, Y., Kramerov, A. A., Kusche-Gullberg, M., Kramer, J. M., Ackley, B. D., Sieron, A. L., Prockop, D. J., Fessler, J. H., "Papilin in development; a pericellular protein with a homology to the ADAMTS metalloproteinases", *Development*, 127 (24), 5475-85, (2000).

[30] Wang, W. M., Ge, G., Lim, N. H., Nagase, H., Greenspan, D. S., "TIMP-3 inhibits the procollagen N-proteinase ADAMTS-2", *Biochem J*, 398 (3), 515-9, (2006).

[31] Vilcek, J., Feldmann, M., "Historical review: Cytokines as therapeutics and targets of therapeutics", *Trends Pharmacol Sci*, 25 (4), 201-9, (2004).

[32] Dinarello, C. A., "Historical Review of Cytokines", *Eur J Immunol*, 37 (1), 34-45, (2007).

[33] Brocker, C., Thompson, D., Matsumoto, A., Nebert, D. W., Vasiliou, V., "Evolutionary divergence and functions of the human interleukin (IL) gene family", *Hum Genomics*, 5 (1), 30-55, (2010).

[34] De Weerd, N. A., Samarajiwa, S. A., Hertzog, P. J., "Type I interferon receptors: biochemistry and biological functions", *J Biol Chem*, 282 (28), 20053-7, (2007).

[35] Vilcek, J., Lee, T. H., "Tumor necrosis factor. New insights into the molecular mechanisms of its multiple actions", *J Biol Chem*, 266 (12), 7313-6, (1991).

[36] Metcalf, D., "The colony-stimulating factors and cancer", *Nat Rev Cancer*, 10 (6), 425-34, (2010).

[37] Olson, T. S., Ley, K., "Chemokines and chemokine receptors in leukocyte trafficking", *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 283 (1), R7-28, (2002).

[38] Jakowlew, S. B., "Transforming growth factor-beta in cancer and metastasis", *Cancer Metastasis Rev*, 25 (3), 435-57, (2006).

- [39] Spooren, A., Kolmus, K., Laureys, G., Clinckers, R., De Keyser, J., Haegeman, G., Gerlo, S., "Interleukin-6, a mental cytokine", *Brain Res Rev*, 67 (1-2), 157-83, (2011).
- [40] Scheller, J., Chalaris, A., Schmidt-Arras, D., Rose-John, S., "The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6", *Biochim Biophys Acta*, 1813 (5), 878-88, (2011).
- [41] O'Neill, L. A., Greene, C., "Signal transduction pathways activated by the IL-1 receptor family: ancient signaling machinery in mammals, insects, and plants", *J Leukoc Biol*, 63 (6), 650-7, (1998).
- [42] Hofer, T. P., Frankenberger, M., Mages, J., Lang, R., Meyer, P., Hoffmann, R., Colige, A., Ziegler-Heitbrock, L., "Tissue-specific induction of ADAMTS2 in monocytes and macrophages by glucocorticoids", *J Mol Med (Berl)*, 86 (3), 323-32, (2008).
- [43] Wang, W. M., Lee, S., Steiglit, B. M., Scott, I. C., Lebares, C. C., Allen, M. L., Brenner, M. C., Takahara, K., Greenspan, D. S., "Transforming growth factor-beta induces secretion of activated ADAMTS-2. A procollagen III N-proteinase", *J Biol Chem*, 278 (21), 19549-57, (2003).
- [44] Bevitt, D. J., Mohamed, J., Catterall, J. B., Li, Z., Arris, C. E., Hiscott, P., Sheridan, C., Langton, K. P., Barker, M. D., Clarke, M. P., Mckie, N., "Expression of ADAMTS metalloproteinases in the retinal pigment epithelium derived cell line ARPE-19: transcriptional regulation by TNFalpha", *Biochim Biophys Acta*, 1626 (1-3), 83-91, (2003).
- [45] Köçkar, F. T., "Characterisation of the coding and promoter region of the *Xenopus laevis* C/EBP alpha gene", Ph.D, Cardiff School of Biosciences, Cardiff, (1999).
- [46] Froger, A., Hall, J. E., "Transformation of plasmid DNA into *E. coli* using the heat shock method", *J Vis Exp*, (6), 253, (2007).
- [47] Aydın, M., "İnsan Karbonik Anhidraz I (hCA I) Geninin Klonlanması, *E. Coli* 'de Ekspresyonu ve Phe91Asn Yönlendirilmiş Mutageneziyle Elde Edilen Mutant Enzimin İnhibitörlere Karşı İlgisinin Araştırılması", Yüksek Lisans Tezi, Balıkesir Üniversitesi, Balıkesir, (2007).
- [48] Scientific, T., GeneJET Plasmid Miniprep Kit Product Information, Thermo Fisher Scientific Inc., 2011,
- [49] [online], (23.07.2013), www.thermoscientific.com/fermentas,
- [50] Yildirim, H., "Karbonik Anhidraz 9 Geninin Transkripsiyonel Kontrolünün Moleküler Analizi", Doktora Tezi, Balıkesir Üniversitesi, Balıkesir, (2009).
- [51] Paul, N., Shum, J., Le, T., "Hot start PCR", *Methods Mol Biol*, 630 301-18, (2010).
- [52] Korbie, D. J., Mattick, J. S., "Touchdown PCR for increased specificity and sensitivity in PCR amplification", *Nat Protoc*, 3 (9), 1452-6, (2008).

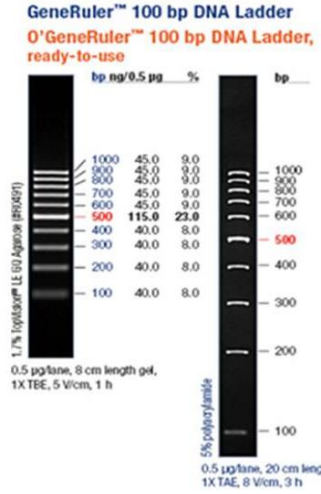
- [53] Warburg, O., W., C., "Isolierung und Kristallisation des Gärungsferments Enolase", *Biochem Z*, 310 384-421, (1942).
- [54] J., G., "Validity of nucleic acid purities monitored by 260/280 absorbance ratios", *BioTechniques*, 18 (1), 62-63, (1995).
- [55] Strober, W., "Trypan blue exclusion test of cell viability", *Curr Protoc Immunol*, Appendix 3 Appendix 3B, (2001).
- [56] Mv, B., Pm, H., As, T., "Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction", *Biotechnology Annual Review*, 11 127-152 (2005).
- [57] Markova, S. V., "Cloning and Expression of cDNA for a Luciferase from the Marine copepod *Metridia longa*", *J Biol Chem*, 279 (5), 3212-3217, (2004).
- [58] Yang, T. T., Sinai, P., Kitts, P. A., Kain, S. R., "Quantification of gene expression with a secreted alkaline phosphatase reporter system", *BioTechniques*, 23 (6), 1110-4, (1997).
- [59] Livak, K. J., Schmittgen, T. D., "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method", *Methods*, 25 (4), 402-8, (2001).
- [60] Uk, L., "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4", *Nature*, 227 (5259), 680-685, (1970).
- [61] Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J., "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications", *Proc Natl Acad Sci U S A*, 76 (9), 4350-4, (1979).
- [62] Abramoff, M.D., M., P.J., R., S.J., "Image Processing with ImageJ", *Biophotonics International*, 11 (7), 36-42, (2004).
- [63] Fritschy, J.-M., Härtig, W., "Immunofluorescence", *eLS*, John Wiley & Sons, Ltd, (2001).
- [64] Hellman, L. M., Fried, M. G., "Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) for detecting protein-nucleic acid interactions", *Nat Protoc*, 2 (8), 1849-61, (2007).
- [65] [online], (22.07.2013), <http://www.chem.agilent.com/library/brochures/5989-8281enus.pdf>,
- [66] [online], (24.07.2013), http://www.ebi.ac.uk/Tools/services/web/toolresult.ebi?jobId=emboss_cpgplot-I20130724-205340-0101-79263184-oy&tool=emboss_cpgplot&analysis=cpgplot,
- [67] Pratyush, D. D., Tiwari, S., Kumar, A., Singh, S. K., "A new approach to touch down method using betaine as co-solvent for increased specificity and intensity of GC rich gene amplification", *Gene*, 497 (2), 269-72, (2012).
- [68] Siebert, P. D., Chenchik, A., Kellogg, D. E., Lukyanov, K. A., Lukyanov, S. A., "An improved PCR method for walking in uncloned genomic DNA", *Nucleic Acids Research*, 23 (6), 1087-1088, (1995).

- [69] Ralser, M., Querfurth, R., Warnatz, H. J., Lehrach, H., Yaspo, M. L., Krobitsch, S., "An efficient and economic enhancer mix for PCR", *Biochem Biophys Res Commun*, 347 (3), 747-51, (2006).
- [70] Heidari, A., Nariman Saleh Fam, Z., Esmaeilzadeh-Gharehdaghi, E., Banan, M., Hosseinkhani, S., Mohammadparast, S., Oladnabi, M., Ebrahimpour, M. R., Soosanabadi, M., Farokhashtiani, T., Darvish, H., Firouzabadi, S. G., Farashi, S., Najmabadi, H., Ohadi, M., "Core promoter STRs: novel mechanism for inter-individual variation in gene expression in humans", *Gene*, 492 (1), 195-8, (2012).
- [71] Seizl, M., Hartmann, H., Hoeg, F., Kurth, F., Martin, D. E., Ding, J., Cramer, P., "A Conserved GA Element in TATA-Less RNA Polymerase II Promoters", *PLoS ONE*, Volume 6 (11), 1-8, (2011).
- [72] Solomon, S. S., Majumdar, G., Martinez-Hernandez, A., Raghov, R., "A critical role of Sp1 transcription factor in regulating gene expression in response to insulin and other hormones", *Life Sci*, 83 (9-10), 305-12, (2008).
- [73] Hohberg, M., Knochel, J., Hoffmann, C. J., Chlench, S., Wunderlich, W., Alter, A., Maroski, J., Vorderwulbecke, B. J., Da Silva-Azevedo, L., Knudsen, R., Lehmann, R., Fiedorowicz, K., Bongrazio, M., Nitsche, B., Hoepfner, M., Styp-Rekowska, B., Pries, A. R., Zakrzewicz, A., "Expression of ADAMTS1 in endothelial cells is induced by shear stress and suppressed in sprouting capillaries", *J Cell Physiol*, 226 (2), 350-61, (2011).
- [74] Corre, S., Galibert, M. D., "Upstream stimulating factors: highly versatile stress-responsive transcription factors", *Pigment Cell Res*, 18 (5), 337-48, (2005).
- [75] Tu, B., Du, L., Fan, Q.-M., Tang, Z., Tang, T.-T., "STAT3 activation by IL-6 from mesenchymal stem cells promotes the proliferation and metastasis of osteosarcoma", *Cancer Letters*, 325 (1), 80-88, (2012).
- [76] Wolf, J. S., Chen, Z., Dong, G., Sunwoo, J. B., Bancroft, C. C., Capo, D. E., Yeh, N. T., Mukaida, N., Van Waes, C., "IL (interleukin)-1alpha promotes nuclear factor-kappaB and AP-1-induced IL-8 expression, cell survival, and proliferation in head and neck squamous cell carcinomas", *Clin Cancer Res*, 7 (6), 1812-20, (2001).

EKLER

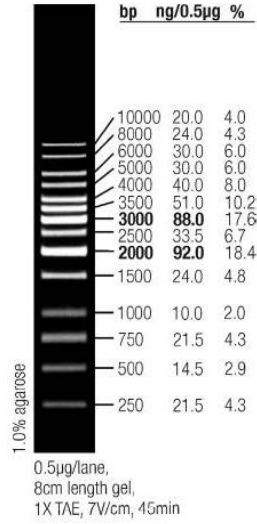
6. EKLER

EK-A DNA Büyüklük Belirteçleri



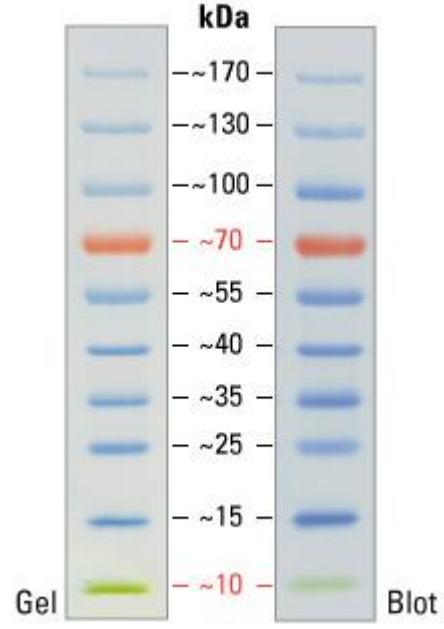
Şekil 6.1: DNA büyüklük belirteci (100bç).

GeneRuler™ 1kb DNA Ladder



Şekil 6.2: DNA büyüklük belirteci (1kb).

EK-B Protein Büyüklük Belirteci



Şekil 6.3: Protein büyüklük belirteci.

EK-C ADAMTS2 cDNA Bilgileri

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

LOCUS NM_014244 3661 bp mRNA linear PRI 22-OCT-2008
DEFINITION Homo sapiens ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif, 2 (ADAMTS2), transcript variant 1, mRNA.
ACCESSION NM_014244
VERSION NM_014244.2 GI:110825973
KEYWORDS .
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 3661)
AUTHORS Colige,A., Nuytinck,L., Hausser,I., van Essen,A.J., Thiry,M., Herens,C., Ades,L.C., Malfait,F., Paepe,A.D., Franck,P., Wolff,G., Oosterwijk,J.C., Smitt,J.H., Lapiere,C.M. and Nusgens,B.V.
TITLE Novel types of mutation responsible for the dermatosparactic type of Ehlers-Danlos syndrome (Type VIIC) and common polymorphisms in the ADAMTS2 gene
JOURNAL J. Invest. Dermatol. 123 (4), 656-663 (2004)
PUBMED [15373769](#)
REMARK GeneRIF: Although exons 3-5 or 14-16 encode protein domains that have not been recognized as crucial for ADAMTS-2 activity, the aminoprocollagen processing was strongly impaired, providing evidence for the requirement of these domains for proper enzyme function
REFERENCE 2 (bases 1 to 3661)
AUTHORS Kevorkian,L., Young,D.A., Darrah,C., Donell,S.T., Shepstone,L., Porter,S., Brockbank,S.M., Edwards,D.R., Parker,A.E. and Clark,I.M.
TITLE Expression profiling of metalloproteinases and their inhibitors in cartilage
JOURNAL Arthritis Rheum. 50 (1), 131-141 (2004)
PUBMED [14730609](#)
REFERENCE 3 (bases 1 to 3661)
AUTHORS Colige,A., Vandenberghe,I., Thiry,M., Lambert,C.A., Van Beeumen,J., Li,S.W., Prockop,D.J., Lapiere,C.M. and Nusgens,B.V.
TITLE Cloning and characterization of ADAMTS-14, a novel ADAMTS displaying high homology with ADAMTS-2 and ADAMTS-3
JOURNAL J. Biol. Chem. 277 (8), 5756-5766 (2002)
PUBMED [11741898](#)
REFERENCE 4 (bases 1 to 3661)
AUTHORS Tomii,Y., Kamochi,J., Yamazaki,H., Sawa,N., Tokunaga,T., Ohnishi,Y., Kijima,H., Ueyama,Y., Tamaoki,N. and Nakamura,M.
TITLE Human thrombospondin 2 inhibits proliferation of microvascular endothelial cells
JOURNAL Int. J. Oncol. 20 (2), 339-342 (2002)
PUBMED [11788898](#)
REMARK GeneRIF: when conditioned media of TSP2-transfectants were added to cultures of bovine pulmonary microvascular endothelial cells (BPMEC), the BPMEC proliferation was significantly inhibited; suggesting that human TSP2 is a potential inhibitor of angiogenesis
REFERENCE 5 (bases 1 to 3661)
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 6 (bases 1 to 3661)

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 metalloproteases. General features and genomic distribution of the ADAM-TS family
 JOURNAL J. Biol. Chem. 274 (36), 25555-25563 (1999)
 PUBMED [10464288](#)
 REFERENCE 7 (bases 1 to 3661)
 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 8 (bases 1 to 3661)
 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 9 (bases 1 to 3661)
 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 [AJ003125.1](#), [AC008544.7](#), [AC010216.8](#), [CO247372.1](#), [BX479109.1](#) and [AI417257.1](#).
 On Jul 28, 2006 this sequence version replaced gi:[7656866](#).

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 two transcript variants. The short transcript encodes a protein which has no significant procollagen N-peptidase activity. [provided by RefSeq].

Transcript Variant: This variant (1) represents the longer transcript and encodes the longer isoform (1). Isoform 1 contains four C-terminal TS motifs.

COMPLETENESS: complete on the 3' end.

PRIMARY	REFSEQ_SPAN	PRIMARY_IDENTIFIER	PRIMARY_SPAN	COMP
	1-785	AJ003125.1	1-785	
	786-891	AC008544.7	143676-143781	
	892-2027	AJ003125.1	892-2027	
	2028-2085	AC010216.8	49261-49318	
	2086-2531	AJ003125.1	2086-2531	
	2532-2905	CO247372.1	267-640	
	2906-3001	AJ003125.1	2906-3001	
	3002-3549	BX479109.1	67-614	
	3550-3661	AI417257.1	1-112	c

FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..3661
 /organism="Homo sapiens"
 /mol_type="mRNA"
 /db_xref="taxon:[9606](#)"

```

/chromosome="5"
/map="5qter"
1..3661
gene
/gene="ADAMTS2"
/gene_synonym="ADAM-TS2; ADAMTS-3; hPCPNI; NPI; PCINP; PCPNI"
/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"
1..3636
CDS
/gene="ADAMTS2"
/gene_synonym="ADAM-TS2; ADAMTS-3; hPCPNI; NPI; PCINP; PCPNI"
/EC_number="3.4.24.14"
/note="isoform 1 preproprotein is encoded by transcript variant 1; procollagen I N-proteinase; a disintegrin-like and metalloprotease (reprolysin type) with thrombospondin type 1 motif, 2; procollagen N-endopeptidase"
/codon_start=1
/product="ADAM metallopeptidase with thrombospondin type 1 motif, 2 isoform 1 preproprotein"
/protein_id="NP_055059.2"
/db_xref="GI:110825974"
/db_xref="CCDS:CCDS4444.1"
/db_xref="GeneID:9509"
/db_xref="HGNC:218"
/db_xref="HPRD:05173"
/db_xref="MIM:604539"
/translation="MDPPAGAARRLLCPALLLLLLLLLLPPPLPPPPPPANARLAAAAD
PPGGPLGHGAERILAVPVRTDAQGRLVSHVVSAASTRAGVRRARRAAPVRTPSFPGGNE
EEPGSHLFYNVTVFGRDLHLRLRPNARLVAPGATMEWQGEKGTTRVEPLLGSCLYVGD
VAGLAEASSVALSNCDGLAGLIRMEEEEFFIEPLEKGLAAQEAQGRVHVYRRPPTS
PPLGGPQALDTGASLDSLDSLRALGVLEEHANSSRRRARRHAADDDYNIENVLLGVDD
SVVQFHGKEHVQKYLTLNMNIVNEIYHDESLGAHINVVLVRIILLSYGKSMSLIEIGN
PSQSLENVCRWAYLQQKPDGTGHDEYHDHAIIFLTRQDFGPGMQGYAPVTGMCHPVRSC
TLNHEDGFSSAFVVAHETGHVVGMEHDGQGNRCGDEVRLGSIAPLVQAFAHRFHWSR
CSQQELSRYLHSYDCLDDPPFAHDWPALPQLPGLHYSMNEQCRFDGFLGYMMCTAFRT
FDPCKQLWCSPDNYPYFCKTKKGPPLDGTMCAPGKHCFCGKHC IWLTPIILKRDGSWG
WSPFGSCSRTCGTGVKFRTRQCDNPHPANGGRTCSGLAYDFQLCSRQDCPDSLADFRE
EQCRQWDLYFEHGDAQHHWLPHEHRDAKERCHLYCESRETGEVVSMMKRMVHDGTRCSY
KDAFSLCVRGDCRKYVCGDGVIGSSKQEDKCGVCGGDNSHCKVVKGTFTRSPKMHGYIK
MFEIPAGARHLLIQEVDATSHHLAVKNLETGKFILNEENDVDASSKTFIAMGVEWEYR
DEDGRETLQTMGPHLGTITVLVIPVGDTRVSLTYKMIHEDSLNVDNNVLEEDSVVY
EWALKKWSPCSKPCGGGQFTKYGCRRLDHKMVRHGFCAALSKPKAIRACNPQEC
QPVVVTGEWEPCSQTCGRTGMQVRSVRCIQPLHDNTRSVHAKHCNDARPESRRACSR
ELCPGRWRAGPWSQCSVTCGNGTQERPVLCRTADDSFGICQEERPETARTCRLGPCPR
NISDPSKKSYYVQWLSRPDPDSPIRKISSKGHCQGDKSIFCRMEVLSRYCSIPGYNKL
CKKSNLYNNLTNVEGRIEPPPGKHNDIDVFMPTLPVPTVAMEVRPSPSTPLEVPLNA
SSTNATEDHPETNAVDEPYKIHGLEDEVQPPNLI PRRPSPYEKTRNQRIQELIDEMRK
KEMLGKF"
1..139
exon
/gene="ADAMTS2"
/gene_synonym="ADAM-TS2; ADAMTS-3; hPCPNI; NPI; PCINP; PCPNI"
/inference="alignment:Splign"
/number=1
140..534
exon
/gene="ADAMTS2"
/gene_synonym="ADAM-TS2; ADAMTS-3; hPCPNI; NPI; PCINP; PCPNI"
/inference="alignment:Splign"
/number=2
535..688
exon
/gene="ADAMTS2"
/gene_synonym="ADAM-TS2; ADAMTS-3; hPCPNI; NPI; PCINP;

```

```

PCPNI"
/inference="alignment:Splice"
/number=3
  exon    689..891
/gene="ADAMTS2"
/gene_synonym="ADAM-TS2; ADAMTS-3; hPCPNI; NPI; PCINP;
PCPNI"
/inference="alignment:Splice"
/number=4
  exon    892..975
/gene="ADAMTS2"
/gene_synonym="ADAM-TS2; ADAMTS-3; hPCPNI; NPI; PCINP;
PCPNI"
/inference="alignment:Splice"
/number=5
  exon    976..1132
/gene="ADAMTS2"
/gene_synonym="ADAM-TS2; ADAMTS-3; hPCPNI; NPI; PCINP;
PCPNI"
/inference="alignment:Splice"
/number=6
  exon    1133..1238
/gene="ADAMTS2"
/gene_synonym="ADAM-TS2; ADAMTS-3; hPCPNI; NPI; PCINP;
PCPNI"
/inference="alignment:Splice"
/number=7
  exon    1239..1382
/gene="ADAMTS2"
/gene_synonym="ADAM-TS2; ADAMTS-3; hPCPNI; NPI; PCINP;
PCPNI"
/inference="alignment:Splice"
/number=8
  exon    1383..1515
/gene="ADAMTS2"
/gene_synonym="ADAM-TS2; ADAMTS-3; hPCPNI; NPI; PCINP;
PCPNI"
/inference="alignment:Splice"
/number=9
  exon    1516..1629
/gene="ADAMTS2"
/gene_synonym="ADAM-TS2; ADAMTS-3; hPCPNI; NPI; PCINP;
PCPNI"
/inference="alignment:Splice"
/number=10
  exon    1630..1775
/gene="ADAMTS2"
/gene_synonym="ADAM-TS2; ADAMTS-3; hPCPNI; NPI; PCINP;
PCPNI"
/inference="alignment:Splice"
/number=12
  exon    1776..1951
/gene="ADAMTS2"
/gene_synonym="ADAM-TS2; ADAMTS-3; hPCPNI; NPI; PCINP;
PCPNI"
/inference="alignment:Splice"
/number=13
  exon    1952..2085
/gene="ADAMTS2"
/gene_synonym="ADAM-TS2; ADAMTS-3; hPCPNI; NPI; PCINP;
PCPNI"
/inference="alignment:Splice"
/number=14
  exon    2086..2209
/gene="ADAMTS2"
/gene_synonym="ADAM-TS2; ADAMTS-3; hPCPNI; NPI; PCINP;
PCPNI"
/inference="alignment:Splice"

```

```

/number=15
exon    2210..2290
/gene="ADAMTS2"
/gene_synonym="ADAM-TS2; ADAMTS-3; hPCPNI; NPI; PCINP;
PCPNI"
/inference="alignment:Splign"
/number=16
exon    2291..2457
/gene="ADAMTS2"
/gene_synonym="ADAM-TS2; ADAMTS-3; hPCPNI; NPI; PCINP;
PCPNI"
/inference="alignment:Splign"
/number=17
exon    2458..2617
/gene="ADAMTS2"
/gene_synonym="ADAM-TS2; ADAMTS-3; hPCPNI; NPI; PCINP;
PCPNI"
/inference="alignment:Splign"
/number=18
exon    2618..2750
/gene="ADAMTS2"
/gene_synonym="ADAM-TS2; ADAMTS-3; hPCPNI; NPI; PCINP;
PCPNI"
/inference="alignment:Splign"
/number=19
exon    2751..2958
/gene="ADAMTS2"
/gene_synonym="ADAM-TS2; ADAMTS-3; hPCPNI; NPI; PCINP;
PCPNI"
/inference="alignment:Splign"
/number=20
exon    2959..3088
/gene="ADAMTS2"
/gene_synonym="ADAM-TS2; ADAMTS-3; hPCPNI; NPI; PCINP;
PCPNI"
/inference="alignment:Splign"
/number=21
exon    3089..3178
/gene="ADAMTS2"
/gene_synonym="ADAM-TS2; ADAMTS-3; hPCPNI; NPI; PCINP;
PCPNI"
/inference="alignment:Splign"
/number=22
exon    3179..3654
/gene="ADAMTS2"
/gene_synonym="ADAM-TS2; ADAMTS-3; hPCPNI; NPI; PCINP;
PCPNI"
/inference="alignment:Splign"
/number=23
polyA signal 3635..3640
/gene="ADAMTS2"
/gene_synonym="ADAM-TS2; ADAMTS-3; hPCPNI; NPI; PCINP;
PCPNI"
polyA site 3654
/gene="ADAMTS2"
/gene_synonym="ADAM-TS2; ADAMTS-3; hPCPNI; NPI; PCINP;
PCPNI"

```

ORIGIN

```

1 atggatccgc cggcgggagc cgctcgccgc ctgctctgcc ccgcgctgct gctgctgctg
61 ctgctgctgc cgccgccgct cctgccgccg ccgccgccgc ccgcgaacgc caggctcgcc
121 gccgcgccgc accccccagg cgggcccctg gggcacggag cggagcgcac cctggcggtg
181 cccgtgcgca ctgacgccca gggccgcttg gtgtcccacg tgggtgctggc agctacgtcc
241 agagcagggg tacgagcccg cagggccgcc ccggtccgga ccccgagctt ccccgaggc
301 aacgaggagg agcctggcag tcacctcttc tacaatgtca cggctcttgg ccgagacctg
361 cacctgcgcc tgcggcccaa cgcccgcctc gtggcgcccc gggcactat ggagtgccag
421 ggcgagaagg gcaccaccgc cgtggagccc ctgctcggga gctgtctcta cgtcggagac
481 gtggccggcc tagccgaagc ctctctgtg gcgctcagca actgcgatgg gctggctggt
541 ctgatccgga tggaggagga ggagttcttc atcgaaccct tggagaaggg gctggcggcg

```

601 caggaggctg agcaaggcgg tgtgcatgtg gtgtatcgcc ggccaccac gtcccctcct
661 ctcggggggc cacaggccct ggacacaggg gcctccctgg acagcctgga cagcctcagc
721 cgcgccctgg gcgtcctaga ggagcacgcc aacagctcga ggccggaggc acgcaggcat
781 gctgcggagc atgactaaa catcgaggtc ctgctggggc tggatgactc tgtgggtcag
841 ttccacggga aggagcacgt acagaagtac ctgctgacac tcatgaacat tgtcaatgaa
901 atctaccatg acgagtcctt ggggtgccac atcaacgtgg tctgtgtgag gatcatctc
961 ctgagctatg gaaagtccat gacccctatc gagatcgga acccctctca gacccctggg
1021 aatgtctgcc gctgggccta cctccagcag aagccagaca cgggccacga tgaataccac
1081 gatcacgcca tcttctcac acggcaggac tttgggcctt cgggcatgca aggctatgct
1141 cctgtcaccg gcatgtgcca tccggtcggc agctgcacc tgaacctga ggacggcttc
1201 tectcagcgt ttgtggtggc ccatgagact ggccacgtgc tgggcatgga gcacgacggg
1261 cagggcaacc gctgtggcga cgaggtgagg ctgggcagca tcatggcgcc cctggtgag
1321 gccgccttcc accgcttcca ctgggtccgc tgcagccagc aggagctgag ccgctacctg
1381 cactcctatg actgcctgct ggatgacccc ttcgcccacg actggccggc gctgcccag
1441 ctcccgggac tgcactactc catgaacgag caatgccgct ttgacttcgg cctgggtac
1501 atgatgtgca cggcgcttcc gacctttgac ccctgcaagc agctgtggtg cagccatcct
1561 gacaaccctt acttttgcaa gaccaagaag gggccccctt tggacggagc tatgtgtgca
1621 cctggcaagc attgttttaa aggacactgc atctggctga cacctgacat cctcaaacgg
1681 gacggcagct ggggctgctt gagtccgctt ggctcctgct cacgtacctg tggcagggc
1741 gtgaagttca ggaccgcca gtgtgacaac ccacaccgg ccaacggggg ccgcacctgc
1801 tggggccttg cctaccgactt ccagctctgc agccgccagg actgcccga ctccctggct
1861 gacttccgag aggagcagtg ccgcccagtg gacctgtact tgcagcacgg cgacgccag
1921 caccactggc tgccccacga gcaccgggat gcccaaggaga gatgccacct gtactgcgag
1981 tccagggaga ccggggaggt ggtgtccatg aagcgcatgg tgcattgacg gacgcgctgc
2041 tctacaagg acgccttcag cctctgtgtg cgcggggact gcaggaaggt gggctgtgac
2101 ggtgtgatcg gctccagcaa gcaggaagac aagtgtggcg tgtgcccagg ggacaacagc
2161 cactgcaaag tggcaaggg cacgttcaca cggtcacca agaagcatgg ttacatcaag
2221 atgtttgaga tccctgcagg agccagacac ctgctcatc aggaggtaga cgcaccagc
2281 caccatctgg ccgtcaagaa cctggagaca ggcaagtca tcttaaatga agagaatgac
2341 gtggatgcca gttccaaaac cttcattgac atgggctggt agtgggagta cagagacgag
2401 gacggccggg agacgtgca gaccatggc cccctccacg gcacatcac cgttctggtc
2461 atcccgggtg gagacaccg ggtctactg acgtacaaat acatgatcca tgaggactca
2521 ctgaatgtcg acgacaaca cgtcctggaa gaggactctg tggctctacg gtgggcccctg
2581 aagaagtggc tcccgctgct caagccctgt ggcggagggt cccagttcac caagtatggc
2641 tgccgcccga ggetggacca caagatggtg caccgtggct tctgtgccg cctctcgaag
2701 cccaaagcca tccgcagagc gtgcaacca caggaatgct cccagccagt gtgggtcaca
2761 ggcaaatggg agccatgtag ccagacctgt gggcgacag gcatgcaggt gcgctccgtg
2821 cgctgcattc agccgctaca cgacaacacc acccgctccg tgcacgcaa gcaactgcaat
2881 gacgcccggc ccgagagccg ccgggctgct agccgagagc tctgcccctg tctgtggcga
2941 gccgggcccct ggtcccagtg cttagtaacc tgtggcaacg gcaccaggga gggccagtg
3001 ctctgcccga ccgcccagca cagcttcggc atctgccagg aggagcgtcc tgagacagcg
3061 aggacctgca ggcttggccc ctgtcccga aacatctcag atccctcaa gaagagctac
3121 gtagttcagt ggctgtccc cccggacccc gactgcccga tccggaagat ctgctcaag
3181 ggccactgcc aaggcgaaa gtcaatatc ttaggatgg aagtctgtc ccgctattgc
3241 tccatcccag gctacaaca gctgtgctgc aagtcctgta acctgtaca caacctacc
3301 aacgtggagg gcaggataga gccaccgctt ggaagcaca acgacattga cgtgttcag
3361 cctaccctcc cagtgccac tgtagccatg gaggtgaggc catcaccag cccccctg
3421 gaggtccctc tcaatgcctc cagcacaat gccacagagg atcaccaga aaccaatgcc
3481 gtagatgaac cctacaaaat ccatggcctg gaagatgaag tccagccacc caacctaat
3541 cctcagcagc cgagccccta tgaagagacc agaaccaaa gaatccaaga gctcattgat
3601 gagatgcgga agaaagagat gctcggaaag ttctaataaa atggaaagat agcaaaaaa
3661 a

EK-D ADAMTS2 Restriksiyon Haritasi

Noncutters: AatII, AbsI, AclI, AflII, AflIII, AgeI, Aloi, ApaLI, ArsI, AscI, AvrII, BaeI, BarI, BcgI, BciVI, BglII, BplI, BsaBI, BsaXI, BsePI, Bsp1407I, BspHI, BtsI, ClaI, CspCI, DraIII, Eam1105I, Eco31I, EcoRV, Esp3I, FseI, FspAI, HindII, HindIII, HpaI, KpnI, MauBI, MfeI, MluI, NcoI, NdeI, NmeAIII, NruI, OliI, PacI, PmaCI, PmeI, PpiI, PshAI, PsiI, PI-PspI, PstI, PvuI, RsrII, Sall, SapI, ScaI, PI-SceI, SexAI, SgfI, SgrAI, SgrDI, SmaI, SnaBI, SpeI, SphI, SrfI, Sse8387I, SspI, SwaI, TaqII, TsoI, TspGWI, TspRI, TstI, Tth111I, VspI, XbaI, XhoI, XmnI

Name	Sequence	Site	Overhang	Frequency	Cut Positions
BsaAI	YACGTR	6	blunt	1	890
BsrBI	CCGCTC	6	blunt	1	449
BtrI	CACGTC	6	blunt	1	1379
Eco47III	AGCGCT	6	blunt	1	1886
MslI	CAYNNNNRTG	6	blunt	1	1735
StuI	AGGCCT	6	blunt	1	1302
AarI	CACCTGC	7	five_prime	1	1452
AccI	GTMKAC	6	five_prime	1	1726
AsuII	TTCGAA	6	five_prime	1	1900
BamHI	GGATCC	6	five_prime	1	1490
BclI	TGATCA	6	five_prime	1	1145
BstEII	GGTNACC	6	five_prime	1	268
BtgZI	GCGATG	6	five_prime	1	1404
EcoRI	GAATTC	6	five_prime	1	515
HgaI	GACGC	5	five_prime	1	1870
NheI	GCTAGC	6	five_prime	1	1573
NotI	GCGGCCGC	8	five_prime	1	290
SmlI	CTYRAG	6	five_prime	1	1547
TatI	WGTACW	6	five_prime	1	1453
TfiI	GAWTC	5	five_prime	1	1717

XhoII	RGATCY	6	five_prime	1	1490
BglI	GCCNNNNNGGC	6	three_prime	1	644
BsgI	GTGCAG	6	three_prime	1	1939
BsrDI	GCAATG	6	three_prime	1	911
BstXI	CCANNNNNNTGG	6	three_prime	1	1255
DrdI	GACNNNNNNGTC	6	three_prime	1	598
EciI	GGCGGA	6	three_prime	1	138
Hpy99I	CGWCG	5	three_prime	1	331
MmeI	TCCRAC	6	three_prime	1	1688
NspI	RCATGY	6	three_prime	1	1951
SacI	GAGCTC	6	three_prime	1	1097
SfiI	GGCCNNNNNGGCC	8	three_prime	1	644
TspDTI	ATGAA	5	three_prime	1	587
XcmI	CCANNNNNNNNTGG	6	three_prime	1	71
NaeI	GCCGGC	6	blunt	2	38, 456
AcyI	GRCGYC	6	five_prime	2	254, 452
ApoI	RAATTY	6	five_prime	2	515, 1526
AvaI	CYCGRG	6	five_prime	2	366, 1481
BbvCI	CCTCAGC	7	five_prime	2	258, 806
Bpu10I	CCTNAGC	6	five_prime	2	258, 806
BsmAI	GTCTC	5	five_prime	2	353, 543
BspMI	ACCTGC	6	five_prime	2	1452, 1622
Cfr10I	RCCGGY	6	five_prime	2	36, 454
EcoNI	CCTNNNNNAGG	6	five_prime	2	1232, 1774
NarI	GGCGCC	6	five_prime	2	254, 452
PfoI	TCCNGGA	6	five_prime	2	1757, 1848

PleI	GAGTC	5	five_prime	2	1289, 1734
SanDI	GGGWCCC	7	five_prime	2	495, 1162
AjuI	GAANNNNNNNTTGG	7	three_prime	2	1517, 1549
AlfI	GCANNNNNNNTGC	6	three_prime	2	1945, 1979
AlwNI	CAGNNNCTG	6	three_prime	2	1117, 1844
ApaI	GGGCCC	6	three_prime	2	24, 996
BdaI	TGANNNNNNNTCA	6	three_prime	2	837, 871
Eco57I	CTGAAG	6	three_prime	2	714, 774
FalI	AAGNNNNNCTT	6	three_prime	2	682, 714
PflMI	CCANNNNNTGG	6	three_prime	2	1333, 1605
SacII	CCGCGG	6	three_prime	2	335, 392
PvuII	CAGCTG	6	blunt	3	84, 100, 1426
BseYI	CCCAGC	6	five_prime	3	63, 1749, 1803
EcoP15I	CAGCAG	6	five_prime	3	1282, 1385, 1953
PaeI	CCCWGGG	7	five_prime	3	427, 675, 1158
AgsI	TTSAA	5	three_prime	3	520, 1792, 1941
BsmI	GAATGC	6	three_prime	3	628, 895, 1864
PstI	CTGCAG	6	three_prime	3	15, 105, 803
BalI	TGGCCA	6	blunt	4	1247, 1271, 1316,
StyI	CCWWGG	6	five_prime	4	482, 603, 980, 1382
Tsp45I	GTSAC	5	five_prime	4	268, 1466, 1516, 1672
BfiI	ACTGGG	6	three_prime	4	606, 732, 1042, 1321
BseRI	GAGGAG	6	three_prime	4	141, 459, 1046, 1635
GsuI	CTGGAG	6	three_prime	4	106, 1045, 1094, 1727
HaeII	RGCGCY	6	three_prime	4	257, 389, 455, 1888
HaeIV	GAYNNNNNRTC	6	three_prime	4	1362, 1385, 1396,

BceI	CCATC	5	five_prime	5	511, 784, 796, 1443,
FokI	GGATG	5	five_prime	5	515, 775, 963, 1741,
BseSI	GKGCMC	6	three_prime	5	24, 435, 996, 1482,
CfrI	YGGCCR	6	five_prime	6	290, 456, 1245, 1269,
PpuMI	RGGWCCY	7	five_prime	6	495, 1162, 1283,
Eco57MI	CTGRAG	6	three_prime	6	106, 714, 774, 1045,
SfaNI	GCATC	5	five_prime	7	288, 537, 644, 985,
HphI	GGTGA	5	three_prime	7	280, 575, 863, 1206,
MboII	GAAGA	5	three_prime	7	307, 663, 738, 810,
AvaII	GGWCC	5	five_prime	8	495, 600, 1162, 1283,
BsrI	ACTGG	5	three_prime	8	601, 738, 1007, 1048,
Hin4I	GAYNNNNNVTC	6	three_prime	8	820, 852, 1363, 1386,
BseMII	CTCAG	5	three_prime	9	272, 601, 702, 820,
DraII	RGGNCCY	6	five_prime	10	20, 21, 495, 1069,
BbvI	GCAGC	5	five_prime	13	14, 25, 45, 87, 93,
TseI	GCWGC	5	five_prime	13	2, 13, 33, 81, 97, 100,
SduI	GDGCHC	6	three_prime	14	24, 346, 411, 435,
FauI	CCCGC	5	five_prime	15	32, 60, 102, 111, 140,
EcoRII	CCWGG	5	five_prime	16	426, 510, 614, 674,
TauI	GCSGC	5	three_prime	17	
PspXI	VCTCGAGB	8	five_prime	78	

EK-E ADAMTS2 Promotoru Transkripsiyon Faktörü Bağlanma Bölgeleri

Transkripsiyon Faktörleri	Matrix	Bağlanma Pozisyonu	Zincir
Nuclear factor 1	V\$NF1.03	16	-
Pleomorphic adenoma gene	V\$PLAGL1.01	28	-
Huntington's disease gene regulatory region binding proteins	V\$HDBP1_2.01	30	+
Activator-, mediator- and TBP-dependent core promoter element for RNA polymerase II transcription from TATA-less promoters	O\$XCPE1.01	35	-
Chorion-specific transcription factors with a GCM DNA binding domain	V\$GCM1.02	36	+
Pleomorphic adenoma gene	V\$PLAGL1.01	37	+
Nuclear respiratory factor 1	V\$NRF1.01	40	+
Members of ZIC-family, zinc finger protein of the cerebellum	V\$ZIC2.02	46	+
E2F-myc activator/cell cycle regulator	V\$RB_E2F1_DP1.01	50	-
Huntington's disease gene regulatory region binding proteins	V\$HDBP1_2.01	50	+
E2F-myc activator/cell cycle regulator	V\$E2F.02	53	+
Heat shock factors	V\$HSF2.01	53	+
Nuclear receptor subfamily 2 factors	V\$HNF4.02	56	+
Lactotransferrin motif	V\$LACTOFERRIN.01	58	-
MYT1 C2HC zinc finger protein	V\$MYT1L.01	59	+
Human and murine ETS1 factors	V\$SPI1.02	60	-
Myeloid zinc finger 1 factors	V\$MZF1.01	61	-
Heat shock factors	V\$HSF2.01	62	-
Serum response element binding factor	V\$SRF.04	83	-
RP58 (ZFP238) zinc finger protein	V\$RP58.01	84	+
Serum response element binding factor	V\$SRF.04	84	+
Twist subfamily of class B bHLH transcription factors	V\$TWIST.01	85	+
Myoblast determining factors	V\$TCFE2A.02	85	-
Twist subfamily of class B bHLH transcription factors	V\$HEN1.02	94	-
Myoblast determining factors	V\$MYOD.01	94	+
AP4 and related proteins	V\$AP4.01	95	+
Twist subfamily of class B bHLH transcription factors	V\$HEN1.02	95	+
Myoblast determining factors	V\$MYOGENIN.02	95	-
NeuroD, Beta2, HLH domain	V\$ASCL2.01	95	-
C2H2 zinc finger transcription factors 4	V\$ZID.01	97	-
C2H2 zinc finger transcription factors 2	V\$ZF9.01	101	+
Chorion-specific transcription factors with a GCM DNA binding domain	V\$GCM1.02	106	+
AP4 and related proteins	V\$AP4.02	110	-
Twist subfamily of class B bHLH transcription factors	V\$HEN1.02	110	-
Myoblast determining factors	V\$MYF5.01	110	+
NeuroD, Beta2, HLH domain	V\$MASH1.01	110	+
MAF and AP1 related factors	V\$MAFA.01	111	-
AP4 and related proteins	V\$AP4.02	111	+

Twist subfamily of class B bHLH transcription factors	V\$HEN1.02	111	+
Myoblast determining factors	V\$MYOGENIN.02	111	-
NeuroD, Beta2, HLH domain	V\$ASCL2.01	111	-
Olfactory associated zinc finger protein	V\$ROAZ.01	122	+
Olfactory associated zinc finger protein	V\$ROAZ.01	123	-
Neuron-restrictive silencer factor	V\$NRSF.01	125	+
PAX-9 binding sites	V\$PAX9.01	125	+
ZF5 POZ domain zinc finger	V\$ZF5.03	126	-
RNA polymerase II transcription factor II B	O\$BRE.01	128	-
E2F-myc activator/cell cycle regulator	V\$E2F3.01	129	+
E-box binding factors	V\$MYCMAX.03	130	-
Myc associated zinc fingers	V\$MAZ.01	130	+
C2H2 zinc finger transcription factors 2	V\$ZF9.01	131	-
Krüppel like transcription factors	V\$KLF7.02	133	+
GC-Box factors SP1/GC	V\$SP1.03	134	+
C2H2 zinc finger transcription factors 7	V\$ZNF263.01	136	-
C2H2 zinc finger transcription factors 7	V\$ZNF263.01	139	-
EGR/nerve growth factor induced protein C & related factors	V\$EGR1.02	140	+
Myc associated zinc fingers	V\$MAZ.01	141	+
Myc associated zinc fingers	V\$MAZ.01	146	+
ZF5 POZ domain zinc finger	V\$ZF5.03	147	-
RNA polymerase II transcription factor II B	O\$BRE.01	149	-
E2F-myc activator/cell cycle regulator	V\$E2F.03	150	+
C2H2 zinc finger transcription factors 7	V\$ZNF263.01	152	-
CTCF and BORIS gene family, transcriptional regulators with 11 highly conserved zinc finger domains	V\$CTCF.01	153	+
Myc associated zinc fingers	V\$MAZ.01	154	+
EGR/nerve growth factor induced protein C & related factors	V\$EGR1.02	155	+
Krüppel like transcription factors	V\$KLF7.01	157	+
PRDI-BF1 and RIZ homologous (PR) domain proteins (PRDM)	V\$PRDM5.01	158	+
GC-Box factors SP1/GC	V\$SP1.01	158	+
Selenocysteine tRNA activating factor	V\$ZNF76_143.01	158	-
EGR/nerve growth factor induced protein C & related factors	V\$WT1.01	159	+
E2F-myc activator/cell cycle regulator	V\$E2F4.01	160	+
C2H2 zinc finger transcription factors 2	V\$ZF9.01	160	-
Krüppel like transcription factors	V\$KLF7.01	161	+
Pleomorphic adenoma gene	V\$PLAG1.01	161	+
CTCF and BORIS gene family, transcriptional regulators with 11 highly conserved zinc finger domains	V\$CTCF.01	162	+
GC-Box factors SP1/GC	V\$SP1.03	162	+
EGR/nerve growth factor induced protein C & related factors	V\$WT1.01	163	+
Myc associated zinc fingers	V\$MAZR.01	163	+
EGR/nerve growth factor induced protein C & related factors	V\$EGR1.03	165	+
Activator-, mediator- and TBP-dependent core promoter element for RNA polymerase II transcription from TATA-less promoters	O\$XCPE1.01	166	+

C2H2 zinc finger transcription factors 2	V\$ZNF219.01	166	-
Krueppel like transcription factors	V\$KCLKF.01	167	+
C2H2 zinc finger transcription factors 2	V\$ZBP89.01	169	-
ZF5 POZ domain zinc finger	V\$ZF5.01	170	+
Pleomorphic adenoma gene	V\$PLAG1.01	172	+
Myc associated zinc fingers	V\$MAZ.01	176	+
Testis-specific bHLH-Zip transcription factors	V\$SPZ1.01	177	+
Selenocysteine tRNA activating factor	V\$ZNF76_143.01	180	-
E2F-myc activator/cell cycle regulator	V\$E2F1_DP2.01	185	+
Krueppel like transcription factors	V\$KCLKF.01	187	+
Myeloid zinc finger 1 factors	V\$MZF1.01	187	+
GA-boxes	V\$GAGA.01	193	+
GA-boxes	V\$GAGA.01	195	+
GA-boxes	V\$GAGA.01	197	+
GA-boxes	V\$GAGA.01	203	+
GA-boxes	V\$GAGA.01	205	+
GA-boxes	V\$GAGA.01	207	+
GA-boxes	V\$GAGA.01	209	+
EGR/nerve growth factor induced protein C & related factors	V\$EGR1.03	211	+
GA-boxes	V\$GAGA.01	211	+
EGR/nerve growth factor induced protein C & related factors	V\$CKROX.01	213	+
Pleomorphic adenoma gene	V\$PLAG1.01	218	+
Pleomorphic adenoma gene	V\$PLAG1.01	222	+
EGR/nerve growth factor induced protein C & related factors	V\$CKROX.01	224	+
EGR/nerve growth factor induced protein C & related factors	V\$CKROX.01	228	+
C2H2 zinc finger transcription factors 7	V\$ZNF263.01	228	-
Calcium-response elements	V\$CARF.01	232	+
Myc associated zinc fingers	V\$MAZ.01	234	+
Core promoter motif ten elements	O\$DMTE.01	241	+
Pleomorphic adenoma gene	V\$PLAG1.01	241	+
EGR/nerve growth factor induced protein C & related factors	V\$WT1.01	243	+
GA-boxes	V\$GAGA.01	243	+
Myc associated zinc fingers	V\$MAZ.01	243	+
EGR/nerve growth factor induced protein C & related factors	V\$EGR1.03	245	+
GA-boxes	V\$GAGA.01	245	+
Krueppel like transcription factors	V\$KCLKF6.01	245	+
EGR/nerve growth factor induced protein C & related factors	V\$CKROX.01	247	+
GA-boxes	V\$GAGA.01	247	+
Krueppel like transcription factors	V\$KCLKF.01	247	+
C2H2 zinc finger transcription factors 7	V\$ZNF263.01	247	-
GC-Box factors SP1/GC	V\$SP1.01	248	+
EGR/nerve growth factor induced protein C & related factors	V\$EGR1.03	249	+
C2H2 zinc finger transcription factors 2	V\$ZBP89.01	249	-
Pleomorphic adenoma gene	V\$PLAG1.01	250	+
Krueppel like transcription factors	V\$KCLKF7.01	251	+

Pleomorphic adenoma gene	V\$PLAG1.02	252	+
Pur-alpha binds both single-stranded and double-stranded DNA in a sequence-specific manner	V\$PURALPHA.01	252	+
GC-Box factors SP1/GC	V\$SP1.03	252	+
Myc associated zinc fingers	V\$MAZR.01	253	+
Activator-, mediator- and TBP-dependent core promoter element for RNA polymerase II transcription from TATA-less promoters	O\$XCPE1.01	254	+
E2F-myc activator/cell cycle regulator	V\$E2F1_DP2.01	254	+
Myeloid zinc finger 1 factors	V\$MZF1.01	256	+
E2F-myc activator/cell cycle regulator	V\$E2F3.01	263	+
ZF5 POZ domain zinc finger	V\$ZF5.01	265	+
Pleomorphic adenoma gene	V\$PLAGL1.01	270	+
Sterol regulatory element binding proteins	V\$SREBP.01	278	-
Human acute myelogenous leukemia factors	V\$AML1.01	279	+
Homeodomain transcription factors	V\$TLX1.01	279	+
EVI1-myleoid transforming protein	V\$EVI1.07	292	-
PAX-2/5/8 binding sites	V\$PAX5.01	296	+
ZF5 POZ domain zinc finger	V\$ZF5.03	297	-
PAX-9 binding sites	V\$PAX9.01	298	+
RNA polymerase II transcription factor II B	O\$BRE.01	299	-
E2F-myc activator/cell cycle regulator	V\$E2F.03	300	+
Nuclear respiratory factor 1	V\$NRF1.01	301	-
EGR/nerve growth factor induced protein C & related factors	V\$EGR1.02	308	-
EGR/nerve growth factor induced protein C & related factors	V\$EGR1.02	311	-
GC-Box factors SP1/GC	V\$SP1.03	314	-
Human and murine ETS1 factors	V\$GABP.01	321	-
Zinc finger protein ZNF35	V\$ZNF35.01	328	-
E2F-myc activator/cell cycle regulator	V\$E2F.03	330	-
Core promoter motif ten elements	O\$HMTE.01	340	-
Neuron-restrictive silencer factor	V\$NRSE.01	341	-
PAX-9 binding sites	V\$PAX9.01	341	-
Cell cycle regulators: Cell cycle dependent element	V\$CDE.01	345	+
PAX-2/5/8 binding sites	V\$PAX5.01	365	+
GC-Box factors SP1/GC	V\$TIEG.01	374	-
Activator protein 2	V\$AP2.02	379	-
Activator protein 2	V\$TCFAP2A.01	379	+
CTCF and BORIS gene family, transcriptional regulators with 11 highly conserved zinc finger domains	V\$CTCF.01	380	-
CTCF and BORIS gene family, transcriptional regulators with 11 highly conserved zinc finger domains	V\$CTCF.04	380	+
CTCF and BORIS gene family, transcriptional regulators with 11 highly conserved zinc finger domains	V\$CTCF.02	383	+
EGR/nerve growth factor induced protein C & related factors	V\$EGR1.02	383	+
PAX-2/5/8 binding sites	V\$PAX5.01	395	+
Core promoter motif ten elements	O\$HMTE.01	403	+

Neuron-restrictive silencer factor	V\$NRSE.01	405	+
Huntington's disease gene regulatory region binding proteins	V\$HDBP1_2.01	406	-
Huntington's disease gene regulatory region binding proteins	V\$HDBP1_2.01	411	-
CTCF and BORIS gene family, transcriptional regulators with 11 highly conserved zinc finger domains	V\$CTCF.01	412	+
Pleomorphic adenoma gene	V\$PLAGL1.01	414	-
C2H2 zinc finger transcription factors 2	V\$ZNF219.01	416	-
Nuclear factor kappa B/c-rel	V\$NFKAPPAB50.01	418	-
Nuclear factor kappa B/c-rel	V\$NFKAPPAB50.01	419	+
E2F-myc activator/cell cycle regulator	V\$E2F4.01	422	-
Pleomorphic adenoma gene	V\$PLAGL1.01	423	+
GC-Box factors SP1/GC	V\$GC.01	424	-
C2H2 zinc finger transcription factors 2	V\$ZNF300.01	433	+
E-box binding factors	V\$ATF6.01	435	+
Activator protein 2	V\$TCFAP2B.01	439	+
Krueppel like transcription factors	V\$EKLF.01	439	-
Neuron-specific olfactory factor	V\$EBF1.01	439	+
Histone nuclear factor P	V\$MIZF.01	450	-
"Negative" glucocorticoid response elements	V\$IR2_NGRE.01	454	-
"Negative" glucocorticoid response elements	V\$IR2_NGRE.01	455	+
Myc associated zinc fingers	V\$MAZ.01	456	+
E2F-myc activator/cell cycle regulator	V\$E2F3.02	462	-
C2H2 zinc finger transcription factors 2	V\$ZF9.01	462	-
E2F-myc activator/cell cycle regulator	V\$E2F3.02	465	+
Huntington's disease gene regulatory region binding proteins	V\$HDBP1_2.01	465	-
Hypoxia inducible factor, bHLH/PAS protein family	V\$HIF1.01	474	+
Core promoter motif ten elements	O\$DMTE.01	475	+
Myeloid zinc finger 1 factors	V\$MZF1.01	477	-
C2H2 zinc finger transcription factors 2	V\$ZKSCAN3.01	477	+
PAX-1 binding sites	V\$PAX1.01	482	+
Activator protein 2	V\$TCFAP2B.01	495	-
Krueppel like transcription factors	V\$EKLF.01	495	+
Pleomorphic adenoma gene	V\$PLAGL1.02	503	+
Activator-, mediator- and TBP-dependent core promoter element for RNA polymerase II transcription from TATA-less promoters	O\$XCPE1.01	509	-
GC-Box factors SP1/GC	V\$SP2.01	511	-
HOX - PBX complexes	V\$HOX_PBX.01	514	-
CCAAT binding factors	V\$ACAAT.01	515	+
Selenocysteine tRNA activating factor	V\$ZNF76_143.01	519	+
Signal transducer and activator of transcription	V\$STAT3.02	522	-
PAX-4/PAX-6 paired domain binding sites	V\$PAX6.02	525	-
Pleomorphic adenoma gene	V\$PLAG1.02	537	-
Nuclear factor kappa B/c-rel	V\$NFKAPPAB50.01	540	-
PAX-4/PAX-6 paired domain binding sites	V\$PAX6.04	548	+
RXR heterodimer binding sites	V\$VDR_RXR.06	563	+
GC-Box factors SP1/GC	V\$SP2.01	565	+
RXR heterodimer binding sites	V\$VDR_RXR.06	569	+

Glucocorticoid responsive and related elements	V\$ARE.03	573	-
Ccaat/Enhancer Binding Protein	V\$CEBP.02	578	+
Chorion-specific transcription factors with a GCM DNA binding domain	V\$GCM1.01	578	-
TEA/ATTS DNA binding domain factors	V\$TEAD.01	581	-
Core promoter initiator elements	O\$DINR.01	582	-
Pleomorphic adenoma gene	V\$PLAG1.01	585	+
SOX/SRY-sex/testis determinig and related HMG box factors	V\$HBP1.01	585	+
Positive regulatory domain I binding factor	V\$BLIMP1.01	587	+
Barbiturate-inducible element box from pro+eukaryotic genes	V\$BARBIE.01	588	+
Chorion-specific transcription factors with a GCM DNA binding domain	V\$GCM1.03	589	-
Insulinoma associated factors	V\$INSM1.01	589	+
EGR/nerve growth factor induced protein C & related factors	V\$CKROX.01	591	+
Myeloid zinc finger 1 factors	V\$MZF1.02	591	+
C2H2 zinc finger transcription factors 7	V\$ZNF263.01	591	-
GC-Box factors SP1/GC	V\$GC.01	592	+
EGR/nerve growth factor induced protein C & related factors	V\$WT1.01	593	+
Myc associated zinc fingers	V\$MAZ.01	593	+
GLI zinc finger family	V\$GLIS2.01	595	-
Myc associated zinc fingers	V\$MAZR.01	595	+
GC-Box factors SP1/GC	V\$SP2.01	595	+
Krueppel like transcription factors	V\$KKLF.01	596	+
C2H2 zinc finger transcription factors 2	V\$ZNF219.01	596	-
Myeloid zinc finger 1 factors	V\$MZF1.01	598	+
Pleomorphic adenoma gene	V\$PLAG1.02	602	+
Peroxisome proliferator-activated receptor	V\$PPAR_RXR.01	613	+
RXR heterodimer binding sites	V\$RAR_RXR.01	613	+
Nuclear receptor subfamily 2 factors	V\$HNF4.01	615	+
Vertebrate steroidogenic factor	V\$FTF.01	617	+
Estrogen response elements	V\$ESRRA.01	622	+
Zfx and Zfy - transcription factors implicated in mammalian sex determination	V\$ZFX.01	628	-
v-ERB and RAR-related orphan receptor alpha	V\$REV-ERBA.03	637	-
Krueppel-like C2H2 zinc finger factors hypermethylated in cancer	V\$HIC1.02	638	+
Serum response element binding factor	V\$SRF.03	642	-
Serum response element binding factor	V\$SRF.01	643	+
Calcium-response elements	V\$CARF.01	645	+
E2F-myc activator/cell cycle regulator	V\$E2F1_DP1.01	651	+
Peroxisome proliferator-activated receptor	V\$PPARG.03	652	+
Nuclear receptor subfamily 2 factors	V\$HNF4A.01	654	+
NGFI-B response elements, nur subfamily of nuclear receptors	V\$NBRE.01	657	+
Heat shock factors	V\$HSF1.03	660	+
EV11-myleoid transforming protein	V\$MEL1.03	665	+
Pleomorphic adenoma gene	V\$PLAGL1.02	678	-
Testis-specific bHLH-Zip transcription factors	V\$SPZ1.01	678	+

Pleomorphic adenoma gene	V\$PLAG1.01	684	+
PAX-2/5/8 binding sites	V\$PAX5.02	689	+
E2F-myc activator/cell cycle regulator	V\$E2F3.01	693	+
Peroxisome proliferator-activated receptor	V\$PPARG.03	699	+
Nuclear receptor subfamily 2 factors	V\$HPF1.01	701	+
MYT1 C2HC zinc finger protein	V\$MYT1.02	708	-
Nuclear receptor subfamily 2 factors	V\$HNF4.02	711	-
Peroxisome proliferator-activated receptor	V\$PPARG.02	713	-
THAP domain containing protein	V\$THAP1.01	717	-
Calcium-response elements	V\$CARF.01	727	+
Mouse Krueppel like factor	V\$MOK2.02	738	-
Human and murine ETS1 factors	V\$SPI1.02	753	-
Interferon regulatory factors	V\$ISRE.01	755	-
Human and murine ETS1 factors	V\$ETV1.02	759	-
Signal transducer and activator of transcription	V\$STAT6.01	762	-
Signal transducer and activator of transcription	V\$STAT6.01	763	+