

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



***TNF-ALFA* ARACILI
ADAMTS-2 VE *ADAMTS-3* GENLERİNİN REGÜLASYONU**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

EHED MUHAMMED AYMAZ

BALIKESİR, HAZİRAN - 2019

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



***TNF-ALFA* ARACILI**
***ADAMTS-2* VE *ADAMTS-3* GENLERİNİN REGÜLASYONU**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

EHED MUHAMMED AYMAZ

Jüri Üyeleri : Prof. Dr. Feray KÖÇKAR (Tez Danışmanı)

Prof. Dr. Sezai TÜRKEL

Doç. Dr. Hatice YILDIRIM

BALIKESİR, HAZİRAN - 2019

KABUL VE ONAY SAYFASI

Ehed Muhammed AYMAZ tarafından hazırlanan “*TNF-ALFA* ARACILI *ADAMTS-2* VE *ADAMTS-3* GENLERİNİN REGÜLASYONU” adlı tez çalışmasının savunma sınavı 10.06.2019 tarihinde yapılmış olup aşağıda verilen jüri tarafından oy birliği ile Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

İmza

Danışman
Prof. Dr. Feray KÖÇKAR

Üye
Prof. Dr. Sezai TÜRKEL

Üye
Doç. Dr. Hatice YILDIRIM


.....

.....

.....

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

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Prof. Dr. Necati ÖZDEMİR

.....

ÖZET

***TNF-ALFA* ARACILI
ADAMTS-2 VE ADAMTS-3 GENLERİNİN REGÜLASYONU
YÜKSEK LİSANS TEZİ
EHED MUHAMMED AYMAZ
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI
(TEZ DANIŞMANI: PROF. DR. FERAY KÖÇKAR)
(EŞ DANIŞMAN: DR. ÖĞR. ÜY. MELTEM ALPER)
BALIKESİR, HAZİRAN - 2019**

Proinflatuar bir sitokin olan *TNF- α* , artritte kıkırdak yıkımında kritik bir role sahiptir. *TNF- α* , *MMP*'lerin ve *ADAMTS*'lerin kıkırdak spesifik ekspresyonunu indükler. Bu metalloproteinazların aşırı ekspresyonu, osteoartritin ilerlemesini destekleyen, kıkırdak matrisinin degradasyonuna neden olur. *ADAMTS* ailesi üyeleri arasında prokollajen N proteinazlar kıkırdak yeniden modellenmesine katılırlar. Bazı *ADAMTS* ailesi üyelerinin proinflatuar sitokin uyarımı altında ekspresyon seviyeleri, bazı kondrosit dokularında veya hücre hatlarında araştırılmıştır, ancak fibriller prokollajenlerin ve ekstraselüler matriksin biyosentetik prosesindeki önemine rağmen, *ADAMTS-2* ve *ADAMTS-3* gen ekspresyonunun *TNF- α* stimülasyonu altında nasıl değiştiği hala osteosarkom hücrelerinde açıklığa kavuşturulmuş değildir.

Bu tez çalışmasında *TNF- α* 'nın İnsan *ADAMTS-2* ve *ADAMTS-3* gen promotorunun Saos-2 hücrelerindeki transkripsiyonel aktivitesine olan etkileri araştırıldı. Elde edilen veriler doğrultusunda *TNF- α* 'nın *ADAMTS-2* ve *ADAMTS-3*'ün transkripsiyonel aktivitesini indüklediği ve bu indüklemeyi *ADAMTS-2* için PI3K ve NF κ B yollarını kullanarak, *ADAMTS-3* içinse MEK, PI3K, JNK ve NF κ B yollarını kullanarak yaptığı belirlendi. *TNF- α* 'nın *ADAMTS-2* ve *ADAMTS-3* mRNA ve proteininin ekspresyon seviyelerini, farklı zaman aralıkları için indüklediği qRT-PCR ve western blotlama ile belirlendi. Bu bu indüklemeyi *ADAMTS-2* ve *ADAMTS-3* için MEK, PI3K, JNK ve NF κ B yollarını kullanarak yaptığı tespit edildi. EMSA deneyleri kullanılarak *ADAMTS-2* ve *ADAMTS-3* promotorlarına STAT3 ve NF κ B transkripsiyon faktörlerinin işlevsel olarak bağlanma analizi ilk kez bu çalışmayla gerçekleştirilerek ortaya konmuştur.

ANAHTAR KELİMELELER: *TNF- α* , *ADAMTS-2*, *ADAMTS-3*, osteosarkoma, EMSA

ABSTRACT

***TNF-ALPHA* MEDIATED *ADAMTS-2* AND *ADAMTS-3* GENES REGULATIONS**

MSC THESIS

EHED MUHAMMED AYMAZ

BALIKESIR UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE

MOLECULAR BIOLOGY AND GENETICS

(SUPERVISOR: PROF. DR. FERAY KÖÇKAR)

(CO-SUPERVISOR: ASSIST. PROF. DR. MELTEM ALPER)

BALIKESİR, JUNE 2019

TNF- α , a proinflammatory cytokine, has a critical role in cartilage destruction in arthritis. TNF- α induces cartilage-specific expression of MMPs and ADAMTS. Overexpression of these metalloproteinases causes degradation of the cartilage matrix, which promotes the progression of osteoarthritis. Among the ADAMTS family members, procollagen N proteinases participate in cartilage remodeling. The expression levels of some ADAMTS family members under proinflammatory cytokine stimulation have been investigated in some chondrocyte tissues or cell lines, but despite the importance of the fibrils procollagen and the extracellular matrix in the biosynthetic process, how ADAMTS-2 and ADAMTS-3 gene expression changes under TNF- α stimulation is still evident in osteosarcoma cells is not crossed.

In this study, we investigated the effects of TNF- α on transcriptional activity of human ADAMTS2 and ADAMTS3 gene promoter in Saos-2 cells. Based on the data obtained, it was determined that TNF- α induced the transcriptional activity of ADAMTS-2 and ADAMTS-3 using PI3K and NF κ B pathways for ADAMTS-2 and MEK, PI3K, JNK and NF κ B pathways for ADAMTS-3. Expression levels of ADAMTS-2 and ADAMTS-3 mRNA and protein of TNF- α were determined by qRT-PCR and western blotting induced for different time intervals. It was determined that this induction was performed using the MEK, PI3K, JNK and NF κ B pathways for ADAMTS-2 and ADAMTS-3. The functional binding analysis of STAT3 and NF κ B transcription factors for ADAMTS-2 and ADAMTS-3 promoters using EMSA assays was first demonstrated by this study.

KEYWORDS: TNF-alpha, ADAMTS-2, ADAMTS-3, osteosarcoma, EMSA

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
ŞEKİL LİSTESİ	v
TABLO LİSTESİ	vii
SEMBOL LİSTESİ	viii
ÖNSÖZ	ix
1. GİRİŞ	1
1.1 Ekstraselüler Matriks	1
1.1.1 Elastinler	2
1.1.2 Fibronektinler.....	2
1.1.3 Lamininler.....	3
1.1.4 Kollajenler	3
1.1.4.1 Fibriller Kollajenler.....	6
1.2 Metalloproteinazlar	8
1.2.1 ADAMTS Gen Ailesi	9
1.2.1.1 ADAMTS Protein yapısı	9
1.2.1.2 ADAMTS Ailesi Üyeleri.....	11
1.2.1.3 ADAMTS ve Kanser İlişkisi	18
1.3 Sitokinler	22
1.3.1 İnflamatuar Sitokinler	23
1.3.1.1 Tümör Nekroz Faktörü-Alpha (<i>TNF-α</i>).....	23
1.3.2 ADAMTS ve Sitokinler.....	24
1.4 Transkripsiyonel Regülasyon	27
1.4.1 Ökaryotik Transkripsiyonel Regülasyon	28
1.4.1.1 Transkripsiyon Faktörleri.....	29
2. TEZİN AMACI	33
3. MATERYAL VE METOT	35
3.1 Materyal.....	35
3.1.1 Çalışmalarda Kullanılmış Olan Kimyasal Maddeler	35
3.1.2 Çalışmalarda Kullanılmış Olan Araç-Gereçler.....	38
3.2 Yöntem	39
3.2.1 Deney yapılan ortamın ve deneylerde kullanılmış olan maddelerin steril hale getirilmesi.....	39
3.2.2 Hücre Kültürü Esaslı Çalışmalarda Kullanılan Metotlar	40
3.2.2.1 Hücre Kültürü Çalışmalarında Kullanılmış Olan Malzemeler	40
3.2.2.2 Hücre Hattının Başlatılması	41
3.2.2.3 Hücre Hattının Pasajlanması	42
3.2.2.4 Canlı Hücrelerin Tespit Edilmesi.....	42
3.2.2.5 Hücrelerin Dondurulması.....	43
3.2.3 RNA Esaslı Çalışmalarda Kullanılan Metotlar.....	43
3.2.3.1 Sitokin Deneylerinin Kurulması	43
3.2.3.2 Yolak İnhibisyon Deneylerinin Kurulması	44
3.2.3.3 RNA İzolasyonunun gerçekleştirilmesi	44

3.2.3.4 RNA Miktarının belirlenmesi	45
3.2.3.5 RNA Jel Elektroforezi.....	45
3.2.3.6 cDNA Sentezi ve RT-PCR.....	46
3.2.3.7 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction)..	47
3.2.3.8 Agaroz Jel Elektroforezi	48
3.2.3.9 Gerçek zamanlı PZR	49
3.2.3.10 Gerçek zamanlı PZR Sonuçlarının Değerlendirilmesi	50
3.2.4 Transkripsiyonel Aktivite Belirleme Esaslı Çalışmalarda Kullanılan Metotlar	50
3.2.4.1 Transient Transfeksiyon.....	50
3.2.4.2 Sekrete Edilen Lusiferaz Etkinliğinin Belirlenmesi.....	51
3.2.4.3 SEAP (Sekrete Edilen Alkalın Fosfataz) Etkinliğinin Belirlenmesi	52
3.2.5 Protein Esaslı Çalışmalarda Kullanılan Metotlar.....	53
3.2.5.1 Western Blot Tekniği	53
3.2.6 DNA-Protein Etkileşimi Esaslı Deneylerde Kullanılan Metotlar	57
3.2.6.1 EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay) Yöntemi.....	57
4. BULGULAR	62
4.1 <i>TNF-α</i> 'nın İnsan <i>ADAMTS-2</i> ve <i>ADAMTS-3</i> Genlerinin mRNA Seviyesindeki Ekspresyonlarını Belirleme Çalışmaları	62
4.2 <i>TNF-α</i> 'nın <i>ADAMTS-2</i> ve <i>ADAMTS-3</i> Genlerinin mRNA Düzeyine Olan Etkisinin Yolak İnhibitörleri Varlığında Belirlenmesi	66
4.3 İnsan <i>ADAMTS-2</i> ve <i>ADAMTS-3</i> Promotorlarının İşlevsel Analizi... 69	
4.3.1 İnsan <i>ADAMTS-2</i> ve <i>ADAMTS-3</i> Promotorlarının Restriksiyon Endonükleaz Kontrol Kesimi.....	69
4.3.2 Kalsiyum-Fosfat Presipitasyon Metoduyla Geçici Transfeksiyonun Sekrete Edilen Lusiferaz Sisteminde Optimizasyonu	71
4.3.3 İnsan <i>ADAMTS-2</i> ve <i>ADAMTS-3</i> Genlerinin Bazal Promotor Aktivitesinin Tespit Edilmesi	73
4.3.4 <i>TNF-α</i> sitokininin İnsan <i>ADAMTS-2</i> ve <i>ADAMTS-3</i> promotoruna etkisinin belirlenmesi	74
4.3.5 <i>TNF-α</i> yolak inhibitörlerinin İnsan <i>ADAMTS-2</i> ve <i>ADAMTS-3</i> promotorlarına etkisinin belirlenmesi	76
4.4 <i>TNF-α</i> 'nın İnsan <i>ADAMTS-2</i> ve <i>ADAMTS-3</i> Genlerinin Protein Seviyesindeki Ekspresyonlarını Belirleme Çalışmaları	78
4.4.1 <i>TNF-α</i> 'nın İnsan <i>ADAMTS-2</i> ve <i>ADAMTS-3</i> Genlerinin Protein Seviyesindeki Ekspresyonlarının Western Blot ile Tespit Edilmesi	78
4.4.2 <i>TNF-α</i> 'nın <i>ADAMTS-2</i> ve <i>ADAMTS-3</i> Genlerinin Protein Düzeyine Olan Etkisinin Yolak İnhibitörleri Varlığında Western Blot Belirlenmesi.....	80
4.5 İnsan <i>ADAMTS-2</i> ve <i>ADAMTS-3</i> promotorlarının EMSA deneyleri kullanılarak STAT-3 ve NF κ B transkripsiyon faktörlerinin işlevsel bağlanma analizlerinin tespit edilmesi	82
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	97
6. KAYNAKLAR.....	102
7. EKLER	120

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1.1:	Prokollajen aminopeptidaz kesim bölgeleri	8
Şekil 2.1:	Tez basamaklarını gösteren şema.....	34
Şekil 3.1:	Hemositometre	43
Şekil 4.1:	Saos-2 hücre hattında kontrol ve <i>TNF-α</i> uygulanmış örneklerin RNA jel elektroforezi görüntüsü.....	63
Şekil 4.2:	cDNA Kontrolü İçin Agaroz Jel Elektroforezi Görüntüsü.....	63
Şekil 4.3:	<i>TNF-α</i> 'nın <i>ADAMTS-2</i> genine mRNA düzeyindeki etkisi.....	64
Şekil 4.4:	<i>TNF-α</i> 'nın <i>ADAMTS-3</i> genine mRNA düzeyindeki etkisi.....	65
Şekil 4.5:	<i>TNF-α</i> 'nın <i>ADAMTS-2</i> ve <i>ADAMTS-3</i> genlerine mRNA düzeyindeki etkisinin karşılaştırmalı gösterimi.....	65
Şekil 4.6:	Saos-2 hücre hattında <i>TNF-α</i> ve yolak inhibitörleri uygulanmış örneklerin RNA jel elektroforezi görüntüsü.....	67
Şekil 4.7:	cDNA Kontrolü İçin Agaroz Jel Elektroforezi Görüntüsü.....	67
Şekil 4.8:	<i>TNF-α</i> 'nın yolak inhibitörlerinin <i>ADAMTS-2</i> genine mRNA düzeyindeki etkisinin gösterimi.	68
Şekil 4.9:	<i>TNF-α</i> 'nın yolak inhibitörlerinin <i>ADAMTS-3</i> genine mRNA düzeyindeki etkisinin gösterimi.	69
Şekil 4.10:	<i>ADAMTS-2</i> promotor konstraktları.	70
Şekil 4.11:	<i>ADAMTS-3</i> promotor konstraktları.	71
Şekil 4.12:	<i>ADAMTS-2</i> ve <i>ADAMTS-3</i> promotorlarının restriksiyon endonükleaz kontrol kesimi görüntüsü	71
Şekil 4.13:	Transfeksiyon etkinliği.....	72
Şekil 4.14:	İnsan <i>ADAMTS-2</i> Promotorunun Bazal Aktivitesi.....	73
Şekil 4.15:	İnsan <i>ADAMTS-3</i> promotorunun bazal aktivitesi.....	74
Şekil 4.16:	<i>TNF-α</i> sitokininin <i>ADAMTS-2</i> promotor aktivitesine etkisi.	75
Şekil 4.17:	<i>TNF-α</i> sitokininin <i>ADAMTS-3</i> promotor aktivitesine etkisi.	75
Şekil 4.18:	<i>TNF-α</i> yolak inhibitörlerinin <i>ADAMTS-2</i> promotor aktivitesine etkisi.	77
Şekil 4.19:	<i>TNF-α</i> yolak inhibitörlerinin <i>ADAMTS-2</i> promotor aktivitesine etkisi.	77
Şekil 4.20:	<i>TNF-α</i> 'nın <i>ADAMTS-2</i> genine protein düzeyindeki etkisi.....	79
Şekil 4.21:	<i>TNF-α</i> 'nın <i>ADAMTS-3</i> genine protein düzeyindeki etkisi.....	80
Şekil 4.22:	<i>TNF-α</i> 'nın yolak inhibitörlerinin <i>ADAMTS-2</i> genine protein düzeyindeki etkisinin gösterimi.	81
Şekil 4.23:	<i>TNF-α</i> 'nın yolak inhibitörlerinin <i>ADAMTS-3</i> genine protein düzeyindeki etkisinin gösterimi.	82
Şekil 4.24:	<i>ADAMTS-2</i> promotoruna ait problemlerin lokalizasyonu.....	85
Şekil 4.25:	<i>ADAMTS-3</i> promotoruna ait problemlerin lokalizasyonu.....	85
Şekil 4.26:	<i>ADAMTS-2</i> [-143/-111] probunun EMSA görüntüsü.	86
Şekil 4.27:	<i>ADAMTS-2</i> [-175/-143] probunun EMSA görüntüsü.	87
Şekil 4.28:	<i>ADAMTS-2</i> [-190/-184] probunun EMSA görüntüsü.	88
Şekil 4.29:	<i>ADAMTS-2</i> [-436/-400] probunun EMSA görüntüsü.	89
Şekil 4.30:	<i>ADAMTS-3</i> [-131/-103] probunun EMSA görüntüsü.	90
Şekil 4.31:	<i>ADAMTS-3</i> [-324/-295] probunun EMSA görüntüsü.	91
Şekil 4.32:	<i>ADAMTS-3</i> [-838/-812] probunun EMSA görüntüsü.	92

Şekil 4.33: <i>ADAMTS-3</i> [-973/-937] probunun EMSA görüntüsü.	93
Şekil 4.34: <i>ADAMTS-3</i> [-1084/-1040] probunun EMSA görüntüsü.	94
Şekil 4.35: <i>ADAMTS-3</i> [-1225/-1205] probunun EMSA görüntüsü.	95
Şekil 4.36: <i>ADAMTS-3</i> [-1278/-1259] probunun EMSA görüntüsü.	96

TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 1.1: Kollajen tipleri ve dağılım gösterdiği dokular	5
Tablo 1.2: <i>ADAMTS</i> Gen Ailesi üyeleri hakkında bilgiler	17
Tablo 3.1: Çalışmalarda kullanılmış olan kimyasal maddeler.....	35
Tablo 3.2: Çalışmada kullanılmış olan araç ve gereçlerin listesi.	38
Tablo 3.3: Yolak inhibisyon çalışmalarında kullanılan inhibitörler ve konsantrasyonları.	44
Tablo 3.4: 10X FA jel tamponu bileşenleri.	46
Tablo 3.5: 1X FA jel tamponu bileşenleri.	46
Tablo 3.6: RT-PCR koşulları.	47
Tablo 3.7: Polimeraz Zincir Reaksiyonu Koşulları.	48
Tablo 3.8: Gerçek Zamanlı PZR Bileşenleri.	49
Tablo 3.9: Çalışmada Kullanılan Ekspresyon Primerleri	49
Tablo 3.10: Gerçek Zamanlı PZR Döngü Şartları.....	50
Tablo 3.11: Transient transfeksiyon deneylerinde kullanılmış olan çözeltiler	51
Tablo 3.12: SEAP ve Lusiferaz etkinliğinin belirlenmesinde kullanılmış olan çözeltiler.	52
Tablo 3.13: Western Blot Tekniğinde Kullanılmış Olan Solüsyonlar.	54
Tablo 3.14: SDS-PAGE yığma ve ayırma jeli bileşenleri.....	55
Tablo 3.15: İşaretleme reaksiyonu içeriği.	58
Tablo 3.16: %6'lık Jel İçeriği.....	59
Tablo 3.17: Bağlanma Reaksiyonu İçeriği.....	60
Tablo 4.1: Gen ifadesi belirleme deneylerinde kullanılmış olan primerler.	62
Tablo 4.2: <i>ADAMTS-3</i> ve <i>ADAMTS-2</i> Promotor Konstraktların kontrol kesiminde kullanılan enzim listesi.	70
Tablo 4.3: EMSA çalışmalarında kullanılmış olan <i>ADAMTS-2</i> promotor parçaları ve konsensus problemler ve sahip oldukları bağlanma motifleri.....	84
Tablo 4.4: EMSA çalışmalarında kullanılmış olan <i>ADAMTS-3</i> promotor parçaları ve konsensus problemler ve sahip oldukları bağlanma motifleri.....	84

SEMBOL LİSTESİ

TNF-α	: Tumor Nekroz Faktörü- α
ADAMTS	: A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs
ADAMTS-2	: A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs-2
ADAMTS-3	: A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs-3
NFκB	: Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
STAT3	: Signal transducer and activator of transcription 3
DNA	: Deoksi ribonükleik asit
SEAP	: Secreted embryonic alkaline phosphatase
FCS	: Fetal calf serum
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle's Medium
RPM	: Rotation per minute
EMSA	: Electrophoretic mobility shift assay
mRNA	: Mesajcı ribonükleik asit

ÖNSÖZ

Hem lisans hem de yüksek lisans hayatım boyunca bilgisi, akademik duruşu ve mütevazı kişiliğiyle her zaman örnek aldığım; bırakmayı, pes etmeyi ve vazgeçmeyi düşündüğüm her zaman diliminde beni yüreklendirerek cesaret veren ve hayallerimin peşinde koşmak hususunda daima yanımda olan bunun yanı sıra sadece bilim hayatımda değil şiir hayatımda da desteğini göstermekten imtina etmeyen saygıdeğer danışman hocam Prof. Dr. Sayın Feray KÖÇKAR'a,

Uzarlarda olsa da yüreği hep benimle olan ne zaman başım sıkışsa yardımını ve desteğini benden esirgemeyen değerli eş danışman hocam Dr. Öğr. Üy. Sayın Meltem ALPER'e,

Bilgi ve tecrübelerinin yanı sıra sevgilerini de benimle paylaşan kıymetli hocalarım Doç. Dr. Sayın Hatice Yıldırım ve Dr. Öğr. Üy. Sayın Sümeyye AYDOĞAN TÜRKÖĞLU'na,

Varlıklarıyla hem bilim hem de sosyal hayatıma bir hocadan ziyade bir abla gibi hem keyif hem de anlam katan değerli hocalarım Dr. Ayşe Tuğşen AYDEMİR'e, Öğr. Gör. Dr. Esra TOKAY'a, Öğr. Gör. Dr. Derya OKUYAN'a ve Arş. Gör. Dr. Nelin HACIOĞLU'na

Dostum Niyazi CÖMERT'e

Ev arkadaşlarım, kardeşlerim Mevlüt KOÇAK ve Kamil TOK'a,

Yalnız laboratuvarında değil laboratuvar dışında da birlikte gülmekten, eğlenmekten keyif aldığım canlarım Mesut ACAR, Serhad ONAT, Kübra PASPAL Candan AKDIR ve Saliha Derya KESKİN'e

Her anımı keyifli ve değerli kılan canım kardeşlerim Pakize ÖZKAYA, İrem AKINCI, Nil OCAK, Ulaş KUMRAL, Emre YANIK ve Tuğçe BEYÇİÇ'e

Kısa sürede çok şey paylaştığım ve eleştirel yanlarıyla hep daha iyi olmam için beni yönlendirerek hayatım renk katan kardeşlerim Büşra BAŞ ve Sümeyye ALTUNOK'a,

Ve hayatımdaki en büyük şansım olan, yüreklerini ve dualarını hep yanımda hissettiğim canım annem Rukiye AYMAZ, canım babam Fahrettin AYMAZ, biricik kardeşlerim Zehra SUSAN, Rabia AYMAZ ve Ademcan AYMAZ'a

Ve bize bilim yapılacak güzellikte bir vatan bırakan Ulu Önder Gazi Mustafa Kemal ATATÜRK'e sonsuz teşekkür ederim.

Balıkesir, 2019

Ehed Muhammed AYMAZ

1. GİRİŞ

1.1 Ekstraselüler Matris

Hücre dışı matris (HDM; Extra Cellular Matrix; ECM), doku bütünlüğünü, hücre-hücre bağlantılarını, etkileşimlerini ve iletişimini düzenleyen dinamik ve çok yönlü bir biyomateryaldir [1]. ECM sadece dokuya yapısal destek sağlamakla kalmaz, aynı zamanda sertlik, organizasyon ve moleküler bileşimin derecesini değiştirerek hücre kaderini de etkileyebilir [2-4]. Bu nedenle, ECM homeostasisi hücre fonksiyon, sinyalizasyon ve gelişim için kritiktir ve düzensiz ECM yeniden modellenmesi, çeşitli patolojik durumlar için bir hareket ettirici faktördür [1, 5, 6].

ECM iki ana sınıf makromolekülden oluşur: Proteoglikanlar (PG'ler) ve Lifli proteinler [7, 8]. Proteoglikanlar, glikozaminoglikan (GAG) zincirlerinin spesifik bir protein çekirdeğine kovalent olarak bağlanmasıyla oluşur [9]. PG'ler, GAG kompozisyonlarına, lokalizasyonlarına ve çekirdek proteinlerine göre sınıflandırılmıştır. Proteoglikanlar; Küçük Lösin Bakımından Zengin Proteoglikanlar (SLRP'ler), Modüler Proteoglikanlar ve Hücre Yüzeyi Proteoglikanları olmak üzere 3 ana aileye ayrılırlar [8]. PG'ler doku içindeki hücre dışı interstisyel boşluğun çoğunluğunu hidratlı jel formunda doldururlar. PG'ler, benzersiz tamponlama, hidrasyon, bağlama ve kuvvete dayanıklılık özelliklerini yansıtan çok çeşitli işlevlere sahiptir. Sahip olduğu bu özelliğinden dolayı da birçok genetik hastalık, PG genlerindeki mutasyonlarla ilişkilendirilmiştir [7]. Başlıca lifli ECM proteinleri ise kollajenler, elastinler, fibronektinler ve lamininlerdir [1].

1.1.1 Elastinler

Elastik lifler, büyük elastik kan damarları, akciğerler, kalp, elastik bağlar, cilt, mesane ve elastik kıkırdak gibi tekrarlayan germe kuvvetlerine maruz kalan dokulara gerilme kuvveti sağlayan büyük ECM yapılarıdır.

Dokularda büyük ağı yapıda bulunan elastik lifler, ana bileşen ve mikrofibriller olmak üzere iki ayrı elastin bileşeninden oluşur [10]. Elastin, bunlara bağlı salgılanan prekürsör tropoelastinin çapraz bağlı bir polimeridir. Elastinin hidrofobik domainleri ağı elastiki özelliklerinden sorumludur. Elastin fibrilleri, elastin fibrilinin bütünlüğü için de gerekli olan glikoprotein mikrofibrilleri ile kaplıdır. Mikrofibrillerin, elastin moleküllerinin hizalanmasına ve çapraz bağlanmasına yardımcı olan bir iskele sağladığı düşünülmektedir [11]. Elastik lifler, aspartik proteazlar, sistein proteazlar, serin proteazlar ve MMP'ler dâhil olmak üzere çeşitli elastolitik enzimler tarafından, doku/organ yetmezliğiyle sonuçlanacak patolojik işlemlerde degrade edilirler. Elastin degradasyonu, önemli biyolojik aktiviteye sahip elastin peptid fragmentlerini serbest bırakır. Elastin fragmentlerinin patobiyolojisi, bol miktarda elastin bulunan organ sistemlerinde özel bir öneme sahiptir. Örneğin, vasküler duvarlarda elastinin aşırı üretilmesi, ateroskleroz hastalığının gelişimine katkıda bulunur [12].

1.1.2 Fibronektinler

Fibronektinler (FN), omurgalıların gelişiminde kritik fonksiyonlara sahip çeşitli hücre tiplerinin ECM'lerinde yaygın bir şekilde ifade edilirler. FN, interstisyel ECM'nin organizasyonunu yönlendirmede yakından rol oynar ve ayrıca hücre bağlanmasına ve fonksiyonuna aracılık etmede de önemli bir role sahiptir. FN, her biri C-terminallerinde disülfid bağlarıyla kovalent olarak bağlanmış yaklaşık 250 kDa büyüklüğünde iki alt üniteden oluşur. Bu alt birimler üç farklı modül tipinden oluşur: tip I, II ve III tekrarları. Her ne kadar FN, tek bir gen tarafından kodlanmış olsa da alternatif splayın bir sonucu olarak çoklu varyantlar halinde bulunurlar. FN gelişme sırasında hücre göçü için de önemlidir ve kardiyovasküler hastalıklarla ve tümör metastazı ile ilişkilendirilmiştir [1, 11, 13, 14].

1.1.3 Lamininler

Lamininler, bazal membranlarda kollajen tip IV, nidojenler, agrin ve perlekan ile birleştirilen büyük heterotrimerik çapraz şekilli glikoproteinlerdir. Her laminin heterotrimeri, her biri ayrı ayrı genler tarafından kodlanan bir α , bir β ve bir γ zincirden oluşur. Laminin molekülleri, ECM'lerin organizasyonuna ve hücre adezyonuna katılan diğer ECM bileşenleri ve yerleşik hücreler ile birlikte etkileşime girer. Örneğin, lamininler, laminin moleküllerinin kendi kendine birleştirilmesini promote eden LN domainleri aracılığıyla, bazal membranlarda bulunan yüksek derecede düzene sahip ağlara veya polimerlere bağlanırlar. Lamininler ayrıca erken embriyonik gelişim ve organogenezde kritik rol oynarlar. İnsanlardaki birçok konjenital hastalığa, laminin zincirlerindeki mutasyonlar neden olur. Lamininler ayrıca tümör oluşumunda da rol oynarlar [15-17].

1.1.4 Kollajenler

Kollajenler, ECM'de %30'luk bulunma oranıyla en bol bulunan lifli proteinler olup ağırlıklı olarak fibroblastlar tarafından sekrete edilirler [18]. Fibroblastlar, matriks üzerine gerginlik uygulayarak kollajen fibrillerinin düzenlenmesini kontrol ederler [1, 19]. Kollajen süper ailesi, omurgalılarda en az 46 ayrı polipeptit zincirinin oluşturduğu 28 farklı kollajen türünden oluşur. Kollajenler; gerilme kuvveti sağlar, hücre yapışmasını düzenler, kemotaksiyi ve göçü desteklemekle birlikte doğrudan doku gelişimini de sağlar [20]. Örneğin, Kollajen tip I, dokular arasında yaygın ve bol ekspresyon gösteren arketip kollajendir. Fibrillere kendiliğinden monte edilmiş mükemmel heterotrimerik üçlü sarmalları oluşturur. Kollajen tip I, dermis, kemik ve tendon gibi dokularda büyük ölçüde öneme sahip yapısal bir elementtir [11]. Tüm kollajenler, üç polipeptit zincirinin birleşmesiyle oluşturulan trimerik proteinlerdir. Bunlar aynı (homotrimerik kollajenler) veya farklı olabilir (heterotrimerik kollajenler). Farklı genler, farklı kollajen zincirlerini kodlar ve sadece aynı kollajen tipindeki zincirleri birbirleriyle ilişkilendirirler [21, 22]. Kollajen üçlü sarmalları, glisinin varlığı, yüksek prolin ve hidroksprolin içeriği, zincirler arası hidrojen bağları ve lizin ve aspartat içeren elektrostatik etkileşimler ile stabilize edilirler.

Üçlü sarmal diziler, Gly-X-Y tekrarlarından oluşur; X ve Y, sırasıyla prolin ve 4-hidroksiprolindir. Üçlü sarmal, çubuk şeklindedir, ancak Gly-X-Y kusurları ve kesinti mevcudiyeti nedeniyle esnek olabilir. Bu kesintiler moleküler seviyede, önemli ölçüde plastisite, esneklik ve moleküler tanımayı sağlayan lokalizasyonlarla ilişkilidir [22-24]. Kollajenlerde trimerizasyonu, kollajen ağlarının oluşumunu ve propeptitlerin bölünmesini etkileyebilecek çeşitli mutasyonlar tanımlanmıştır. Kollajenlerdeki mutasyonlar, Ehlers–Danlos sendromu (kollajen tip I, III, V), osteogenez imperfekta ve osteoporoz (kollajen tip I), osteoarroz (kollajen tip II, IX, XI) gibi çeşitli klinik patolojiler ile ilişkilendirilmiştir [18, 20].

Kollajenler yapı ve özelliklerine göre birbirlerinden farklılık gösterir. Örneğin, bazı kollajen tipleri üçlü sarmalda kesintilere sahiptir ve kendiliğinden birleşmezler, oysa transmembran kollajenler gibi diğer kollajen tipleri daha uzun kesintilere sahiptirler ve hücre sinyalizasyon ve adezyonunda önemli bir rol oynarlar [18]. Kollajen biyosentezi ve yapısı, tümörjenez de dâhil olmak üzere çeşitli patolojilerde ECM'nin yeniden yapılanması sırasında belirgin bir şekilde değiştirilir [25, 26]. Artan kollajen birikimi ve çapraz bağlanma ile indüklenen ECM sertleşmesi doku morfogenezini bozar ve malign progresyona katkıda bulunur. Artan kollajen çapraz bağlanmasına LOX (Lysyl oksidase) ve LOX benzeri (Lysyl oksidase like) enzimler aracılık eder ve integrinler ve DDR'ler gibi kollajen bağlayıcı hücre yüzeyi reseptörleri yoluyla sinyal oluşumunu teşvik eder ve tümör progresyonunu artırır [25].

Kollajenler ortak domain homologileri ve işlevlerine göre yedi kategoride sınıflandırılabilir. Bunlar arasında fibriller ve ağ oluşturan kollajenler, FACIT'ler (kesilmiş üçlü sarmallara sahip fibrille ilişkili kollajenler), MACIT'ler (kesilmiş üçlü sarmallara sahip zarla ilişkili kollajenler), sabitleyici fibriller, boncuklu filament oluşturuvcu kollajenler ve MULTIPLEXIN/ Endostatin üreten kollajenler bulunur [27].

Tablo 1.1: Kollajen tipleri ve dağılım gösterdiği dokular [18].

Kollajen	Sınıflandırması	Dağılımı
I	Fibriller Kollajen	Tendon, ligament, kornea, kemik, anulus fibrozisi ve ciltte bulunur.
II	Fibriller Kollajen	Kıkırdakta, Gözdeki Camsı Cisimde ve Nukleus Pulposusta bulunur.
III	Fibriller Kollajen	Özellikle embriyonik deri ve içi boş organlarda (mide, kolon vb.) kolajen I ile birlikte bulunur.
IV	Ağsı Kollajen	Basal membranda bulunur
V	Fibriller Kollajen	Özellikle embriyonik dokularda ve korneada Kolajen I ile birlikte bulunur.
VI	Boncuklu Filamentel Kollajen	Omurlararası diskte ve özellikle geniş bir yayılışa sahiptir.
VII	Sabitleyici Kollajen	Ciltte dermal ve epidermal bağlantıyı sağlayan bölgelerde bulunur.
VIII	Ağsı Kollajen	Gözdeki Descemet membranında bulunur.
IX	FACIT	Özellikle kıkırdak ve vitröz hümoda Kolajen II ile birlikte bulunur.
X	Ağsı Kollajen	Hipertrofik kıkırdakta bulunur.
XI	Fibriller Kollajen	Tip II kollajenle birlikte bulunur.
XII	FACIT	Embriyonik tendonlarda ve ciltte Tip I Kollajenle birlikte yayılış gösterir.
XIII	Transmembran Kollajen	Nöromusküler bağlantılar ve ciltte bulunur.
XIV	FACIT	Fetal tendonlarda Tip I Kollajenle birlikte yayılış gösterir.
XV	Endostatinler	Göz, kas ve mikrodamarlarda bulunan bazal membranlara yakın olan kolajen fibrilleri arasında bulunur.
XVI	FACIT	Kollajen fibrilleri ve fibrillin-1 mikrofibrillerine entegre edilmiş halde bulunur.
XVII	Transmembran Kollajen	Hücreler arası etkileşime katkı sağlar ve epitelde bulunur.
XVIII	Endostatinler	Bazal membranla ilişkilidir ve retinal vaskülojenez için önemlidir.
XIX	FACIT	Bazal membran bölgelerine lokalizedir ve kas fizyolojisi ve farklılaşmasına katkıda bulunur.
XX	FACIT	En çok kornea epitelinde görülür.
XXI	FACIT	Birçok dokuda yaygın bir dağılım gösterirler.

Tablo 1.1: (devamı).

XXII	FACIT	Miyotendinik bağlantıda, kıkırdak sinoviyal sıvısında ve kıl folikülü dermisinde bulunur.
XXIII	Transmembran Kollajen	Metastaz yapan hücrelerde görülür.
XXIV	Fibriller Kollajen	Kemik ve kornea gelişiminde görev alır.
XXV	Transmembran Kollajen	Alzheimer amiloid plağı için prekürsör protein olarak bulunur.
XXVI	Boncuklu Filamentel Kollajen	Testis ve ovaryumda bulunur.
XXVII	Fibriller Kollajen	Embriyonik kıkırdakta, gelişen dermiste, korneada ve kalbin ana arterlerinde bulunur
XXVIII	Boncuklu Filamentel Kollajen	Schwann hücreleri etrafındaki bazal membranda bulunur.

1.1.4.1 Fibriller Kollajenler

Fibriller Kollajenler arasında kollajen tipleri 1, 2, 3, 5, 11, 24 ve 26 bulunur. Fibriller Kollajenler gerilme mukavemeti sağlayarak dokularda geniş ve bol miktarda eksprese edilirler.. Fibrillerin, gelişim aşamasına ve dokunun durumuna bağlı olarak uzunluğu belirsizdir ve çapı 12 nm ila 500 nm arasındadır [18].

Fibriller Kollajenler bağ dokularında farklı şekillerde dağılım gösterirler. Bu nedenle, Tip I Kollajen kemik, deri veya tendondaki ana protein olma görevini üstlenirken, Tip II kollajen ise kıkırdak için spesifiktir. Bunun yanı sıra Tip III Kollajen de Tip I ile birlikte kan damarlarının ana yapısal bileşenleri konumundadırlar [28]. Tüm kolajenler, işlevsel bir kolajen molekülü oluşturmak için üç polipeptit zincirinin bir araya gelmesi gereken trimerik proteinlerdir. Her bireysel zincir tipi farklı bir gen tarafından kodlanır ve Yunanca α harfinin ardından zincir numarası ve kollajen tipinin ismini verir. Örneğin insan *COL1A1* ve *COL1A2* genleri, $\alpha1$ (I) ve $\alpha2$ (I) zincirlerini kodlamaktadır. İnsanlarda veya fare genomlarında bulunan fibril kollajen zincirleri on bir gen tarafından kodlanır [24].

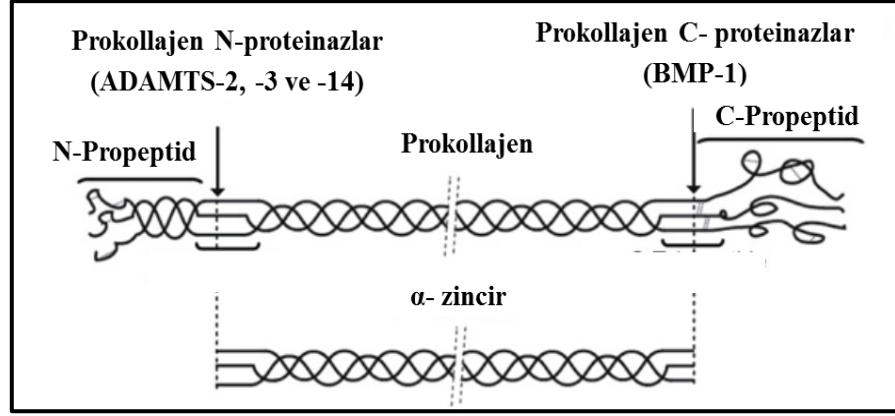
Bir kollajen molekülünü oluşturan üç zincir, aynı (homotrimer) veya farklı (heterotrimer) olabilir. Fibriller Kollajenlerden Tip II ve III, üç özdeş polipeptit zincirinin homotrimeriyken, Tip I Kollajen iki farklı zincirin heterotrimeri olarak bulunur [24]. Küçük Fibriller Kollajenler olan V ve XI tipleri farklı zincir bileşimlerine sahiptirler. İnsanlarda Tip V Kollajen, farklı doku dağılımları ve biyolojik rolleri olan en az üç farklı izoforma sahiptir. Ayrıca, V ve XI tipleri, iki farklı tipten zincirlerle dokulara özgü heterotipik trimerik moleküller oluşturabilir. Bu nedenle, bu iki kollajen farklı türler olarak düşünülmemeli, daha çok çoklu izoformlara sahip tek bir kollajen tipi “V / XI” olarak kabul edilmelidir [29-31]. Daha yeni keşfedilen kollajen tip XXIV ve XXVII'nin ise biyolojik fonksiyonları hakkında nispeten daha az şey bilinmektedir [32].

1.1.4.1.1 Fibriller Kollajenlerin Olgunlaşması

Kollajenler, üç sarmal oluşumundan önce, hidroksilasyon, glikosilasyon ve disülfid köprülerin oluşumunun gerçekleştiği endoplazmik retikulumda translasyon sonrası düzeyde modifiye edilirler.

Fibriller Kollajenler, üçlü sarmal domainin her bir ucunda N ve C propeptidleri içeren prokollajenler olarak sentezlenir. Fibrilogenез için C propeptidlerin ayrılması gerekir. C-propeptidler, BMP-1/Tolloid proteinazlarına özdeş olan prokollajen C-proteinazlar ve Furin proteinleri tarafından kesilerek uzaklaştırılır [33].

N-propeptidler ise *ADAMTS-2*, *ADAMTS-3* ve *ADAMTS-14* proteinazlarına özdeş olan prokollajen N-proteinazlar ile kesilirler. Bununla birlikte, son zamanlarda yapılan gözlemler, *ADAMTS-2*'nin ayrıca C-propeptidlerini, bu kollajen tipine özgü bir özellik olarak görünen prokollajen III'ten kestiğini göstermiştir [34].



Şekil 1.1: Prokollajen aminopeptidaz kesim bölgeleri (Bekhouche, 2015'den uyarlanmıştır) [35].

1.2 Metalloproteinazlar

ECM'nin proteolizinde çok sayıda proteinaz bulunduğu öne sürülmüştür. Bunlar, domain yapılarına göre birkaç farklı proteinaz familyası içinde sınıflandırılabilirler. Bahsi geçen proteinazlara; serin proteinazlar, sistein proteinazlar ve metalloproteinazlar (MMP, ADAM, *ADAMTS* ve BMP-1) örnek verilebilir [36].

Matriks metalloproteinazları (MMP'ler), 25 üyeden oluşan bir metzincin ailesidir. MMP'ler fonksiyonel bir domain yapısını paylaşır ve pro-domain ve katalitik domainleri oldukça yüksek oranda korunmuşluğa sahiptir. Yapısal özelliklerine göre MMP'ler, beşi salgılanan tipte ve üçü membranla ilişkili olan sekiz ayrı alt gruba ayrılırlar [37]. MMP'ler, kollajenler, elastinler, proteoglikanlar ve glikoproteinler gibi majör ekstraselüler matriks (ECM) bileşenlerinin neredeyse tümünü parçalama ve ECM fonksiyonlarını değiştirme yetenekleriyle karakterize edilir [37, 38].

BMP-1, kemik morfogenetik proteinlerinin (BMP) peptidaz M12A ailesinin bir üyesidir. Kemik ve kıkırdak gelişimini tetikler. Diğer BMP'lerin aksine, TGF- β süper ailesine ait değildir. İlk olarak *in vivo*'da kıkırdak oluşumunu indüklemeye fonksiyonu için tanımlanmış olan kemik morfogenetik protein 1, BMP sinyal yolunun bir ligandı değil, astasin metalloproteinaz ailesinin bir üyesidir [39].

BMP-1'in esas işlevi, matür kollajen fibrillerinin oluşumu için tip I, II ve III prokollajenin C-terminalini parçalamaktır [40]. Prokollajenlere ek olarak, BMP-1 aynı zamanda bazal lamina oluşumuna ve onarımına dâhil olan lamininleri de parçalar [41, 42] .

ADAM (Bir Disintegrin ve Metalloproteinaz) ailesi MMP'ler ve *ADAMTS*'lerle ilişkili tip I transmembran metzincin metaloproteinazlarıdır. ADAM'ların geniş bir şekilde eksprese edildiği ve çok çeşitli biyolojik süreçlerde görev aldığı gösterilmiştir [43]. Tüm ADAM'ler, bir pro-domain, bir metaloproteaz, bir disintegrin, bir sistein bakımından zengin domain, bir Epidermal Büyüme Faktörü (EGF), bir transmembran domain ile birlikte bir C-terminal sitoplazmik kuyruğu içeren özel bir domain organizasyonu ile karakterize edilir [44]. Bugüne kadar 34 ADAM proteini tanımlanmıştır. Bunlar arasından 20 tanesinin insan genomunda olduğu 12 tanesinin ise proteolitik aktiviteye sahip olduğu tespit edilmiştir. İnsan genomunda proteolitik aktiviteye sahip olan ADAM'lar dışındaki sekiz insan ADAM ailesi üyesinin (ADAM2, ADAM7, ADAM11, ADAM18, ADAM22, ADAM23, ADAM29, ADAM32) proteolitik aktiviteye sahip olmadığı ancak yine de önemli biyolojik roller oynadığı tahmin edilmektedir [45, 46].

1.2.1 *ADAMTS* Gen Ailesi

ADAMTS (A Disintegrin and Metalloproteinase with Trombosondin type-1 motif) gen ailesi 19 üyeye sahip bir metalloproteinaz ailesidir. Aileye ait keşfedilen ilk gen olma özelliği taşıyan *ADAMTS-1*'i, ilk kez Kuno ve ark. kolon kanseri ve inflamasyon ile bağlantılı olarak 1997 yılında keşfetmişlerdir. *ADAMTS* genleri, dokunun yeniden yapılandırılması, pıhtılaşma, anjiyogenez, ECM'nin degradasyonu, metastaz ve invazyon gibi olaylarda etkinlik gösterirler [47].

1.2.1.1 *ADAMTS* Protein yapısı

Matriks metalloproteinaz (MMP) ve bir disintegrin ve metalloproteinaz (ADAM) familyaları gibi, *ADAMTS* enzimleri de bir prometalloproteaz domaini ve bir yardımcı domain olmak üzere iki kısımdan oluşur.

Bu kısımlarda; (I) bir sinyal dizisi, (II) bir pro-domain, (III) (HE_{xx}H_{xx}G / N / S_{xx}HD) bir metaloproteinaz-katalitik bölge (IV) bir disintegrin benzeri domain, (V) trombospondin tip I-benzeri (TS) motifleri, (VI) yüksek oranda korunmuş bir sistein bakımından zengin domain, (VII) bir ara bölge ve (VIII), değişken sayıdaki trombospondin tekrar motifinden oluşan bölge ve karboksi terminal bölgesi bulunur [48].

ADAMTS katalitik domaini, tipik reprotolizin çinko-bağlama domainine sahiptir. Birçok ADAM geninden farklı olarak, bu aktif bölge domaini tüm *ADAMTS* ailesi üyelerinde sağlam olduğu ve bu nedenle tüm üyelerin katalitik olarak yetkin olduğu ve proteolitik aktivite gösterdiği tahmin edilmektedir. ADAM ve MMP üyelerinin aktif bölgelerinden farklı olarak, birçok *ADAMTS* ailesi üyesi (Ör; *ADAMTS*-1, -4, -9 ve -15), ikinci ve üçüncü histidinlerin arasında bulunan ve korunmuş olan glisin bir asparajin substitüsyonuna sahiptir. *ADAMTS* genlerinin aktif bölgesi, MMP'lerde ve ADAM'lerde tarif edilene benzer bir "Met dönüşü" içeren korunmuş bir metiyonine sahiptir. MMP'lerden farklı olarak, ADAM'larda olduğu gibi *ADAMTS*'lerde de aktif bölge ile "Met-dönüşü" arasında korunmuş bir sistein aminoasidi bulunur. *ADAMTS*-1, *ADAMTS*-4 ve *ADAMTS*-5 katalitik domainlerinin kristal yapıları, MMP ve ADAM yapılarıyla kıyaslandığında sekonder yapı benzerlikleri gösterdiği görülmektedir. Fakat *ADAMTS* üyelerinin katalitik domainleri, iki Kalsiyum bağlama bölgesi içermektedir [19, 49, 50].

ADAMTS-1 ve *ADAMTS*-5'in disintegrin benzeri domainlerinin, katalitik domaine karşın sıkıca paketlenmiş ve substrat spesifikliğine katkıda bulunabilecek bir ekzosite sağladığı görülmektedir. *ADAMTS* genlerinin disintegrin benzeri domainleri sekiz sistein içermekte ve yılan zehri disintegrinlerinin primer yapısına benzerlik göstermektedir [51]. Katalitik olmayan *ADAMTS* benzeri proteinlerde metalloproteinaz ve disintegrin benzeri domainlerin yokluğu, *ADAMTS*-1 ve *ADAMTS*-5 gibi katalitik ve disintegrin benzeri domaine sahip *ADAMTS*'lerin X-ışını kristalografisi ile elde edilen üç boyutlu yapılarıyla karşılaştırıldığında, katalitik ve disintegrin benzeri domainlerin *ADAMTS* peptidazlarında fonksiyonel olarak birleşmiş olabileceğini göstermektedir. Bu yapılar, disintegrin benzeri domainlerin sekonder yapısının, sisteince zengin domainin N-terminal kısmınıninkine benzer olduğunu ortaya çıkarmıştır [19, 52].

ADAMTS'lerde merkezi trombospondin tip 1 tekrar motifi (TSR1) yüksek oranda korunmuştur. TSR'ler, O-fukosilasyon ve C-mannosilasyon ile modifiye edilir [53, 54] ve bazılarının glikosaminoglikan ve hücre bağlanma bölgeleri içerdiği öngörülmektedir [55].

ADAMTS'lerde sisteince zengin domain (CRD) 10 sistein aminoasidi içerirken, ara domain sistein aminoasidinden yoksundur. Ara domain yapısı bilinen tek aile üyesi olan *ADAMTS-13*'te TSR, CRD ile çoklu etkileşime sahip olan ve 10-iplikçikli- β -sandviç katlanma içeren küresel yapıda fonksiyonel bir birim oluşturur [52]. Memeli *ADAMTS* peptidazlarındaki downstream TSR'lerin sayısı, 0 (*ADAMTS-4*) ila 14 (*ADAMTS9* ve *ADAMTS20*) arasında değişmektedir. Bu TSR'ler bazı üyelerde kesintisiz bir yapı gösterirken, bazı üyelerde ise kısa yapılandırılmamış peptidler (*ADAMTS-9*) [56] veya bir müsin benzeri bölge (*ADAMTS-7* ve *ADAMTS-12*) ile bloklar halinde ayrılmıştır [57]. Prolin rezidüleri genellikle bitişik TSR'ler arasında bulunur. TSR1'den farklı olarak, downstream TSR'ler oldukça değişken bir sekansa sahiptir. Ancak 6-sistein rezidüsü neredeyse her zaman korunur. Bazı *ADAMTS* peptidazları, bir C-terminal PLAC (proteaz ve lakunin) domaini içerir [58]. PLAC domaini; *ADAMTS*'lerde, *ADAMTS* benzeri proteinlerde ve bazı proprotein konvertazlarının C-terminalinde veya C-terminalin yakınlarında lokalize olmaktadır [59]. *ADAMTS-13*, *ADAMTS-2* ile birlikte iki CUB domaini içeren bir C-terminaline sahip olması bakımından benzersizdir.

Bunun yanı sıra bir RGD motifine (potansiyel bir integrin bağlantı bölgesi) sahip olan tek *ADAMTS* ailesi üyesidir [60, 61]. *ADAMTS-9* ve *ADAMTS-20*, yalnızca *Caenorhabditis elegans* GON-1 ile paylaşılan bir C-terminali domainine sahiptir [62, 63].

1.2.1.2 *ADAMTS* Ailesi Üyeleri

ADAMTS-1; 21. kromozomda (21q21.3) yer alır. 1600 aminoasitten oluşmuş olup, 8 tane ekzona sahiptir. Bunun yanı sıra 110 kDa moleküler ağırlığında bir protein teşkil eder. Diğer *ADAMTS* ailesi üyelerinde olduğu gibi *ADAMTS-1* de zimojen formda salgılanır ve furinler ile kesilerek aktif forma dönüştürülür. Bu durum proteinlerin moleküler ağırlıklarını da etkilemektedir.

Buna bağılı olarak protein analiz deneylerinde farklı moleküler ağırlıklara sahip bantlar gözlenebilmektedir [47]. *ADAMTS-1*'in kıkırdak ve sinovyumda eksprese edildiğı ve agrekan ve versikanı parçaladığı gösterilmiştir [43].

ADAMTS-8 geni 11. kromozomda (11q24.3) yer alır. 889 aminoasitten oluşmuş olup, 9 ekzona sahiptir [64]. Anjiyojenezin durdurulmasında ve akciğer neoplazmasında rol oynar [65].

ADAMTS-4, 1. Kromozomda yer almaktadır (1q23.3) ve 837 aminoasitten oluşmuş olup, 9 ekzona sahiptir. Bunun yanı sıra 90 kDa moleküler ağırlığında bir protein teşkil eder. Osteoartritte, merkezi sinir sistemi hastalıklarında ve gliomanın progresyonunda önemli rol oynar [66].

ADAMTS-5, 21. Kromozomda yer almaktadır (21q21.3) ve 830 aminoasitten oluşmuş olup, 8 ekzona sahiptir. Bunun yanı sıra 100 kDa moleküler ağırlığında bir protein teşkil eder. Proteoglikan degradasyonunda ve insan osteoartritinin patogeneğinde önemli rollere sahiptir [67].

ADAMTS-6, 5. Kromozomda yer almaktadır (5q12.3) ve 1115 aminoasitten oluşmuş olup, 25 ekzona sahiptir. Bunun yanı sıra 125 kDa moleküler ağırlığında bir protein teşkil eder. *ADAMTS-6*'nın Hipofiz malignitesinin prognozunda rol oynadığı belirtilmiştir [68]. *ADAMTS-7*, 5. Kromozomda yer almaktadır (15q25.1) ve 1686 aminoasitten oluşmuş olup, 24 ekzona sahiptir. Bunun yanı sıra 181 kDa moleküler ağırlığında bir protein teşkil eder [69, 70].

ADAMTS-12, 15. Kromozomda yer almaktadır (5p13.3-13.2) ve 1594 aminoasitten oluşmuş olup, 24 ekzona sahiptir. Bunun yanı sıra 178 kDa moleküler ağırlığında bir protein teşkil eder. *ADAMTS-7* ile beraber OA ve RA gibi hastalıklarda rol oynadığı belirtilmiştir. Bunun yanı sıra *ADAMTS-7* ve *ADAMTS-12* kıkırdak oligomerik matriks proteinini (COMP) degrede ederler. Bu yüzden COMP-*ADAMTS* ismini almışlardır [71].

ADAMTS-9, 3. Kromozomda yer almaktadır (3p14.1) ve 1935 aminoasitten oluşmuş olup, 39 ekzona sahiptir. Bunun yanı sıra 216 kDa moleküler ağırlığında bir protein teşkil eder. *ADAMTS-9* normal kıkırdakta ifade edilir ve pro-enflamatuar sitokinlere cevap olarak yüksek oranda indüklenir. OA'nın geç safhalarında *ADAMTS-9* ekspresyonunun azaldığı belirtilmiştir [72].

ADAMTS-10, 19. Kromozomda yer almaktadır (19p13.2) ve 1103 aminoasitten oluşmuş olup, 24 ekzona sahiptir. Bunun yanı sıra 120 kDa moleküler ağırlığında bir protein teşkil eder. *ADAMTS-10*'un Weil Marchesani Sendromuyla ilişkili olduğu belirtilmiştir [73].

ADAMTS-13, 9. Kromozomda yer almaktadır (9q34.2) ve 1450 aminoasitten oluşmuş olup, 29 ekzona sahiptir. Bunun yanı sıra 150 kDa moleküler ağırlığında bir protein teşkil eder. Substratı von Wildebrand faktör (vWF) olan *ADAMTS-13*'ün trombotik trombositopenik purpura (TTP) hastalığında rol oynadığı bilinmektedir [74].

ADAMTS-15, 11. Kromozomda yer almaktadır (11q25) ve 950 aminoasitten oluşmuş olup, 8 ekzona sahiptir. Bunun yanı sıra 103 kDa moleküler ağırlığında bir protein teşkil eder. *ADAMTS-15*'in gelişimsel versikan kesimine katıldığı bununla birlikte kıkırdakta ifade edildiği ve agrekanı parçalayabildiği bilinmektedir. Üç mikroarray çalışması, OA kıkırdağında *ADAMTS-15*'in ekspresyonunun arttığını, iki tanesi ise ekspresyonun azaldığını göstermiştir [75, 76].

ADAMTS-16, 11. Kromozomda yer almaktadır (11q25) ve 1224 aminoasitten oluşmuş olup, 23 ekzona sahiptir. Bunun yanı sıra 136 kDa moleküler ağırlığında bir protein teşkil eder. *ADAMTS-16* ekspresyonunun OA kıkırdakta arttığı ve enzimin kesilmiş bir formunun agrekanaz aktivitesi gösterdiği belirtilmiştir [77, 78].

ADAMTS-17, 15. Kromozomda yer almaktadır (15q26.3) ve 1095 aminoasitten oluşmuş olup, 22 ekzona sahiptir. Bunun yanı sıra 121 kDa moleküler ağırlığında bir protein teşkil eder. *ADAMTS-10* gibi Weil Marchesani Sendromunda rol oynadığı belirtilmiştir [79].

ADAMTS-18, 16. Kromozomda yer almaktadır (16q23.1) ve 1221 aminoasitten oluşmuş olup, 23 ekzona sahiptir. Bunun yanı sıra 135 kDa moleküler ağırlığında bir protein teşkil eder. Ağır retinal distrofi hastalığı ile ilişkilendirilmiştir.

ADAMTS-19, 5. Kromozomda yer almaktadır (5q23.3) ve 1207 aminoasitten oluşmuş olup, 23 ekzona sahiptir. Bunun yanı sıra 134 kDa moleküler ağırlığında bir protein teşkil eder. Akciğerde ekprese edilmektedir [73].

ADAMTS-20, 12. Kromozomda yer almaktadır (12q12) ve 1910 aminoasitten oluşmuş olup, 39 ekzona sahiptir. Bunun yanı sıra 214 kDa moleküler ağırlığında bir protein teşkil eder. *ADAMTS-20*, kıkırdakta ifade edilir ve OA'da ekspresyonu artar, ancak enzimin, gelişim sırasında versikan kleavjı için önemli olduğu düşünülmektedir. *ADAMTS-9* ve *ADAMTS-20* Sahip oldukları GON-1 domaini dolayısıyla GON-*ADAMTS* ismini almışlardır [43, 80].

1.2.1.2.1 Prokollajen N-propeptidazlar (pNP)

ADAMTS-2, *-3* ve *-14* fibriler prokollajenlerin aminopeptidini parçalayabilme özelliklerinden dolayı prokollajen N- proteinazlar (pNPs) olarak adlandırılırlar [35]. Kollajenlerin C-terminal uçlarının olgunlaşmasında ise BMP-1 (Bone Morphogenetic Protein 1; kemik morfogenezik protein-1) enzimi görev almaktadır [81]. *ADAMTS-2*, *-3*, *-14* ile BMP-1 enzimleri prokollajenlerin N ve C terminallerini işleyerek onları olgun kollajenler haline getirirler [35]. Hem *ADAMTS-2* hem de *ADAMTS-3*, prokollajenaz aktivitesine sahiptir. *ADAMTS-2* tip I, II, III ve V kollajen prekürsörlerini işlerken *ADAMTS-3* ağırlıklı olarak kollajen tip II'yi işler [82].

ADAMTS-2, *3* ve *14*, tam olarak aynı domain organizasyonuna sahiptir. Diğer *ADAMTS*'ler gibi, bir sinyal peptidi, bir prodomain, bir katalitik domain, bir disintegrin benzeri domain, tekrarlanan bir trombospondin tip I motif, bir sistein bakımından zengin domain ve bir ara domainden oluşurlar. Ayrıca spesifik olarak üç ek TSR motifi ve bir PLAC motifi içeren bir C terminaline sahiptirler.

Prokollajen N-proteinaz aktivitesi başlangıçta sığır dermatosparaksisinde genetik bir hastalık yardımı ile tanımlandı. Dermatosparaktik sığırların doku ekstraktlarında pN-kollajen kesilmezken, normal sığırların doku ekstraktlarında kesildiği gözlemlendi. Bu durum, dermatosparaktik sığırların prokollajen N-proteinaz aktivitesi eksikliğini ortaya çıkardı. Daha sonra enzim aktivitesi, sığır dokularından, civciv embriyolarından, sığır derisi ve tendonlarından saflaştırıldı. Enzim ayrıca prokollajen peptidaz, prokollajen N-proteaz, prokollajen N-proteinaz ve prokollajen I N-proteinaz olarak da bilinmektedir.

ADAMTS-14, 10. Kromozomda yer almaktadır (10 q22.1) ve 1226 aminoasitten oluşmuş olup, 22 ekzona sahiptir. Bunun yanı sıra 134 kDa moleküler ağırlığında bir protein teşkil eder. *ADAMTS-14*'ün dalak, karaciğer ve beyin dokularında yüksek oranda ifade edildiği tespit edilmiştir [83]. *ADAMTS-14*, insan OA kırırdağında önemli ölçüde up-regüle edilir [84]. *ADAMTS-14*'ün tek nükleotid polimorfizmleri (SNP'ler) iki kadın kohortunda diz OA riskinin artması ile ilişkilendirilmiştir [85].

ADAMTS-2, 5. Kromozomda yer almaktadır (5q35.3) ve 1211 aminoasitten oluşmuş olup, 22 ekzona sahiptir. Bunun yanı sıra 134 kDa moleküler ağırlığında bir protein teşkil eder [73]. *ADAMTS-2*, çeşitli prokollajen proteinlerinin işlenmesinden sorumludur. Prokollajenler, birçok vücut dokusuna kuvvet ve destek sağlayan proteinler olan kollajenlerin öncülleridir. Spesifik olarak, *ADAMTS-2* prokollajenin N-terminal ucunu keser. Bu kesme süreci, kollajen moleküllerinin matürasyonu ve normal şekilde çalışması için gereklidir [48].

ADAMTS-2 geninde gerçekleşen mutasyonlar, koyunlarda ve büyükbaş hayvanlarda dermatosparaksiye ve insanlarda Ehlers-Danlos Sendromu (EDS tip VIIC) gibi ciddi cilt kırılabilirliği, eklem gevşekliliği ve karakteristik yüz ile karakterize edilen otozomal resesif bir bozukluğa neden olur [86]. Farelerde *ADAMTS-2* yokluğu oluşturularak yapılan bir çalışmada, *ADAMTS-2*'ce yoksun farelerin, doğumda genel olarak normal olmasına rağmen, 1-2 ay sonra ciddi cilt kırılabilirliği geliştirdiği gözlemlendi. Bunun yanı sıra *ADAMTS-2*'ce yoksun dişi fareler normal bir şekilde doğurganlığa sahip olmasına rağmen erkeklerin kısır oldukları belirlenmiştir [83]. Bunun yanı sıra *ADAMTS-2*'nin anti anjiyogenik aktivite ve apoptoz ile ilişki *in-vitro* ve *in-vivo* çalışmalarla ortaya konmuştur. *ADAMTS-2*'nin anti anjiyogenik aktivitesi VEGF ve FGF-2 ile endotel hücrelerde stimüle edilerek gözlemlenmiştir. Ancak aynı koşullar altında fibroblast karakterli hücrelerde benzer etki gözlenememiştir [87].

Michael ve arkadaşları tarafından Üç İnsan Kostal Kondrosit Hücre Hattında inflamasyonla alakalı sitokinlerin *ADAMTS-2* geninin mRNA düzeyindeki ekspresyonuna etkisi araştırılmıştır. Bu araştırma sonucunda *ADAMTS-2* geni C20/A4 ve C-28/I2 hücrelerinde IL1- β , *TNF- α* ve IFN- γ tarafından downregüle edilirken, T/C-28 a2 hücrelerinde IL1- β ve *TNF- α* tarafından upregüle edildiği belirlenmiştir [88].

2014 yılında Alper ve arkadaşları tarafından osteosarkoma hücre hattında yapılan bir çalışmada IL-6'nın *ADAMTS-2*'nin ekspresyonunu transkripsiyonel seviyede indüklediği ve bunu JNK (c-Jun N-Terminal Kinase) yolağını kullanarak gerçekleştirdiği belirlenmiştir [89]. 2015 yılında osteosarkoma hücrelerinde yapılan bir diğer çalışmada ise *ADAMTS-2*'nin ekspresyonunun IL-1 α sitokini ile indüklendiği ve bu etkiyi MEK/JNK ve PI3K yolları üzerinden gerçekleştirdiği belirlenmiştir [82].

ADAMTS-3 4. Kromozomda yer almaktadır (4q13.3) ve 1205 aminoasitten oluşmuş olup, 23 ekzona sahiptir. Bunun yanı sıra 135 kDa moleküler ağırlığında bir protein teşkil eder [73]. *ADAMTS-3* esas olarak kıkırdakta eksprese edilir ve cilt, akciğer ve aort patolojilerinde rol oynar. *ADAMTS-3* insan derisi ve cilt fibroblastlarında *ADAMTS-2*'den daha az eksprese olur ancak kıkırdakta daha fazla bulunur. Artmış *ADAMTS-3* gen ekspresyonu, osteoartrit, miyokard enfarktüsü ve meme kanseri gibi bazı patolojik durumlarda da gözlenmiştir [90].

Yamakage ve arkadaşları 2019 yılında yapmış oldukları çalışmada *ADAMTS-3*'ün postnatal inhibisyonunun, App^{NL-F} farelerinde amiloid β peptid (A β) birikmesini inhibe ettiğini, bunun yanı sıra *ADAMTS-3* inhibisyonunun App^{NL-G-F} farelerde amiloid β peptid (A β) birikmesi üzerinde çok az oranda etkili olduğunu bulmuşlardır [91].

Janssen ve arkadaşlarının *ADAMTS-3* geninden yoksun fareler üzerine yapmış oldukları çalışmada, farelerin gebeliğin ilk 15 günü içinde embriyonik ölüme gittiğini bu yüzden *ADAMTS-3* geninin farelerde embriyonik gelişim için kritik bir rol oynadığını ortaya koymuşlardır [92].

Jeltsch ve arkadaşları, *ADAMTS-3* aracılığında kollajen ve kalsiyum bağlayıcı EGF domain 1 (CCBE1) proteininin VEGF-C aktivasyonu ile lenfanjiyogenez arttırdığını belirtmişlerdir [93].

Brouillard ve arkadaşları 2017 yılında yapmış oldukları çalışmada *ADAMTS-3* aktivitesinin yokluğunun Hennekam sendromuna yol açtığını tespit etmişlerdir [94]. 2014 yılında Alper ve arkadaşları tarafından osteosarkoma hücre hattında yapılan bir çalışmada IL-6'nın *ADAMTS-3*'nin ekspresyonunu transkripsiyonel seviyede indüklediği belirlenmiştir [89].

Ayrıca 2015 yılında osteosarkoma hücrelerinde yapılan bir diğer çalışmada ise *ADAMTS-3*'nin ekspresyonunun IL-1 α sitokini ile indüklendiği osteosarkoma hücre modellerinde belirlenmiştir [82].

Tablo 1.2: *ADAMTS* Gen Ailesi üyeleri hakkında bilgiler [73, 95].

GEN	KROMOZOM	SUBSTRAT	EKSPRESYON	PROTEİN AĞIRLIĞI (kDa)
<i>ADAMTS-1</i>	21q21	Agrekan, Versikan, Brevikan	Kalp, Böbrek, Ovaryum, Plasenta	110
<i>ADAMTS-2</i>	5q35.3	Fibriller Prokollajen tip I-III ve V	Kalp, Akciğer, Tendon, Uterus	134
<i>ADAMTS-3</i>	4q13.3	Fibriller Prokollajen tip II, Biglikan	Kıkırdak, Tendon, Beyin	135
<i>ADAMTS-4</i>	1q 23.3	Agrekan, Versikan, Brevikan, Matrillin-3	Omurilik, Adrenal Korteks, Beyin, Retina, Kıkırdak	90
<i>ADAMTS-5</i>	21q21.3	Agrekan, Versikan, Brevikan, Matrillin-4	Adiposit, Uterus, Kıkırdak	100
<i>ADAMTS-6</i>	5q12.3	-	Apandis, Plasenta, Kalp	125
<i>ADAMTS-7</i>	15q25.1	COMP	Karaciğer, Kalp,	181
<i>ADAMTS-8</i>	11q24.3	Agrekan	Kalp, Karaciğer,	96
<i>ADAMTS-9</i>	3p14.1	Agrekan, Versikan	Dorsal Kök Ganglionu, Kıkırdak	216

Tablo 1.2: (devamı).

<i>ADAMTS-10</i>	19p13.2	Fibrillin-1	CD8 + T Hücreleri, Beyin, Uterus	120
<i>ADAMTS-12</i>	5p13.3-13.2	COMP	Karaciğer, Kemik İliği	178
<i>ADAMTS-13</i>	9q34.2	vWF	Akciğer, Karaciğer Tiroid	150
<i>ADAMTS-14</i>	10q22.1	Fibriller Prokollajen tip I	Deri, Talamus, Kemik İliği, Adiposit, Kemik	134
<i>ADAMTS-15</i>	11q25	Aggrecan, versican	Kolon, Beyin, Kalp, Uterus	103
<i>ADAMTS-16</i>	5p15.32	Agrekan	Prostat, Beyin	136
<i>ADAMTS-17</i>	15q26.3	-	Karaciğer, Prostat	121
<i>ADAMTS-18</i>	16q23.1	Agrekan	Kalp, Deri	135
<i>ADAMTS-19</i>	5q23.3	-	Akciğer	134
<i>ADAMTS-20</i>	12q12	Versikan	Beyin, Kalp	214

1.2.1.3 *ADAMTS* ve Kanser İlişkisi

Kanser, vücudun diğer bölgelerine invazyon veya metastaz potansiyeli ile anormal hücre büyümesini içeren bir hastalık grubudur. Olası belirti ve semptomlar arasında sebebi bilinmeyen kilo kaybı, nod oluşumu, anormal kanama, uzun süreli öksürme durumu ve barsak hareketlerinde düzensizlik sayılabilir. Bu semptomlar kanser belirteci olarak işlev görse de, bunların dışında başka nedenleri de olabilir. İnsanları 100'den fazla kanser türünün etkilediği düşünülmektedir [96, 97].

Kanser kaynaklı ölüm sebeplerinin %22'sini tütün kullanılması oluşturur. %10'u da obezite, kötü besin alımı, egzersiz eksikliği veya yüksek oranda alkol tüketimi nedeniyledir.

Diğer faktörler arasında belirli enfekte edici ajanlar, radyasyon ve çevresel pollutantlar yer alır. Meydana gelen kanser oluşumlarının % 15'i, insan papilloma virüsü, *Helicobacter pylori*, hepatit C, hepatit B, EBV ve HIV kaynaklıdır.

Bu ajanlar bir hücreye ait genleri modifikasyona uğratarak etki gösterirler. Tipik olarak, kanser oluşumu öncesinde birden fazla genetik değişime ihtiyaç duyulur ve bu değişiklikler neticesinde kanser oluşumu gözlenmektedir [98].

İnsanda kansere sebep olma potansiyeli bulunan çok sayıdaki gen ailelerinden birisi olan *ADAMTS* gen ailesi üyeleri arasında da bazılarının kansere neden olduğu bulunmuştur. İlk olarak kanser kaşeksisinde keşfedilen *ADAMTS-1*'in (METH-1) hem pro- hem de anti-metastatik özelliklere sahip olduğu gösterilmiştir. *ADAMTS-1*'in ifadesi akciğer, meme, pankreas, prostat ve hepatoselüler kanserlerde gösterilmiştir [99, 100]. Özofagus kanserlerinde, TGF- β sinyallerinin kaybı, EGF aracılı metastatik yolları indükleyen *ADAMTS-1* ekspresyonunun artmasına neden olduğu tespit edilmiştir [101]. *ADAMTS-1*'in ayrıca TGF- β varlığında akciğer kanseri gelişimini arttırdığı gösterilmiştir [102]. *ADAMTS-1*'in kanser progresyonunda N- veya C- terminal uçlarının kesilmiş formlarıyla, tam uzunluktaki formlarının farklı aktivite gösterdiği bulunmuştur. Bu bağlamda, tam uzunluktaki *ADAMTS-1*'in murin meme karsinoması ve Lewis akciğer karsinomunun progresyonunu arttırdığı gözlemlenirken, kesilmiş formların bu kanserlerin progresyonunu inhibe ettiği tespit edilmiştir [103].

ADAMTS-2 ve *-3* de kanser progresyonunda çift rol oynar. Örneğin, osteosarkomda TGF- β ile indüklenmiş *ADAMTS-2* ekspresyonunun, prokollajen I ve II'nin kesme özelliğini arttırdığı ve metastaza sebep olduğu gösterilmiştir [104]. Buna karşılık, eksojen *ADAMTS-2*'nin, insan endotel hücre hatlarının proliferasyonunu, bağlanmasını ve hayatta kalmasını azalttığı tespit edilmiştir. Ayrıca *ADAMTS-2* ekspresyonunun metalloproteinaz aktivitesinden bağımsız olarak anti-anjiyojenik ve anti-tümörijenik etkilere aracılık ettiği gösterilmiştir [87]. İnsan Meme Adenokarsinoma Hücre hattı olan MCF-7 hücrelerinde 5 μ g/mL hiperisin kullanımıyla *ADAMTS-3* ekspresyonunun 3,9 kat arttığı gösterilmiştir [105].

ADAMTS-4'ün de kanserde ikili fonksiyonlara sahip olduğu gösterilmiştir. *ADAMTS-4* ekspresyonunun, benign prostat kanserinde, ortama TGF- β uygulanması ile stromal hücrelerdeki *ADAMTS-4* ekspresyonunu arttırdığı gösterilmiştir [99].

B16 melanom hücrelerinde *ADAMTS-4*'ün tam uzunluktaki formu ile C-terminal ucunun kesilmiş haldeki formunun, farelerde büyümeyi ve anjiyogenez arttırdığı görülürken, sadece C-terminal yardımcı domainini içeren ve katalitik olarak aktif olmayan E362A mutanlığı veya kesilmiş fragmanlarının aşırı ekspresyonunun, benzer koşullar altında melanom büyümesini ve anjiyogenez baskıladığı görülmüştür [106].

Proteoglikan, Agrekan, Versikan ve Brevikan'ları kesme kabiliyetiyle iyi bilinen *ADAMTS-5*'in, anti-anjiyojenik etkiler yoluyla bir tümör baskılayıcı protein olarak etki ettiğı gösterilmiştir [107]. *ADAMTS-5* ekspresyonunun, promotörünün hipermetilasyonunun aracılık ettiğı prostat ve hepatoselüler karsinoma hücre hatlarının yanı sıra meme ve kolorektal kanserde de downregüle edildiğı gösterilmiştir [108]. Ayrıca, *ADAMTS-5*'in aşırı ekspresyonu, otokatalitik fragmanlar olan p45 ve p60 ile farelerde melanom tümörlerinin büyümesini azalttığı ve anjiyogenezin inhibe ettiğini gösterdi. Bu da, *ADAMTS-5*'in, proteoglikanaz aktivitesinden bağımsız olarak tümör supresör fonksiyonuna sahip olduğunu *in vitro* olarak ortaya koydu [109]. Buna karşılık, larengeal kanserde *ADAMTS-5*'in (ve -4'ün) ekspresyonu artmış ve muhtemelen bu aile üyelerinin agrekanaz işlevi ile ilgili potansiyel bir pro-tümör rolü olduğunu düşündürmüştür [110]. *ADAMTS-8* çeşitli kanser türlerinde tümör baskılayıcı olarak tanımlanmıştır. *ADAMTS-8* ekspresyonunun, büyük ölçüde promotör metilasyonu nedeniyle eşleştirilmiş normal dokularla karşılaştırıldığında beyin, meme, gastrik, baş ve boyun skuamöz ve pankreas karsinom hücrelerinde downregüle edildiğı gösterilmiştir [111, 112]. Nazofarengeal karsinoma hücrelerinde ve özofagus skuamöz hücrelerinde *ADAMTS-8*'in restorasyonu, hücre klonojenikliğini ve göçünü azalttığı, ancak EGFR-ERK sinyallerinin antagonizmasına bağı olarak apoptozu arttırdığı tespit edilmiştir [111]. Ayrıca *ADAMTS-8*'in beyin tümörlerinde ekspresyonunun azalması apoptotik yolların inhibe edilmesine ve böylece kanserin progresyonuna neden olduğu tespit edilmiştir [112].

Benzer şekilde, *ADAMTS-9*'un, neoplastik olmayan hücre hatlarına kıyasla malign ve invaziv meme karsinomlarında azaldığı gösterilmiştir [113]. Ayrıca, *ADAMTS-9* ekspresyonunun, proanjiyojenik faktörler olan VEGF-A ve MMP-9'daki redüksiyonunun aracılık ettiğı anjiyogenezin baskılanması yoluyla özofagus skuamöz hücrelerinin ve nazofarengeal kanserlerin büyümesini inhibe ettiğı belirlendi [114].

Azalan *ADAMTS-9* ekspresyonu, bu kanserin ilerlemesinde yararlı bir biyobelirteç olarak işlev görebilecek nazofarenks karsinomlarının lenf nodu metastazında da gözlenmiştir [115]. *ADAMTS-9* ekspresyonu ayrıca, böbrek ve yumurtalık kanserlerinde de gösterilmiştir, ancak bu kanserler üzerine etkileri daha fazla araştırılmamıştır [116].

ADAMTS-12'nin, katalitik aktivitesinden bağımsız olarak çeşitli kanserlerde bir tümör baskılayıcı olarak da hareket ettiği düşünülmektedir. Köpek böbrek, sığır aortik endotel ve insan akciğer karsinomu hücrelerinde *ADAMTS-12* ekspresyonunun, RAS-MAPK yolunun inhibisyonu yoluyla tümör oluşumunu, tübül oluşturma kabiliyetini ve deri altı tümör büyüklüğünü azalttığı tespit edilmiştir [117, 118]. *ADAMTS-12*'nin ekspresyonu, MCF-7 göğüs kanseri hücre hattının *in vitro* ve *in vivo* büyümesini önemli ölçüde inhibe ettiği belirlenmiştir [119]. *ADAMTS-12*'nin aşırı ekspresyonu, SCID farelerinde A549 akciğer kanseri hücrelerinin büyümesinde azalmaya yol açtığı görülmüştür [118]. *ADAMTS-12*'nin ekspresyonu kolon kanseri hücrelerinde epigenetik olarak susturulmuş, ancak bitişik stromal hücrelerde normal çiftlenmiş normal dokulara kıyasla artış gösterdiği gözlemlenmiştir. Bu bağlamda, stromal *ADAMTS-12* birikiminin, kanser gelişimini önlediği ve pozitif bir prognostik faktör olarak görev yaptığı gösterilmiştir [120]. Bunun yanı sıra, *ADAMTS-12* geninin nakavt edildiği farelerde tümör anjiyogenezinin inhibe olduğu tespit edilmiştir [117].

ADAMTS-15'in meme ve kolorektal kanserlerde tümör baskılayıcı olarak görev yapmaktadır [121, 122]. *ADAMTS-15* ekspresyonunun, meme kanseri hastalarında prognoz artmasıyla ilişkili olduğu ve meme kanseri hücre hatlarında hareketliliğin ve endotel hücre hatlarında tübül oluşumunun azalmasına yol açtığı tespit edilmiştir [121]. *ADAMTS-15* ekspresyonu ayrıca meme kanseri hücrelerinin karaciğere metastazını azaltırken, akciğere metastazını arttırdığı görülmüştür [76]. *ADAMTS-15*'teki inaktive edici mutasyonlar ayrıca bir kolorektal ve pankreas kanseri hastaları alt grubunda tanımlanmıştır. Kolorektal hücre hatlarında *ADAMTS-15*'in susturulmasının, hem *in vitro* hem de *in vivo* olarak tümör büyümesine yol açtığı ve bu etkinin, *ADAMTS-15*'in yeniden ekspresyonu ile tersine çevrilebildiği tespit edilmiştir [122]. *ADAMTS-15*'in kolon kanseri hücrelerinde aşırı ekspresyonunun ERK yolunu inhibe ettiği, yolun aktivasyonunun ise *ADAMTS-15*'in susturulmasının ardından görüldüğü belirlenmiştir [122].

Prostat kanserinde, *ADAMTS-15*'in, erken evre ve iyi huylu prostat kanseri hücre hatlarıyla karşılaştırıldığında geç evre kanser hatlarında up-regüle olduğu gösterilmiştir [123].

1.3 Sitokinler

Sitokinler dokular ve bağışıklık sistemi arasındaki habercilerdir. Kanser başlangıcı, progresyonu, metastaz ve immünoterapide önemli rol oynarlar. Sitokinler ve reseptörlerinin kullanmış olduğu yollar malign dönüşümde önemlidir [124].

Sitokinler dokuz kategoriye ayrılır. Bunlar; kemokinler, interferonlar (IFN'ler), tümör nekroz faktörleri (*TNF*'ler), transforme edici büyüme faktörü- β aile üyeleri, interlökin-1 (IL-1) aile üyeleri, hematopoietik büyüme faktörleri (IL-1, G-CSF, GM-CSF gibi) ve trombosit kaynaklı büyüme faktörleri (PDGF'ler) [125].

Sitokin reseptörleri yedi alt sınıfa ayrılır: Tip-I sitokin reseptörleri, Tip-II sitokin reseptörleri, TGF- β reseptörleri, *TNF* reseptörleri, immünglobulin süper ailesi reseptörleri, G-Protein bağlı reseptörler ve IL-17 reseptörleri [126].

Sitokinler, immün sistem hücrelerini aktive ederler ve gelişimlerini, farklılaşmasını ve göçlerini düzenlerler. Ayrıca strese karşı ana immün cevabı uyarıp, hücresel zararı en aza indirerek; homeostazı restore ederler [127, 128]. Bu mesajcı proteinler ya sekrete edilirler ya da membran-bağımlı olarak bulunurlar ve bağışıklık hücrelerinin birbirleriyle parakrin, otokrin ya da endokrin tarzda iletişimine izin verirler [125, 126]. Membrana bağlı sitokin formları, doğrudan hücre-hücre teması yoluyla iletişimi sağlar, ancak salgılanan sitokinler, sinyalin diğer dokulara hızlı yayılmasına izin verir [126].

Sitokinler ya pro ya da anti-inflamatuardır. IL-1 β ve *TNF- α* gibi pro-inflamatuar sitokinler, enfeksiyon veya yaralanma sonucu enflamasyonu indükler. IL-10 ve TGF- β gibi anti-inflamatuar sitokinler, enflamasyon ve konak hasarı ile sınırlı olmak üzere pro-inflamatuar sinyallerin aktivitesini ve üretimini inhibe ederler [129]. Sitokinler, yalnızca patojenlere karşı değil, aynı zamanda tümörlere karşı da konakçı immün yanıtlarını uyarır [126].

Konak kaynaklı sitokinler, proliferasyonu arttırdığı, apoptozu azalttığı, invazyon ve metastazı teşvik ettiği gibi, tümör progresyonunu inhibe edebilir [128]. Sitokinler, otoimmün ve oto-inflamatuar hastalıkların ve kanserin patogenezinde kritik rol oynar. Bununla birlikte, bu tür hastalıklarda terapötik maddeler olarak da kullanılırlar [126].

1.3.1 İnflamatuar Sitokinler

İnflamatuar veya proinflamatuar sitokinler; yardımcı T hücreleri, makrofajlar ve inflamasyonu teşvik eden diğer bazı immün sistem hücrelerinden salgılanan bir tür sinyal molekülleridir. Bunlar arasında IL-1, IL-6, IL-12 ve IL-18, tümör nekroz faktörü alfa (*TNF- α*), interferon gama (*IFN- γ*) ve granülosit-makrofaj koloni uyarıcı faktör (*GM-CSF*) bulunur ve doğal immün tepkimeye aracılık etmede önemli bir rol oynarlar [130]. İnflamatuar sitokinler, inflammatuar yanıtı başlatmada ve doğal immün yanıtı yönlendiren patojenlere karşı konakçı savunmayı düzenlemede rol oynar. Bazı inflammatuar sitokinlerin büyüme faktörü olarak hareket etme gibi ek rolleri vardır. *TNF- α* , IL-6 ve IL-1 gibi pro-inflamatuar sitokinler ayrıca patolojik ağrıyı tetikler [131]. Aşırı kronik inflammatuar sitokin üretimi, ateroskleroz ve kanser gibi farklı hastalıklarla bağlantılı inflammatuar hastalıklara katkıda bulunur.

Proinflamatuar sitokinlerin düzensizliği depresyon ve diğer nörolojik hastalıklarla ilişkilendirilmiştir. Sağlığı korumak için proinflamatuar ve antiinflammatuar sitokinlerin bir denge içerisinde tutulması gereklidir [132].

1.3.1.1 Tümör Nekroz Faktörü-Alfa (*TNF- α*)

Tümör nekroz faktörü (*TNF*, tümör nekroz faktörü alfa, *TNF α* , kaşeksin veya kaşektin), sistemik inflamasyona katılan ve akut faz reaksiyonunu oluşturan bir hücre sinyal proteindir. Nötrofiller, NK hücreleri, CD4+ lenfositler, nöronlar, eozinofiller ve mast hücreleri gibi diğer hücrelerce üretilebilseler de, esas olarak aktive edilmiş makrofajlar tarafından üretilir [133]. İnsan *TNF* geni (*TNFA*) 1985'te klonlanmıştır. 6. Kromozomda (6p21.3) lokalize olan gen, yaklaşık 3 kilobazdan oluşur ve 4 ekzona sahiptir [134].

TNF'nin birincil görevi, immün sistem hücrelerinin regülasyonudur. *TNF*, apoptoz, yangı ve kaşeksiyi indükleyebilirken tümör oluşumunu ve virüs kaynaklı replikasyonları baskılayabilir. *TNF* üretiminin disregülasyonu, inflamatuvar barsak rahatsızlığı, sedef hastalığı, kanser ve Alzheimer da dâhil birçok hastalığa neden olabilir [135-137]. Bir inflamatuvar sitokin olan *TNF- α* , inflamasyon ve konak savunmasında temel bir rol oynar [138]. Aşırı ekspresyonu Crohn hastalığı ve ülseratif kolit gibi bazı kronik inflamatuvar hastalıklarda ve ayrıca kanserde görülür [139, 140].

Bu nedenle, anti-*TNF* antikoları, çözünen *TNF* reseptörleri (*TNFR*'ler) ve küçük molekülü inhibitörler de dahil olmak üzere anti-*TNF* terapileri ile bu tür hastalıkların tedavisi konusunda birçok çalışma bulunmaktadır [141].

TNF- α hem çözünen hem de membrana bağlı formlarda bulunur. *TNF* temel olarak kararlı homotrimerler halinde düzenlenmiş 233 amino asit uzunluğunda ve 26 kDa ağırlığında bir tip II transmembran proteini olarak üretilir [142, 143]. Bu membrana bağlı formdan, metalloproteaz *TNF- α* dönüştürücü enzim tarafından (TACE ya da ADAM17) proteolitik kleavaj yoluyla çözünebilir homotrimerik sitokin salınır [144]. Çözünebilir 51 kDa trimerik *sTNF*, nanomolar aralığın altındaki konsantrasyonlarda ayrışmaya meyleder, bu nedenle biyolojik etkinliğini kaybeder. İnsan *TNF- α* 'nın salgılanan şekli üçgen bir piramit şekline bürünür ve 17 kDa civarındadır. Hem salgılanan hem de membrana bağlı formlar biyolojik olarak aktiftirler [145].

TNF- α sinyalleri iki reseptör üzerinden hücre içi yolu uyarır. Bunlar: *TNFR1* (p55 veya *TNFRSF1A* olarak da bilinir) ve *TNFR2* (p75 veya *TNFRSF1B* olarak da bilinir). *TNFR1*, hemen hemen tüm hücrelerde ifade edilir, ancak *TNFR2* ifadesi, T-lenfositler, endotelial hücreler, oligodendrositler ve bazı nöron alt tipleri gibi belirli hücre tipleri ile sınırlıdır [124, 139].

1.3.2 ADAMTS ve Sitokinler

Sitokinler hücre içi birçok fizyolojik ve patolojik durumlarda görev alan molekülüdür. Sitokinlerin, hücrelerarası matriksi şekillendiren ADAMTS ailesi üyelerini regüle ettiği literatürde yapılan çalışmalarda mevcuttur.

ADAMTS'lerin sitokinlerce regüle edilmesi birçok patofizyolojik süreçle bağlantılı olduğundan oldukça önemlidir.

Bu bağlamda literatüre bakıldığında; Vázquez ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışma, *ADAMTS*-1 ve -8'in, endotel hücreleri üzerindeki hem Fibroblast Büyüme Faktörü-2 (FGF-2) hem de Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü (VEGF) kaynaklı anjiyojenik etkileri baskıladığını ortaya koyarken, aynı zamanda *ADAMTS*-1 ve -8'in fibroblastlar veya düz kas hücreleri üzerinde aynı anjiyo inhibitör aktiviteye sahip olmadığını da göstermiştir [64].

Bir diğer çalışmada ise *ADAMTS*-1'in VEGF₁₆₅ ile etkileşime girdiği ancak büyüme faktörünü kleavaj etmediği gösterilmiştir, bu da inhibitörsel etkinin, VEGF'yi hücre reseptöründen ayırmak suretiyle gerçekleştirildiği belirlenmiştir [146].

ADAMTS ailesi üyeleriyle ilgili yapılan bir diğer çalışmada ise Bevitt ve arkadaşları *ADAMTS*-3 geninin oküler hücre tiplerindeki (ARPE-19) ekspresyonunu belirlemek üzerine çalışmışlardır. Bu çalışmada *TNF-α* sitokini uygulanmış ve uygulanmamış ARPE-19 hücrelerinden RT-PCR ile elde edilen sonuçlar, *ADAMTS*-3 geninin ARPE-19 hücrelerinde eksprese olduğunu ortaya koymuştur [147].

İnsan kıkırdak eksplantlarında ve kondrositlerinde, hem *ADAMTS*-4'ün hem de *ADAMTS*-5'in susturulması, agrekan parçalanmasının zayıflamasına neden olur bu da her iki enzimin de insan dokularında rol oynayabileceğini göstermektedir. Bu iki enzimin ekspresyonunun, dokularda agrekan parçalanmasına neden olan İnterlökin-1 (IL-1) ve Oncostatin-M (OSM) gibi sitokinlerle arttırılabileceği öne sürülmüştür [148].

Beristain ve arkadaşları *ADAMTS*-12'nin, hem $\alpha\beta 3$ integrin heterodimer fonksiyonunu ve ifadesini düzenleyerek hücre invazyonunu düzenlediğini ve hem de *ADAMTS*-12'nin Transforme Edici Büyüme Faktörü-1 β (TGF-1 β) ve İnterlökin-1 β 'nin (IL-1) *in vitro* seviyesini etkileyerek trofoblast invazyonunu kontrol ettiğini ortaya koymuşlardır [149].

2006 yılında yapılan bir çalışmada, insan pre-adiposit hücrelerine *TNF-α* uygulaması yapılmıştır. Bu uygulama sonucunda *TNF-α*'nın *ADAMTS*-1 geninin protein seviyesindeki ekspresyonunu azaltıcı yönde etki ettiği gösterilmiştir [150].

Demircan ve arkadaşları OUMS-27 hücrelerine ve insan kondrosit hücrelerine IL-1 β ve/veya *TNF- α* uygulayarak *ADAMTS-1*, -4, -5, -8 ve -9 genlerinin mRNA seviyesindeki değişimlerini gözlemlemişlerdir. Bu bağlamda *ADAMTS-4*, -5 ve -9 genlerinin mRNA düzeyindeki ekspresyonunun IL-1 β sitokini varlığında arttığını ortaya koyarken, *ADAMTS-1* ve -8 genlerinin ekspresyon düzeylerini etkilemediğini gözlemlemişlerdir. Bunun yanı sıra iki pro-inflamatuvar sitokinin (IL-1 β ve *TNF- α*) birlikte kullanılması durumunda ise *ADAMTS-9* geninin mRNA düzeyindeki ekspresyonunun sinerjistik bir şekilde artış gösterdiğini belirlemişlerdir [151].

Cross ve arkadaşları ise Transforme Edici Büyüme Faktörü β 1'in (TGF β 1) stromal hücrelerde *ADAMTS-1*, -5, -9 ve -15'in transkripsiyonunu azaltırken *ADAMTS-4*'ün transkripsiyonunu arttırdığını bulmuşlardır [99].

Song ve arkadaşları, agrekanaz-1 (*ADAMTS-4*), agrekanaz-2'nin (*ADAMTS-5*) veya her ikisinin de susturulması durumunda, *TNF- α* ve Oncostatin M ile uyarılan insan kıkırdağındaki agrekan degradasyonunun azaldığını göstermişlerdir [152].

Naito ve arkadaşları 2007 yılında yapmış oldukları çalışmada *ADAMTS-4*'ün ifadesinin, kültüre edilmiş insan kondrositlerinde IL-1 ve *TNF- α* gibi pro-inflamatuvar sitokinlerle indüklendiğini ya da stimüle edildiğini göstermişlerdir [153].

Hunt ve arkadaşları, bir pro-inflamatuvar sitokin olan IL-1 β ve bir anti-inflamatuvar sitokin olan TGF- β 'nın inflamasyonla ilişkili bir gen olan *ADAMTS-1*'in DSC hücrelerindeki gen ifadesini incelemişlerdir. Bu inceleme neticesinde IL-1 β 'nın *ADAMTS-1* geninin protein ve mRNA seviyelerindeki ekspresyonlarını indüklediğini, TGF- β 1 sitokininin ise bu ifadeyi baskıladığını ortaya koymuşlardır [154].

Wachsmuth ve arkadaşları ise, normal ve OA kondrositlerinde *ADAMTS-1* gen ifadesi seviyesine IL-1 β 'nın ve IGF-1'in etkisini *in vivo* ve *in vitro* olarak incelemişlerdir. Bu inceleme sonucunda IL-1 β uygulanmış örneklerde *ADAMTS-1* geninin mRNA düzeyindeki ekspresyonunun azaldığı, IGF-1 uygulaması yapılmış hücrelerde ise *ADAMTS-1* gen ifadesi seviyesinde anlamlı değişikliklerin meydana gelmediğini belirlemişlerdir [155].

Xue ve ekibi 2013 yılında yapmış oldukları çalışmada *TNF- α* 'nın OA kondrositlerinde *ADAMTS-4*'ün ekspresyonunu ve promotör aktivitesini indüklediğini ve bu indüklemenin zamana ve doza bağlı olarak gerçekleştiğini bulmuşlardır. Bunun yanı sıra *TNF- α* indüklemesinin hangi yolak üzerinden gerçekleştiğini tespit etmek için de *TNF* reseptör 1 (*TNFR1*) inhibitörü SPD304 ve farklı kinaz inhibitörleri uygulamışlar ve bu uygulama sonucunda *TNFR1* ve MAPK yolağının baskılandığını ve buna bağlı olarak da *TNF- α* aracılı *ADAMTS-4*'ün ekspresyon ve aktivitesinin azaldığını tespit etmişlerdir [156].

Wang ve arkadaşları Vasküler Düz Kas Hücrelerine belirli doz ve zaman aralıklarında pro-inflamatuvar ve anti-inflamatuvar sitokinler uygulayarak *ADAMTS-7* geninin mRNA ve protein düzeyindeki ekspresyonunu araştırmışlardır. Bu araştırma sonucunda *ADAMTS-7* geninin ekspresyonunun pro-inflamatuvar sitokinler olan *TNF- α* , IL-1 β ve PDGF-BB ile indüklendiği bulunurken, bir anti-inflamatuvar sitokin olan TGF- β uygulandığında ise azaldığı ve bu değişimin zamana ve doza bağımlı olarak gerçekleştiği bulunmuştur [157].

Wei ve arkadaşları 2018 yılında fareler üzerinde yapmış oldukları çalışmada *ADAMTS-12* genini delesyona uğratarak Kollajen ile İndüklenen Artrit (CIA) modeli oluşturup pro ve anti inflamatuvar sitokinlerle olan ilişkisini incelemişlerdir. Bu inceleme sonucunda *ADAMTS-12*'nin, pro-inflamatuvar Bağ Dokusu Büyüme Faktörü (CTGF) ile etkileşime girerek inaktive ettiğini ve böylelikle inflamatuvar artrit karşı koruma sağladığını ortaya koymuşlardır. Ayrıca *ADAMTS-12* geninin delesyona uğratılması durumunda, pro-inflamatuvar sitokinlerin up-regüle, anti-inflamatuvar sitokinlerin ise azaldığı ve MAPK ve NF- κ B sinyalizasyon yolaklarının da daha etkin hale geldiğini tespit etmişlerdir [158].

1.4 Transkripsiyonel Regülasyon

Moleküler biyoloji ve genetikte transkripsiyonel regülasyon; bir hücrenin, DNA'nın RNA'ya dönüşümünü kontrol ederek genin aktivitesini düzenlediği yoldur. Bir gen, transkribe edilen RNA kopyalarının sayısının değiştirilmesinden, genin ne zaman transkribe edildiğinin zamansal kontrolüne kadar çeşitli şekillerde düzenlenir.

Bu kontrol, hücre veya organizmanın, çeşitli hücre içi ve hücre dışı sinyallere cevap vererek bir tepki oluşturmasını sağlar. Buna örnekler arasında, bir gıda kaynağındaki değişime adapte olmak için enzimleri kodlayan mRNA'nın üretilmesi, hücre döngüsünün spesifik aktivitelerinde yer alan gen ürünlerinin üretilmesi ve evrimsel gelişim biyolojisinde incelenen çok hücreli ökaryotlarda hücrel farklılaşmadan sorumlu gen ürünlerinin üretilmesi bulunmaktadır [159].

Transkripsiyonun düzenlenmesi tüm canlı organizmalarda hayati bir süreçtir. Transkripsiyonel regülasyon, transkripsiyon faktörleri ve çeşitli mekanizmalarla üretilen RNA miktarını hassas bir şekilde ayarlamak için çalışan diğer proteinler tarafından yönetilir. Prokaryotik ve ökaryotik organizmalar, transkripsiyon üzerinde kontrolü sağlamada çok farklı stratejilere sahiptirler ancak bazı önemli özellikler bakımında benzerlik gösterirler. Bu benzerliklerden en önemlisi, herhangi bir genin muhtemelen transkripsiyonu kontrol etmek için belirli bir faktör kombinasyonu ile kontrol edildiği “birleşimsel kontrol” fikridir. Hipotetik bir örnekte, A ve B faktörleri, A ve C faktörlerinin kombinasyonundan farklı bir gen setini düzenleyebilir.

Bu birleştirici yapı, ikiden fazla proteinin komplekslerine kadar uzanır ve tüm hücrenin transkripsiyonel programını kontrol etmek için genomun çok küçük bir alt kümesine izin verir [159].

1.4.1 Ökaryotik Transkripsiyonel Regülasyon

Ökaryotik transkripsiyonel regülasyon oldukça karmaşık bir süreçtir. Ökaryotların Pol I, Pol II ve Pol III olarak bilinen üç RNA polimerazı vardır. Bunların yanı sıra mitokondri ve kloroplastların da kendi polimerazları mevcuttur. Polimeraz I, ribozomal RNA'nın transkripsiyonundan sorumludur; polimeraz II, mRNA'nın transkripsiyonundan sorumludur ve polimeraz III, tRNA, 5 S rRNA ve bazı küçük özel RNA'ların transkripsiyonundan sorumludur. Buradan da anlaşılacağı üzere her polimerazın belirli hedefleri ve aktiviteleri vardır ve bağımsız mekanizmalar tarafından düzenlenir [160]. Polimeraz aktivitesinin kontrol edilebildiği çok sayıda ek mekanizma vardır. Bu mekanizmalar genellikle üç ana alanda gruplandırılabilir:

Polimerazın gene erişimi üzerindeki kontrol. Bu kontrol belki de üç kontrol mekanizmasının en büyüğüdür ve histon remodeling enzimlerinin fonksiyonlarını, transkripsiyon faktörlerini, enhansır ve represörleri ve diğer birçok kompleksi içerir.

RNA transkriptinin prodüktif uzaması. Bir RNA polimeraz promotore yerleştirildiğinde, bir sonraki transkripsiyon aşaması olan ve yeni nükleotitlerin eklenmesiyle RNA iplikçiklerinin uzadığı “uzama” aşamasının kontrolü sağlanır [161].

Polimerazın sonlandırılması. RNA transkriptinin kaderini belirleyecek sonlandırmanın nasıl ve ne zaman gerçekleşeceği kontrol edilir. Bu sistemlerin üçü de hücreden gelen sinyalleri entegre etmek ve buna göre transkripsiyonel programı değiştirmek için uyum içinde çalışır.

Prokaryotik sistemlerde bazal transkripsiyon durumunun kısıtlayıcı olmadığı düşünülebilirken, ökaryotlar RNA transkriptlerini üretmek için diğer faktörlerin bir araya getirilmesini gerektiren kısıtlayıcı bir bazal duruma sahiptir. Bu fark, büyük ölçüde daha yüksek dereceli yapılar oluşturmak için DNA'yı histonların etrafına saran ökaryotik genomun kompaksiyonundan kaynaklanmaktadır.

Bu mekanizma, gen promotorünü çekirdekteki diğer faktörlerin yardımı olmadan erişilemez hale getirir. Prokaryotlardaki sigma faktörlerine benzer şekilde, genel transkripsiyon faktörleri (GTF'ler) ökaryotlarda, bütün transkripsiyon olayları için gerekli olan bir dizi faktördür. Bu faktörler, bağlanma etkileşimlerinin stabilizasyonundan ve RNA polimerazın kalıp dizisine erişmesine izin vermek için DNA sarmalının açılmasından sorumludur. Gen düzenlemesinin büyük bir kısmı, polimerazın bağlanmasını ya indükleyen ya da inhibe eden transkripsiyon faktörleri vasıtasıyla meydana gelir [162].

1.4.1.1 Transkripsiyon Faktörleri

Moleküler biyolojide bir transkripsiyon faktörü (TF) (veya sekansa özgü DNA bağlama faktörü), spesifik bir DNA sekansına bağlanarak genetik bilginin DNA'dan mesajcı RNA'ya transkripsiyon oranını kontrol eden bir proteindir [163, 164].

TF'lerin işlevi, hücre ve organizmanın yaşamı boyunca doğru hücrede doğru zamanda ve doğru miktarda ifade edilmelerini sağlamak için genleri düzenlemektir. TF grupları, hücre bölünmesini, hücre büyümesini, hücre ölümünü ve embriyonik gelişim sırasında hücre göçü ve organizasyonunu yönlendirmek ve zaman zaman hormon gibi hücre dışından gelen sinyallere yanıt vermek için koordineli bir şekilde çalışır. İnsan genomunda 2600'e kadar TF vardır. TF'ler, RNA polimerazının spesifik genlere bağlanmasını teşvik (aktivatör) veya bloke (represör) ederek, tek başlarına veya başka proteinlerle birlikte çalışırlar [165, 166].

TF'lerin tanımlayıcı bir özelliği, düzenledikleri genlere bitişik spesifik bir DNA dizisine bağlanan en az bir tane DNA-bağlanma domaini (DBD) içermeleridir [167, 168]. TF'ler, DBD'lerine göre sınıflara ayrılır [169].

Koaktivatörler, kromatin yeniden düzenleyiciler, histon asetil transferazlar, histon deasetilazlar, kinazlar ve metilazlar gibi diğer proteinler de gen regülasyonu için esastırlar fakat DNA-bağlayıcı domainleri (DBD) yoktur ve bu nedenle TF değildirler [170]. Transkripsiyon faktörleri, regüle ettikleri genlere bitişik olan DNA'nın enhansır veya promotor bölgelerine bağlanır. Transkripsiyon faktörünün aktivitesine bağlı olarak, bitişik genin transkripsiyonu artar ya da azalır. [171].

1.4.1.1.1 NF-κB Transkripsiyon Faktörü

NF-κB -nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells-, DNA'nın transkripsiyonunun, sitokin üretimini ve hücre yaşamının kontrolünü sağlayan bir protein kompleksidir. NF-κB birçok hücrede tipinde bulunur ve sitokinler, serbest radikaller, ağır metaller, ultraviyole ışınlar, okside LDL ve bakteri veya viral antijenler gibi uyaranlara hücresel tepkilerde bulunur [172-174]. NF-κB, enfeksiyona karşı immün yanıtın düzenlenmesinde anahtar rol oynar. NF-κB'nin yanlış regülasyonunun; kanser, inflamatuvar ve otoimmün hastalıklar, septik şok, viral enfeksiyon ve uygunsuz bağışıklık gelişimi ile ilişkili olduğu bulunmuştur. NF-κB'nin, aynı zamanda sinaptik plastisite ve hafıza süreçlerinde de rol oynadığı belirtilmiştir [175-179].

Geleneksel Yolak. NF- κ B, inaktif durumda iken inhibitör protein olan I κ B α ile kompleks oluşturarak sitozolde yer alır. NF- κ B'nin bu kompleksten kurtulup serbest hale geçerek aktifleşmesi için I κ B kinaz (IKK) adı verilen bir kinazın aktivasyonu gerekir. Bu aktivasyon için integral membran reseptörleri aracılığıyla, çeşitli hücre dışı sinyaller I κ B kinaz (IKK) enzimini aktive eder. IKK, katalitik IKK α ve IKK β alt birimlerinin bir heterodimerinden ve NEMO (NF- κ B temel modülatör) veya IKK γ olarak adlandırılan bir "ana" düzenleyici proteinden oluşur [180].

IKK, I κ B α 'yı NF- κ B'den ayrılması için I κ B α 'nın regülatör domaininde bulunun 2 Serin aminoasidi rezidüsünü fosforilize eder. Fosforillenen I κ B α , hemen ardından ubiquitinasyona tabi tutularak proteazom aktivitesiyle parçalanır. Böylelikle aktif hale gelmiş olan NF- κ B (p50/RelA) daha sonra çekirdeğe aktarılarak cevap elemanları (RE) adı verilen spesifik DNA dizilerine bağlanır. DNA/NF- κ B kompleksi daha sonra, downstream DNA'yı mRNA'ya transkribe eden koaktivatörler ve RNA polimeraz gibi diğer proteinleri rekrut eder. Daha sonra mRNA, bir takım reaksiyonlar ile değişime uğratılarak protein formuna çevrilir [181-183]

Alternatif Yolak. Lenfotoksin beta reseptörü, CD40, BAFF veya RANKL gibi bir hücre farklılaştırıcı veya gelişimsel uyarıcı kümesi, çekirdekte NF- κ B (p52/RelB) dimerini uyarmak için alternatif NF- κ B yolunu aktive eder. Bunun yanı sıra yapılan bazı araştırmalar bahsi geçen uyarıcı faktörlerin geleneksel yol üzerinde de aktive ettirici bir etkiye sahip olduğunu ortaya koymuşlardır [184-186].

Geleneksel yola kıyasla alternatif yol kinetik açıdan daha yavaştır. Sinyalizasyon için öncelikli olarak p52'nin prekürsörü olan p100'ün, NF- κ B indükleyici kinaz aracılığıyla aktifleşen IKK homodimeri tarafından fosforilasyona tabi tutularak olgun p52 formuna dönüştürülmesi gereklidir. Bu dönüşüm sonucu transkripsiyonel bağlamda aktifleşen NF- κ B (p52/RelB) çekirdeğe aktarılarak transkripsiyon sürecine katılması sağlanır [184-186].

1.4.1.1.2 STAT-3 Transkripsiyon Faktörü

STAT-3 (Signal transducer and activator of transcription 3) insanlarda STAT-3 geni tarafından kodlanan bir transkripsiyon faktörüdür. STAT protein ailesinin bir üyesidir [187].

STAT ailesi proteinlerinin özellikle de STAT-3'ün, hem malign transformasyonun başlangıcında hem de kanser progresyonu sırasında, prokarsinojenik bir inflamatuvar mikro-çevrenin seçici olarak indüklenmesi ve korunmasında rol oynadığı düşünülmektedir [188-190]. STAT-3'ün ayrıca, malign hücrelerde genetik değişiklikler, kimyasal kanserojenler, güneş ışığı, enfeksiyon, sigara içilmesi ve stres dahil olmak üzere birçok çevresel faktör tarafından başlatılan inflamasyonla ilişkili tümörjenezle bağlantılı olduğu tespit edilmiştir [191-194].

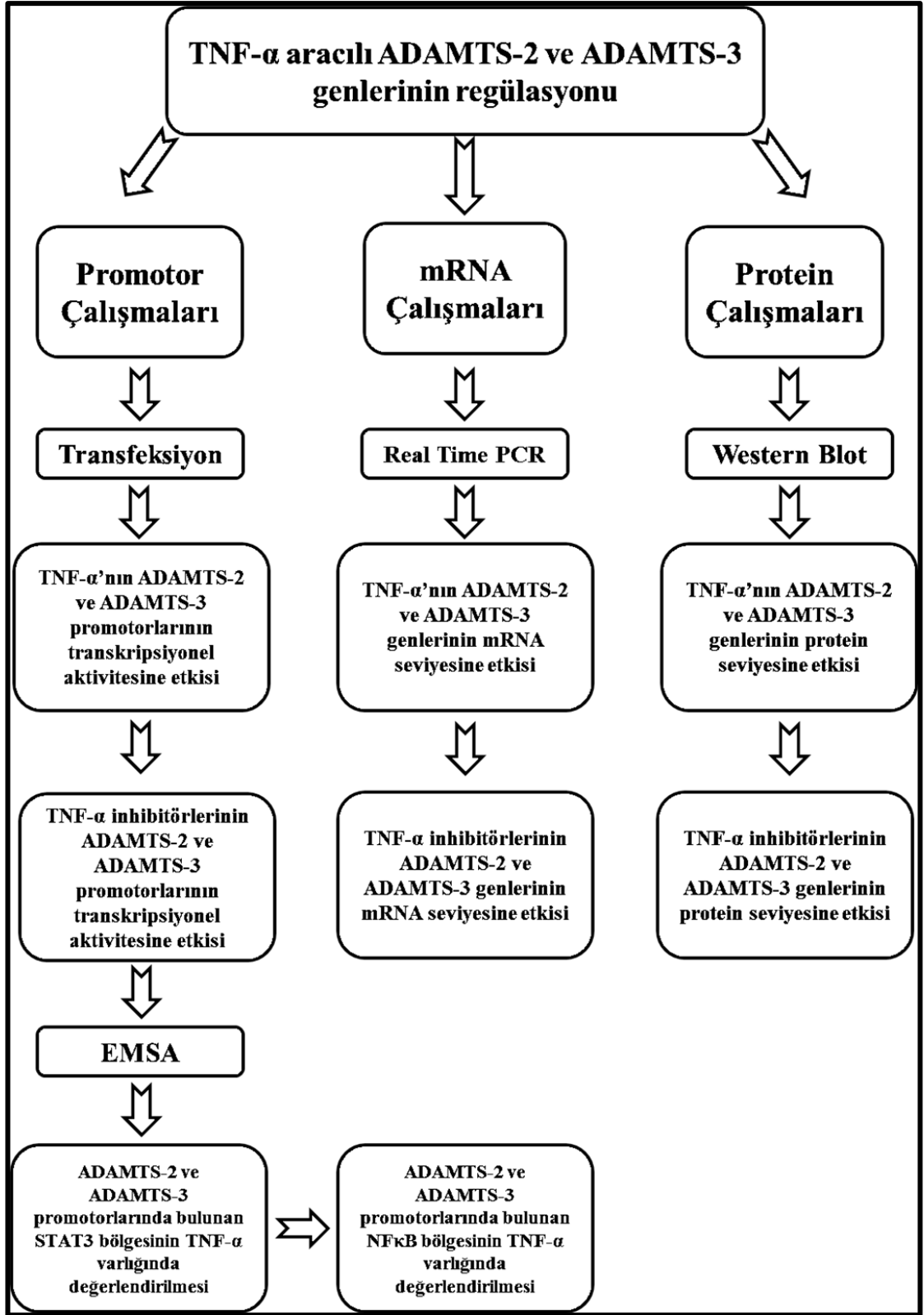
STAT-3 aktivasyonu, karşılıklı fosfotirozin-SH2 domaini etkileşimleri sayesinde STAT-3 dimerizasyonunu tetikleyen tirozin (Tyr 705) fosforilasyonu ile indüklenir [195, 196]. Multipl tirozin kinazlar, STAT-3 aktivitesinin hücre içi aktivatörleri olarak tanımlanmış olsalar bile, STAT-3'ün tirozin 705 üzerindeki fosforilasyonu esas olarak anahtar modülatör olan JAK1 tarafından düzenlenir [197]. Tirozin 705 fosforilasyonuna ek olarak, STAT-3 serin (Ser 727) fosforilasyonu yoluyla da aktive edilir. Bu fosforilasyon genel olarak protein kinaz C, mitojenle aktive edilen protein kinazlar (MAPK) ve siklin bağımlı kinazlar (CDK5) ile düzenlenir [195]. Son olarak, lisin rezidüsünde (Lys 685) histon asetiltransferaz ile STAT-3'ün tersinir asetilasyonu, STAT-3 aktivasyonunun üçüncü bir mekanizmasını temsil eder [190]. Bu aktivasyonlar neticesinde STAT-3'ün homo veya heterodimerleri oluşur ve böylelikle transkripsiyon aktivatörleri olarak etki edecekleri hücre çekirdeğine transloke olarak faaliyet gösterirler [198].

2. TEZİN AMACI

Bu tez çalışmasında temel olarak osteosarkoma hücre modelinde (Saos-2) *TNF- α* 'nın *ADAMTS-2* ve *ADAMTS-3* genlerine mRNA, protein, transkripsiyonel aktivite ve transkripsiyonel regülasyon düzeyindeki etkisinin belirlenmesi, ikinci olarak da spesifik yolak inhibitörlerinin kullanılmasıyla *TNF- α* 'nın *ADAMTS-2* ve *ADAMTS-3* mRNA ve protein düzeyindeki ekspresyonlarının yanı sıra transkripsiyonel aktivitesine olan etkisini hücre içinde hangi yol ya da yolları kullanarak gösterdiğinin aydınlatılması amaçlanmıştır.

Bu kapsamda gerçekleştirilen tez çalışmasının basamakları şu şekildedir;

- 1) İnsan kemik kanseri hücre modeli olan Saos-2 hücrelerine belirlenen doz ve zamanlara bağlı olarak uygulanan *TNF- α* 'nın *ADAMTS-2* ve *ADAMTS-3* genlerinin mRNA seviyesine olan etkisi qRT-PCR ile belirlenmesi
- 2) Osteosarkoma (Saos-2) hücrelerine belirlenen doz ve zamanlara bağlı olarak uygulanan *TNF- α* 'nın *ADAMTS-2* ve *ADAMTS-3* genlerinin protein seviyesine etkisinin western blotting ile belirlenmesi
- 3) *TNF- α* aracılı *ADAMTS-2* ve *ADAMTS-3* genlerinin regülasyonunun hücre içi sinyal iletim yollarından hangi basamakları kullanarak yürütüldüğünün yolak inhibitörleri uygulanmasıyla mRNA düzeyinde qRT-PCR ile belirlenmesi
- 4) *TNF- α* aracılı *ADAMTS-2* ve *ADAMTS-3* genlerinin regülasyonunun hücre içi sinyal iletim yollarından hangi basamakları kullanarak yürütüldüğünün yolak inhibitörleri uygulanmasıyla protein düzeyinde western blotting ile belirlenmesi
- 5) İnsan *ADAMTS-2* ve *ADAMTS-3* promotorlarının geçici transfeskiyon metoduyla transkripsiyonel aktivitesinin *TNF- α* varlığında belirlenmesi
- 6) Hücre içi sinyal iletim yolak inhibitörlerinin İnsan *ADAMTS-2* ve *ADAMTS-3* promotorlarının transkripsiyonel aktivitesine olan etkisinin belirlenmesi
- 7) İnsan *ADAMTS-2* ve *ADAMTS-3* promotorlarının EMSA deneyleriyle transkripsiyon faktörü bağlanma bölgelerinin *TNF- α* varlığında belirlenmesi



Şekil 2.1: Tez basamaklarını gösteren şema.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Materyal

3.1.1 Çalışmalarda Kullanılmış Olan Kimyasal Maddeler

Tüm tez çalışması boyunca gerçekleştirilen DNA, protein, RNA, transkripsiyonel aktivite, DNA ve protein etkileşimi, yolak inhibisyon çalışmalarında kullanılmış olan maddeler Tablo 3.1’de listelenmiştir.

Tablo 3.1: Çalışmalarda kullanılmış olan kimyasal maddeler.

Madde İsmi	Firması
DNA Esaslı Çalışmalarda Kullanılan Maddeler	
<i>Taq</i> Polimeraz	Thermo
<i>Taq</i> tampon	Thermo
MgCl ₂	Thermo
dATP, dGTP, dTTP, dCTP	Thermo
Agaroz	Sigma
6X Yükleme Boyası	Thermo
1 kb DNA Marker	Thermo
Et-Br	Sigma
RNA Esaslı Çalışmalarda Kullanılan Maddeler	
Dietil pirokarbonat (DEPC)	Sigma
GeneJET™ RNA saflaştırma kiti	Thermo Scientific
Formaldehid	Sigma Aldrich

Tablo 3.1: (devamı).

β -Merkaptoetanol	Sigma
Reverse Transkriptaz	Thermo
3-(N-morfolino) propansulfonik asid (MOPS)	Merck
5X Reaksiyon Tamponu	Thermo
Hücre Kültürü Esası Çalışmalarda Kullanılan Maddeler	
Fetal Calf Serum (Sığır Serumu)	Gibco
DMEM	Gibco, EuroClone, BI
Fosfat Tampon Tuzu (PBS)	Sigma
Sığır Serum Albumini (BSA)	Sigma
Tripan Mavisi Çözeltisi	Sigma
CaCl ₂	Sigma
Oligo DT, Ribolock İnhibitör	Thermo
DMSO	Sigma
0,22 μ m, 0,45 μ m Filtre	Sartorius
Tripsin-EDTA	Sigma
Santrifüj Tüpü (50 mL)	IsoLab
Santrifüj Tüpü (15 mL)	IsoLab
Serolojik Tek Kullanımlık Pipet (10 mL)	Sarstedt
Serolojik Tek Kullanımlık Pipet (25 mL)	Sarstedt
25 cm ² Flask	Sarstedt
75 cm ² Flask	Sarstedt

Tablo 3.1: (devamı).

Transkripsiyonel Aktivite Esaslı Çalışmalarda Kullanılan Maddeler	
Lusiferaz ve SEAP Substratları	Clontech
Lusiferaz Kiti	Clontech
HEPES	Sigma
Yolak İnhibisyonu Esaslı Çalışmalarda Kullanılan Maddeler	
MEK İnhibitörü	Sigma
Wortmannin (PI3K İnhibitörü)	Cell Signaling
SP600125 (JNK İnhibitörü)	Sigma
Bay 11-7082 (NFκB İnhibitörü)	Santa Cruz
Protein Esaslı Çalışmalarda Kullanılan Maddeler	
Tetrametiletilendiamin (TEMED)	Sigma
Amonyum Persülfat	Merck
Tris, Borik Asid, EDTA	Sigma
β-Aktin Antikoru	Sigma, Abcam
Sekonder Antikor (goat, anti-rabbit)	Abcam
Sekonder Antikor (goat, anti-mouse)	Sigma
ADAMTS-3 Antikoru	Abcam
ADAMTS-2 Antikoru	Abcam
Page Ruler Plus Prestained Protein Ladder	Thermo
ECL (Electrochemiluminescence) Kit	Thermo, Pierce

Tablo 3.1: (devamı).

DNA-Protein Etkileşimi Esaslı Çalışmalarda Kullanılan Maddeler	
Biotin 3'' Ucu DNA Etiketleme Kiti	Thermo
LightShift® Kemiluminesant EMSA Kiti	Thermo
Naylon Membran	Thermo
PVDF Membran	Milipore
Terminal Deoksinükleotidil Transferaz	Thermo

3.1.2 Çalışmalarda Kullanılmış Olan Araç-Gereçler

Çalışmada kullanılmış olan araç-gereçler Tablo 3.2’de verilmiştir.

Tablo 3.2: Çalışmada kullanılmış olan araç ve gereçlerin listesi.

Araç-Gereç İsmi	Firması
Laminar Air Flow	Telstar BIOII
Inverted Mikroskop	Nikon
-80 °C Derin Dondurucu	Thermo
Buz Makinesi	Fiocchetti Frigoriferi Scientifici
Vorteks	Elektromag
DNA Elektroforez Sistemi	Minicell Primo
Otomatik Pipetler	Thermo, Axygen
Otoklav	Hirayama
Gerçek Zamanlı PZR Makinesi	Roche
pH Metre	WTW
PZR Cihazı	Bio-rad, Techne Progene

Tablo 3.2: (devamı).

Saf Su Cihazı	Thermo, Comecta Sa
Elektroforez için güç kaynağı	Elektromag
Luminometre	Thermo
Yatay Çalkalayıcı	GFL
Dikey Çalkalayıcı	Thermo
SDS Page Aparatları	Bio-rad
Isı Kontrollü Çalkalamalı İnkübatör	GFL
Termal blok	FALC
Spektrofotometre	Thermo
Soğutmalı Santrifüj	Sigma
Santrifüj	Hettich Zentrifugen
İnkübatör	WTB, German, Nüve
Isıtmalı Manyetik Karıştırıcı	Velp Scientifica
RNA Elektroforez Sistemi	Apelex
Jel Görüntüleme Sistemi	Bioimaging Systems

3.2 Yöntem

3.2.1 Deney yapılan ortamın ve deneylerde kullanılmış olan maddelerin steril hale getirilmesi

Çalışmada kullanılan ve yüksek sıcaklığa dayanıklı olan tüm cam malzemeler, santrifüj tüpleri, ependorflar ve pipet uçları 121 °C’ de 20 dakika boyunca otoklav cihazında steril hale getirildi. Otoklavı gerçekleştirilmiş olan malzemeler 80 °C sıcaklıktaki etüvde kurutuldu.

Hücre kültürü çalışmalarında laminar flow ve inkübatör, Sodyum Hipoklorit (Çamaşır Suyu), % 70'lik Etil alkol ve % 1'lik Biocon-A ile temizlendi. Çalışmanın yapılmadığı zamanlarda kültür odası ve laminar flow UV ışığına maruz bırakılarak ortamın sterilize halde kalması sağlandı. Ayrıca RNA esaslı çalışmalarda yukarıda belirtilen temizleme solüsyonlarına ek olarak ortam ve mikropipetler DEPC'li su ile temizlendi.

3.2.2 Hücre Kültürü Esaslı Çalışmalarda Kullanılan Metotlar

3.2.2.1 Hücre Kültürü Çalışmalarında Kullanılmış Olan Malzemeler

3.2.2.1.1 Kültür Medyumunun Hazırlanması

Çalışmalarda kullanılan hücreler çeşitli ticari firmalardan temin edilen ve yüksek glikoz ve 0.2 mM oranında L-Glutamin içeren DMEM (Dulbecco's Modified Eagles Medium) kullanılarak büyütüldü. DMEM'in içerisine steril halde temin edilen FCS (Fetal Calf Serum) %10 oranında eklendi. Bahsi geçen malzemelere ek olarak % 1'lik son konsantrasyonda olacak şekilde antibiyotik eklenerek çalışmalar gerçekleştirildi.

3.2.2.1.2 FCS'nin Hazırlanması

Ticari olarak Gibco firmasından steril olarak temin edilen FCS; -20 °C'de muhafaza edilip, soğuk zincirle taşınarak +4 °C'de eritildi. Eritme işleminin ardından 56 °C'ye ısıtılmış su banyosunda 1 saat bekletilerek inaktive olması sağlandı ve ardından küçük hacimlere paylaştırılarak sonraki deneylerde kullanılmak üzere -20 °C'de saklandı.

3.2.2.1.3 PBS'nin Hazırlanması

Ticari olarak Sigma'dan temin edilen PBS tabletleri, 100 mL için 1 tablet olacak şekilde saf su içerisinde çözülerek 121 °C'de 20 dakika otoklav yapıp sterilize edildikten sonra +4 °C'de saklandı.

3.2.2.1.4 Tripsin-EDTA'nın (TE) Hazırlanması

TE solüsyonu, 1 X PBS içerisinde 0.5 mM EDTA ve % 0.05 Tripsin'in çözülmesiyle hazırlandı. Çözülme işleminin ardından 121 °C'de 20 dakika otoklav yapıp sterilize edilerek +4 °C'de saklandı

3.2.2.1.5 Hücre Kültürü Çalışmalarında Kullanılan Hücre Hattı

Tez kapsamında kullanılan Saos-2 (İnsan Kemik Kanseri) hücre modelinin temini Dr. Deborah Mason ve Dr. Kenneth Wann'dan (Cardiff Üniversitesi-İngiltere) gerçekleştirildi.

3.2.2.2 Hücre Hattının Başlatılması

Hücre hattını başlatma işlemi yapılmadan önce Bölüm 3.2.1'de açıklandığı biçimde ortam ve kullanılacak malzemelerin temizliği yapıldı. -80 °C derin dondurucuda daha öncesinde muhafaza edilmiş olan hücreler alınarak, 37°C'ye ısıtılmış su banyosunda eritilip Bölüm 3.2.2.1.1'de açıklandığı biçimde hazırlanan FCS+DMEM karışımının içerisine alındı. DMSO ve ölü hücreleri ortamdaki uzaklaştırmak için 5 dakika süreyle 1000 rpm'de santrifüj yapıldı. Santrifüj sonrası oluşan üst kısım ortamdaki uzaklaştırıldı. Pellet 2 mL FCS+DMEM karışımında çözülerek, daha öncesinde içerisine 13 mL FCS+DMEM eklenmiş 75 cm²'lik flaska alınıp, etiketlemesi yapıldı. Büyümeye bırakılmak üzere 37 °C'deki %5'lik CO₂ inkübatörüne kaldırıldı.

3.2.2.3 Hücre Hattının Pasajlanması

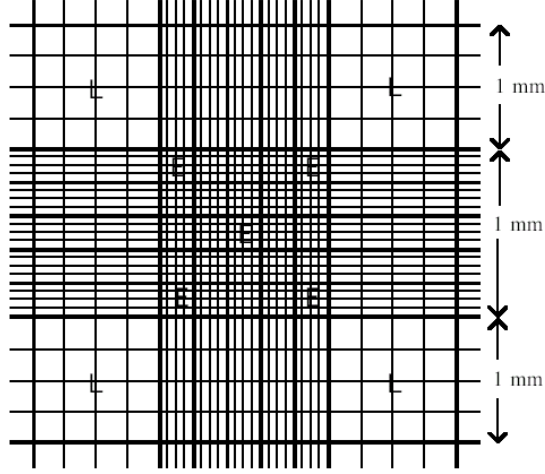
Hücreler buldukları flaskın yüzeyini büyük oranda (%80-90) doldurduktan sonra hücrelerin içinde buldukları FCS+DMEM karışımı uzaklaştırıldı. Daha sonra PBS ile yıkama işlemi yapıp PBS uzaklaştırıldı. Hücreleri buldukları yüzeyden koparmak amacıyla 25 cm² flasklar için 1 mL, 75 cm² flasklar içinse 2.5 mL Tripsin-EDTA (TE) kullanılarak hücrelerin yüzeyden ayrılması sağlandı. Tripsin-EDTA'nın aktivitesini inaktive etmek için, kullanılan TE miktarının iki katı kadar FCS+DMEM karışımından eklenerek TE'nin inaktivasyonu sağlandı. Hücreler santrifüj tüplerine alınarak 5 dakika süreyle 1000 rpm'de santrifüj yapıldı. Santrifüj sonrası oluşan üst kısım ortamdan uzaklaştırıldı. Pellet bölünecek her flask için 2'şer mL FCS+DMEM karışımında çözülerek, daha öncesinde içerisine 13 mL FCS+DMEM eklenmiş 75 cm²'lik flaska alınıp, etiketlemesi yapıldı. Büyümeye bırakılmak üzere 37 °C'deki %5'lik CO₂ inkübatörüne kaldırıldı.

3.2.2.4 Canlı Hücrelerin Tespit Edilmesi

Canlı hücrelerin tespiti ve sayılarının belirlenmesi için Thoma Lamı (Hemositometre) (Şekil 3.1) adı verilen, üzerinde 25 küçük karenin bulunduğu ve 1 mm² alan ile 0.1 mm derinliğe sahip özel bir lam kullanıldı. Canlı hücrelerin tespiti için hücreler Bölüm 3.2.2.3'de açıklandığı biçimde flasklara bölme aşamasına kadar getirildi. Daha sonra tüm hücreler toplamda 10 mL FCS+DMEM karışımında çözülmüş olacak şekilde süspansiyon hale getirildi. İyi pipetaj yapılarak homojenizasyon sağlandı. Pipetaj sonrası hücre süspansiyonunun 1 mL'si temiz bir ependorfa alındı. Daha sonra yine temiz bir ependorfa, içerisine 10 mL'lik hücre süspansiyonundan 1 mL ayrılmış olan ependorftaki hücre karışımından 10 µL ve Tripan Mavisi Boyasından 10 µL (1:1 oranında) alınarak boyandı. Ölü hücreler Tripan Mavisi Boyasını absorbe edeceği için mavi boyanırken, canlı hücreler boyanmadı. Daha sonra alanda bulunan hücreler sayılarak aşağıdaki formüle göre hesaplaması yapıldı.

Bir mililitredeki hücre sayısı:

$$\text{Total canlı olan hücre adedi/mL} = \text{Thoma Lamındaki hücre adedi} \times 2 \times 10^4 \quad (3.1)$$



Şekil 3.1: Hemositometre

3.2.2.5 Hücrelerin Dondurulması

Hücreler Bölüm 3.2.2.3’de açıklandığı biçimde flasklara bölme aşamasına kadar getirildi. Üst kısım uzaklaştırıldı. Hücre pelletine FCS ve % 10 DMSO eklenerek süspansiyon haline getirildi. Cryovial tüplerine konularak etiketlenmesi yapılarak -80 °C’de muhafaza edildi.

3.2.3 RNA Esaslı Çalışmalarda Kullanılan Metotlar

3.2.3.1 Sitokin Deneylerinin Kurulması

Hücreler, hücre kültürü çalışmaları amacıyla kültüre edildi. Hücrelerin sağlık durumları kontrol edildikten sonra Bölüm 3.2.2.4’de açıklandığı biçimde hücre sayımı yapıldı. Hücreler, 25 cm²’lik flasklara 5 mL FCS+DMEM ve 2 000 000 hücre olacak biçimde paylaştırılıp büyütülmek üzere inkübatöre kaldırıldı. Ertesi gün hücrelerin yüzeye tutunup, tutunmadıkları kontrol edildikten sonra FCS+DMEM karışımını uzaklaştırılarak, flasklara % 0.1 oranında BSA ihtiva eden DMEM eklendi. 1 saat BSA’lı DMEM’de bekletilen hücrelere 10 ng/mL olacak biçimde *TNF-α* sitokini uygulandı. 1, 3, 6, 24 ve 48. saatlerde hücre pelletleri alındı.

3.2.3.2 Yolak İnhibisyon Deneylerinin Kurulması

Hücreler, hücre kültürü çalışmaları amacıyla kültüre edildi. Hücrelerin sağlık durumları kontrol edildikten sonra Bölüm 3.2.2.4’de açıklandığı biçimde hücre sayımı yapıldı. Hücreler, 25 cm²’lik flaslara 5 mL FCS+DMEM ve 2 000 000 hücre olacak biçimde paylaştırılıp büyütölmek üzere inkübatöre kaldırıldı. Ertesi gün hücrelerin yüzeye tutunup, tutunmadıkları kontrol edildikten sonra FCS+DMEM karışımı uzaklaştırılarak, flaslara % 0.1 oranında BSA ihtiva eden DMEM eklendi. 1 saat BSA’lı DMEM’de bekletilen hücrelere Tablo 3.3’de belirtilen son konsantrasyonlarda yolak inhibitörleri uygulandı. İnhibitör uygulamasının ardından 10 ng/mL olacak biçimde *TNF-α* sitokini uygulandı ve 6 saat sonunda 1000 rpm’de 5 dakika santrifüj yapılarak pellet alındı.

Tablo 3.3: Yolak inhibisyon çalışmalarında kullanılan inhibitörler ve konsantrasyonları.

İnhibitör	Son Konsantrasyon
MEK İnhibitörü	10 µM
PI3K İnhibitörü (Wortmannin)	1 µM
JNK İnhibitörü (SP600125)	20 µM
NFκB İnhibitörü (BAY 11-7082)	5 µM

3.2.3.3 RNA İzolasyonunun gerçekleştirilmesi

İzolasyonun gerçekleştirileceği alan ve izolasyon esnasında kullanılacak malzemeler bir RNAz inhibitörü olan DEPC’li su ile temizlendi. Bölüm 3.2.3.1 ve Bölüm 3.2.3.2’de açıklandığı biçimde pellet haline getirilip -80 °C’deki derin dondurucuya kaldırılan örnekler dolaptan çıkarılıp buz üzerinde eritildikten sonra PBS ile yıkandı. Yıkama işleminin ardından RNA izolasyonu Thermo firmasının bir ürünü olan GeneJET RNA Purification Kit ile kit protokolüne uygun bir şekilde gerçekleştirildi. İzole edilen RNA miktarı belirlendikten sonra örnekler daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere -80 °C dolaba kaldırıldı.

3.2.3.4 RNA Miktarının belirlenmesi

RNA izolasyonu gerçekleştirilen örneklerin RNA miktarları ve saflıklarının belirlenmesi amacıyla Spektrofotometre ve $\mu\text{Drop}^{\text{TM}}$ Plate kullanıldı. Spektrofotometrede yapılan ölçümlerde kör olarak 200 μL dH_2O kullanılırken, RNA ölçümü yapılacak örneklerde bu miktar 195 μL dH_2O ve 5 μL izole RNA olacak şekilde kullanıldı. Saflıklarının belirlenmesi amacıyla da 260 ve 280 nm’lerde absorbans ölçümü alındı. Miktar tayini ve saflık analizi aşağıda belirtilen formüllere göre yapıldı.

$$\text{RNA miktarı} = A_{260} \times \text{sulandırma katsayısı} \times 40 \text{ ng}/\mu\text{L} \quad (3.2)$$

$$\text{Saflık} = A_{260} / A_{280} \quad (3.3)$$

Işık yolunun Spektrofotometreye (10 mm) kıyasla daha kısa olması sebebiyle ölçüm için daha az RNA’nın kullanıldığı $\mu\text{Drop}^{\text{TM}}$ Plate (0.49 mm) daha avantajlıdır. Ayrıca $\mu\text{Drop}^{\text{TM}}$ Plate kullanılırken örnek sulandırma işlemine gerek duyulmadan kullanılabilir. $\mu\text{Drop}^{\text{TM}}$ Plate’de miktar ve saflığı formül aşağıdadır.

$$\text{RNA miktarı (ng}/\mu\text{L)} : A_{260} \times 50 \text{ ng}/\mu\text{L} \times (10 \text{ mm} / 0,49 \text{ mm}) \quad (3.4)$$

3.2.3.5 RNA Jel Elektroforezi

İzole edilen RNA örneklerinin jelde görüntülenmesi amacıyla Formaldehit jel elektroforezi gerçekleştirildi. Öncelikli olarak jelin yürütüleceği tank ve yürütmede kullanılacak aparatlar DEPC’li su, %0.5’lik SDS ve %100’lük saf etanol ile temizlenerek yüksek sıcaklıktaki etüvde kurumaya bırakıldı. Jel oluşturmak için 50 mL DEPC’li su ve 5 mL 10X FA (Tablo 3.4) içerisine 0.5 g agaroz eklenerek tartılıp, jel tamponundan eklenerek mikrodalga fırında kaynatıldı ve buhar kayboluncaya dek soğumaya bırakıldı. Ilık hale geldikten sonra içerisine 1 μL Etidyum Bromür ve 900 μL Formaldehit eklenerek kasete döküldü ve jel donmaya bırakıldı. Donma işlemi gerçekleştirildikten sonra yürütme tankına 1X FA (Tablo 3.5) tamponu eklenerek kaset yerleştirme işlemi gerçekleştirildi. RNA örnekleri 3 μL RNA + 3 μL 2X yükleme boyası olacak biçimde hazırlandı ve 70 °C’de 10 dakika boyunca ısı ile denatürasyon yapıldı.

Denatüre edilen örnekler daha sonra 10 dakika buz üzerinde bekletildi. Daha sonra jele yüklenen örnekler 90 Voltta yürütülerek ve UV ışığı ile görüntülendi.

Tablo 3.4: 10X FA jel tamponu bileşenleri.

10 X FA Tamponu	Stok Sol.	Son Konsantrasyon (10 X)
MOPS (pH:7)	1 M	0.2 M
EDTA (pH:8)	0.5 M	0.05 M
NaAc	1 M	0.01 M
Tampon DEPC'li su kullanılarak ve pH: 7.0'ye ayarlanarak hazırlandı. Hazırlanan solüsyon otoklavlanıp steril edilerek kullanıldı.		

Tablo 3.5: 1X FA jel tamponu bileşenleri.

FA Tank Tamponu	Son Konsantrasyon
10 X FA Jel Tamponu	1 X
% 37'lik (12.3 M) Formaldehit	0.25 M
DEPC'li dH ₂ O	1 L'ye tamamlandı.

3.2.3.6 cDNA Sentezi ve RT-PCR

İzole edilen RNA'lardan konsantrasyonu 1 µg'a karşılık gelecek hacimlerde alınıp *Reverse Transkriptaz* enzimi yardımıyla cDNA eldesi gerçekleştirildi. Reaksiyon Tablo 3.6'da belirtilen koşullarda gerçekleştirildi. Daha sonra elde edilen cDNA'nın 1µL'si İnsan β 2 primerleriyle gerçekleştirilen kontrol PCR'ında kullanılarak cDNA kalitesi tespit edildi.

Tablo 3.6: RT-PCR koşulları.

Reaksiyon Bileşenleri	Son konsantrasyon
RNA Kalıp	1 µg
dH ₂ O	X µL
Oligo dT	200 pmol
Son hacim	12.5 µL
65 °C'de 5 dakika	
5X Reaksiyon Tamponu	1 X
dNTP Miks	1 mM
Ribolock RNAz İnhibitör	20 U/µL
Reverse Transkriptaz	10 U/µL
Son hacim	20 µL
42 °C'de 60 dakika	
70 °C'de 10 dakika	

3.2.3.7 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction)

Reverse Transcriptase enzimiyle elde edilen cDNA'ların kalitesini agaroz jelde yürütüp görüntülemek amacıyla İnsan β -2 mikroglobulin geni primerleri kullanılarak polimeraz zincir reaksiyonu (PZR-PCR) gerçekleştirildi. Bu reaksiyona ait koşullar Tablo 3.7'de gösterilmiştir.

Tablo 3.7: Polimeraz Zincir Reaksiyonu Koşulları.

Bileşenler	Deney Grubu	Pozitif Kontrol	Negatif Kontrol
Kalıp cDNA	1 µL	1 µL	-
MgCl ₂	4 µL	4 µL	4 µL
dNTP Miks	1 µL	1 µL	1 µL
<i>Taq</i> Tamponu	5 µL	5 µL	5 µL
İleri Primer	1 µL	1 µL	1 µL
Geri Primer	1 µL	1 µL	1 µL
<i>Taq</i> Polimeraz	0.5 µL	0.5 µL	0.5 µL
dH ₂ O	36.5 µL	36.5 µL	37.5 µL
Son Hacim	50 µL	50 µL	50 µL

3.2.3.8 Agaroz Jel Elektrofrez

PCR ürünlerinin akım yardımıyla yürütülüp, görüntülenmesinin sağlandığı bir yöntemdir. Bu bağlamda %1 Agaroz içeriğine sahip jel hazırlandı. Jel hazırlamak için 0.75 g Agaroz tartılıp 75 mL 0.5 X TBE tamponunda mikrodalga fırın kullanılarak çözündürülüp homojen hale getirildi. Kaynatılan jelin ısısı oda sıcaklığına gelince içerisine son konsantrasyon 0.5 µg/mL olacak biçimde Etidyum Bromür eklendi. İyiye karıştırıldıktan sonra daha öncesinde tarakları takılarak hazırlanmış olan jel kasetine dökülerek polimerleşmeye bırakıldı. Jel kaseti elektroforezin yapılacağı tanka yerleştirilerek elektroforez tankı 0.5 X TBE tamponu ile dolduruldu. Polimerleşen jelde kuyucuk oluşumuna sebep olan taraklar jelden çıkartıldı. Örnekler 6 X yükleme boyası ile karıştırılarak jele yüklendi. Daha sonra 90 Voltta 40 dakika yürütülerek jel görüntüleme cihazında görüntülenip fotoğraflanması yapıldı.

3.2.3.9 Gerçek zamanlı PZR

Gerçek zamanlı PZR tekniği Roche Diagnostic'in Light Cycler 485 isimli cihazı kullanılarak gerçekleştirildi. Reaksiyon bileşenleri Tablo 3.8'de verilmiştir. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu tekniği kontrol, sitokin ve yolak inhibisyon çalışmalarından elde edilen her bir cDNA için üç tekrara sahip olacak şekilde tasarımılandı. Çalışmada *ADAMTS-2* ve *ADAMTS-3* genlerinin yanı sıra İnsan Beta 2 Mikroglobulin geni de normalizatör olarak kullanıldı. Çalışmada kullanılan primerler ve çalışmanın yürütüldüğü döngü koşulları sırasıyla Tablo 3.9'da ve Tablo 3.10'da verilmiştir.

Tablo 3.8: Gerçek Zamanlı PZR Bileşenleri.

Bileşenler	Hacim
SYBR [®] Green PCR Master Mix	5 µL
cDNA	1 µL
İleri Primer (100 ng/µL)	0.5 µL
Geri Primer (100 ng/µL)	0.5 µL
dH ₂ O	3 µL
Toplam Hacim	10 µL

Tablo 3.9: Çalışmada Kullanılan Ekspresyon Primerleri

Hβ-2 Forward	5' TTTCTGGCCTGGAGGCTATC 3'
Hβ-2 Reverse	5' CATGTCTCGATCCCACTTA ACT 3'
<i>ADAMTS-2</i> Forward	5' CTGTGGCGACGAGGTGCG 3'
<i>ADAMTS-2</i> Reverse	5' GGTGCACACATAGTCCCGTCC 3'
<i>ADAMTS-3</i> Forward	5' GGAACACTGCACCAACCT 3'
<i>ADAMTS-3</i> Reverse	5' TGTCTCCCAAACATGGTTCA 3'

Tablo 3.10: Gerçek Zamanlı PZR Döngü Şartları.

Basamak	Döngü	Sıcaklık	Zaman
1	1	95 °C	10 dk
2	x35	95 °C	10 sn
		55 °C	15 sn
		72 °C	10 sn
3	1	72 °C	1 dk

3.2.3.10 Gerçek zamanlı PZR Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Gerçek Zamanlı PZR sonuçları Livak yöntemi kullanılarak değerlendirilmiştir [199]. *ADAMTS-2* ve *ADAMTS-3* genlerinin elde edilmiş olan Cycle threshold değerleri ile normalizatör olarak kullanılan İnsan Beta 2 mikroglobulin geninin Cycle threshold değerlerinin ortalamasının farkı alındı. Çıkarma işlemi sonucunda ulaşılan değer, iki tabanındaki kuvvet değeri hesaplandı. Herhangi bir sitokin ya da inhibitör uygulanmamış olan kontrol gruplarının değeri ‘bir’ birim olarak alındı. Deney gruplarının değeri kontrol grubunun değerine bölünerek ‘bir’in katı olacak şekilde sonuçlar alındı. Elde edilen sonuçların istatistiksel analizleri MiniTab (One Way ANOVA) programıyla yapıldı. $p \leq 0.05$ olduğu durumların istatistiksel bakımdan anlamlı değer taşıdığı belirlendi.

3.2.4 Transkripsiyonel Aktivite Belirleme Esaslı Çalışmalarda Kullanılan Metotlar

3.2.4.1 Transient Transfeksiyon

Hücre soyu başlatılarak 4-5. pasaja getirildi. Tripin Mavis Boyası kullanılıp hücreler hemositometrik olarak sayıldı ve 12 kuyucuklu plakalara kuyucuk başına 250.000 hücre olacak biçimde paylaştırıldı ve bir gece inkübasyona bırakıldı.

Ertesi gün plaka yüzeyine tutunan hücelere en az 3 tekrarlı olacak biçimde promotor parçaları transfekte edildi. Bu transfeksiyon işlemi için son hacim 45 µL olacak biçimde 2 mM CaCl₂ ve transfeksiyonu yapılacak olan DNA parçaları karıştırıldı. Oluşan bu karışıma 45 µL hacmindeki 2 X Hepses baloncuk yapma koşuluyla damla damla eklendi. Karışım presipitasyonun gerçekleşmesi için bir saat oda sıcaklığında bekletildi. Presipite olan karışımdan 90 µL alınarak yavaş yavaş kuyucuklara eklendi. Plaka çok sert olmamak şartıyla sallanarak karışımın homojenize olması sağlandı. Ertesi sabah plakalardaki FCS+DMEM karışımı uzaklaştırılarak kuyucuklar PBS ile ikişer kez yıkandı. Yıkanan kuyucuklara BSA'lı DMEM eklendi ve bir saat inkübasyona bırakıldı. BSA eklenmesiyle serum açıklığı oluşturulan hücelere yolak inhibitörleri Tablo 3.3'de belirtilen konsantrasyonlarda uygulandı.

İnhibitör uygulamasından 45 dakika sonra *TNF-α* 10 ng/mL olacak şekilde uygulandı. 48 ve 72 saat inkübasyonun ardından SEAP ve lusiferaz etkinliğinin luminometre kullanılarak ölçümü yapıldı.

Tablo 3.11: Transient transfeksiyon deneylerinde kullanılmış olan çözeltiler.

2 mM CaCl₂	29.4 g CaCl ₂ , 100 mL'ye dH ₂ O ile tamamlandı. Otoklav yapıldıktan sonra filtrelenerek +4 °C' de muhafaza edildi.
2X HEPES	0.04 g Na ₂ HPO ₄ , 1,6 g NaCl, 1,3 g HEPES dH ₂ O ile 100 mL'ye tamamlandı. pH değeri 7.05–7.12 aralığına ayarlandı. Otoklav yapıldıktan sonra filtrelenerek -20 °C' de muhafaza edildi.

3.2.4.2 Sekrete Edilen Lusiferaz Etkinliğinin Belirlenmesi

Salınan Sistem Lusiferaz Aktivitesinin ölçülmesinde “Ready-To-Glow Dual Secreted Luciferase Assay” (Clontech) kiti kullanıldı. Belirtilen 48 ve 72 saatlik inkübasyon sürelerinin ardından kuyucuklardaki transfeksiyon medyumundan 100'er µL alınarak ependorflara konuldu. Her bir ependorftan 10'ar µL alınarak 384 kuyucuktan oluşan plakaya konuldu.

Kit içerisindeki 10 X Lusiferaz Substratı, Reaksiyon Tamponu ile 1 X'e dilüe edildi. Oluşan 1 X'lik Lusiferaz Substratı+Reaksiyon Tamponu karışımından 1'er µL alınarak daha öncesinde içerisinde 10'ar µL transfeksiyon medyumunu konulmuş kuyucuklara eklenip luminometre ile hızlıca sonuç alındı.

3.2.4.3 SEAP (Sekrete Edilen Alkalın Fosfataz) Etkinliğinin Belirlenmesi

Salınan Sistem Alkalın Fosfataz Aktivitesinin ölçülmesinde "Ready-To-Glow Dual Secreted Luciferase Assay" (Clontech) kiti kullanıldı. Belirtilen 48 ve 72 saatlik inkübasyon sürelerinin ardından kuyucuklardaki transfeksiyon medyumundan 5'er µL alınarak 384 kuyucuktan oluşan plakaya konuldu. Kit içerisindeki 5 X dilüsyon tamponu 1 X'e sulandırılarak her kuyucuğa 15'er µL eklendi.

Plaka alüminyum folyo ile kaplanarak 30 dakika boyunca 65 °C'deki su banyosunda bekletildi. Bu işlemin ardından plaka buz üzerinde 2-3 dakika bekletilip oda sıcaklığına alındı. Oda sıcaklığına gelen plakaya SEAP substratından 20'şer µL eklenerek 30 dakika inkübasyona bırakıldı. Beklemenin ardından sonuçlar luminometre ile alındı.

Tablo 3.12: SEAP ve Lusiferaz etkinliğinin belirlenmesinde kullanılmış olan çözeltiler.

10 X Substrat Solüsyonu	Liyofilize durumdaki substrat, substrat tamponu ile çözüldü
1 X Substrat/Reaksiyon Tamponu	10 X substrat solüsyonu, reaksiyon tamponu ile 1 X'e dilüe edilip kuyu başına 1 µL olarak kullanıldı.
1 X Dilüsyon Tamponu	5 X dilüsyon tamponu dH ₂ O ile 1 X'e dilüe edilerek 15 µL uygulandı.

3.2.5 Protein Esaslı Çalışmalarda Kullanılan Metotlar

3.2.5.1 Western Blot Tekniği

3.2.5.1.1 Protein Çalışmaları İçin Sitokin DeneYlerinin Kurulması

Hücreler, hücre kültürü çalışmaları amacıyla kültüre edildi. Hücrelerin sağlık durumları kontrol edildikten sonra Bölüm 3.2.2.4'de açıklandığı biçimde hücre sayımı yapıldı. Hücreler, 25 cm²'lik flasklara 5 mL FCS+DMEM ve 2.000.000 hücre olacak biçimde paylaştırılıp büyütölmek üzere inkübatöre kaldırıldı. Ertesi gün hücrelerin yüzeye tutunup, tutunmadıkları kontrol edildikten sonra FCS+DMEM karışımı uzaklaştırılarak, flasklara % 0.1 oranında BSA ihtiva eden DMEM eklendi. 1 saat BSA'lı DMEM'de bekletilen hücrelere 10 ng/mL olacak biçimde *TNF-α* sitokini uygulandı. 1, 3, 6, 24 ve 48. saatlerde hücre pelletleri alındı.

3.2.5.1.2 Protein Çalışmaları İçin Yolak İnhibisyon DeneYlerinin Kurulması

Hücreler, hücre kültürü çalışmaları amacıyla kültüre edildi. Hücrelerin sağlık durumları kontrol edildikten sonra Bölüm 3.2.2.4'de açıklandığı biçimde hücre sayımı yapıldı. Hücreler, 25 cm²'lik flasklara 5 mL FCS+DMEM ve 2.000.000 hücre olacak biçimde paylaştırılıp büyütölmek üzere inkübatöre kaldırıldı. Ertesi gün hücrelerin yüzeye tutunup, tutunmadıkları kontrol edildikten sonra FCS+DMEM karışımı uzaklaştırılarak, flasklara % 0.1 oranında BSA ihtiva eden DMEM eklendi. 1 saat BSA'lı DMEM'de bekletilen hücrelere Tablo 3.3'de belirtilen son konsantrasyonlarda yolak inhibitörleri uygulandı. İnhibitör uygulamasının ardından 10 ng/mL olacak biçimde *TNF-α* sitokini uygulandı ve 6 saat sonunda 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj yapılarak pellet alındı.

3.2.5.1.3 Western Blot Tekniğinde Kullanılmış Olan Solüsyonlar

Western Blot Tekniği ile protein esaslı çalışmalarda kullanılmış olan çözeltilerin; isim, konsantrasyon ve hazırlanış biçimleri Tablo 3.13’de belirtilmiştir.

Tablo 3.13: Western Blot Tekniğinde Kullanılmış Olan Solüsyonlar.

RIPA Tamponu	% 1(v/v) Triton X100, 10 mM Tris-HCl (pH:8), %0.1 (v/v) sodyum deoxycholate, 1mM EDTA, 1mM EGTA, %0.1 (v/v) SDS, 140 mM NaCl, proteaz inhibitörü.
4 X Laemli Tamponu	0.125 M Tris-HCl (pH:6.8), %4 (w/v) SDS, %10 (v/v) Gliserol, %10 (v/v) β -Merkaptoetanol
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
Western Blot Transfer Tamponu	25 mM Tris, 192 mM Glisin, %20 (v/v) Metanol
10X Tris Tampon Tuzu (10X TBS)	10 mM Tris-HCl, 20 mM NaCl, pH: 7.4
Stripping Tamponu	1 M Glycine, %1 SDS, pH: 2.5
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.

3.2.5.1.4 Protein Örneklerinin Hazırlanması (RIPA Tamponu ile)

Bölüm 3.2.5.1.1 ve Bölüm 3.2.5.1.2’de açıklandığı biçimde hücre pelletleri hazırlandı. Hücre pelletleri iki kez PBS ile yıkanarak Tablo 3.13’de içeriği verilen RIPA Tamponu ile çözülerek süspanse hale getirildi.

Süspanse haldeki örnekler buz üzerinde 45 dakika boyunca birkaç defa pipetaj yapmak suretiyle bekletildi. Süre sonunda örnekler +4 °C'de 13.500 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatant kısmı daha öncesinde buzda bekletilerek soğutulmuş olan ependorflara alındı ve konsantrasyon belirlenmesi yapıldı. Konsantrasyona bağlı olarak gerekli hesaplamalar yapıldıktan sonra örnekler boyanıp, denatüre edilerek jele yüklendi.

3.2.5.1.5 SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis)

Protein örneklerinin akım yardımıyla yürütüleceği SDS-PAGE jelini hazırlamak amacıyla kullanılacak olan camlar ve elektroforez aparatları dH₂O ve %70'lik Etil Alkol ile temizlendi. Stok solüsyonlar önceden hazırlanıp, otoklavlanarak kullanıma hazır hale getirildi. Yığıma ve ayırma jelleri Tablo 3.14'de gösterildiği şekilde hazırlandı. Protein örnekleri 30-50 µg olacak biçimde 4 X Laemli örnek tamponu ile karıştırıldı ve örnekler 5 dakika boyunca 95 °C ısıya tabi tutularak örneklerin denatürasyonu sağlandı. Denatürasyona bağlı buharlaşma göz önünde tutulup örnekler spin yapılarak jele yüklendi. Thermo ürünü olan Protein marker 5 µL olacak şekilde jelin bir kuyusuna marker olarak yüklendi. Elektroforez tankı içerisinde % 0.1 SDS bulunduran 1X Yürütme Tamponu ile dolduruldu ve örnekler 90 volt akımda 2-2.5 saat yürütüldü.

Tablo 3.14: SDS-PAGE yığıma ve ayırma jeli bileşenleri.

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 Per Sülfat	100 µL	100 µL
TEMED	10 µL	10 µL

3.2.5.1.6 Protein Örneklerinin Membrana Transfer Edilmesi

Jelde yürütülmüş protein örneklerini membrana aktarmak amacıyla PVDF (0.45 µm Milipore) membran kullanıldı. Transfer işlemi Bio-Rad Trans Blot (Bio-Rad Laboratories) sistemi kullanılarak yapıldı. Öncelikle yürütme işlemi tamamlanan jeller ilk olarak yürütme tankından, daha sonra yığma jelini uzaklaştırmak suretiyle de camlardan çıkartılıp dengelenmesi için soğuk transfer tamponunda 10 dakika boyunca bekletildi. Kurutma kâğıtları ve Metanol'de 1 dakika bekletilerek aktive edilmiş olan PVDF membranların büyüklüğü jel ile orantılı olacak şekilde ayarlandı. Kurutma kâğıtları, transfer aparatları ve süngerler de soğuk transfer tamponunda bekletilerek ıslanmaları sağlandı. Daha sonra transfer kasetinin negatif kısmından başlayıp sünger, kurutma kâğıdı, jel, membran, kurutma kâğıdı ve sünger sırası gözetilerek sandviç hazırlandı. Hazırlanan sandviç içinde hava kabarcıklarının bırakılmamasına özen gösterildi. Daha sonra transfer kaseti, soğuk transfer tamponu ile doldurulmuş olan Bio-Rad Trans Blot sistemine yerleştirildi ve 15 voltluk akım ile +4 °C'de bir gece boyunca proteinlerin membrana transferi yapıldı.

3.2.5.1.7 Protein Örneklerinin Tespit Edilmesi

Transfer sisteminden çıkarılan membranlar öncelikle 20 mL hacimdeki bloklama solüsyonunda (% 0.1 Tween20 ve % 5 yağsız süt tozu içeren 1X TBS) bir saat boyunca oda sıcaklığında vertical biçimde çalkalanarak bloklama işlemine tabi tutuldu. 1 saatin sonunda bloklama solüsyonu uzaklaştırılarak membran 5'er dakika % 0.1 Tween20 içeren 1 X TBS ile 3 kez yıkandı. Primer (birincil) antikor ile bir gece boyunca +4 °C'de muamele edilen PVDF membran, Sekonder (ikincil) antikor ile de oda sıcaklığında bir saat süreyle muamele edildi. Süre sonunda Sekonder antikordan alınan membran 5'er dakika içinde % 0.1 Tween20 bulunduran 1X TBS ile üç kez yıkandı. Protein bantları ECL Substrat'ı (Thermo, Pierce) kullanılarak UVP görüntüleme cihazında görüntülendi.

3.2.5.1.8 Sonuçların Analiz Edilmesi

β -Aktin proteininin normalizatör olarak kullanıldığı deneylerde elde edilen görüntülerin Image J programıyla densitometrik analizleri yapıldı.

3.2.6 DNA-Protein Etkileşimi Esaslı Deneylerde Kullanılan Metotlar

3.2.6.1 EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay) Yöntemi

EMSA, protein-nükleik asit interaksiyonlarını tespit etmek için hızlı ve hassas bir yöntemdir. Protein-nükleik asit kompleksinin elektroforetik hareketliliğinin tipik olarak serbest nükleik asidinkinden daha yavaş olduğu gözlemine dayanmaktadır [200]. DNA'nın hareketinde meydana gelen bu değişimler değerlendirmeye alınarak düşünülen protein ile etkileşim içerisinde olup olmadığı tespit edilebilmektedir.

3.2.6.1.1 İnsan Kemik Kanseri Hücre Modeli'nden (Saos-2) Nükleer Ekstraktların Hazırlanması

Kontrol grubu ve 24 saat süreyle 10 ng/mL *TNF- α* uygulanmış hücrelerden nükleer ekstraksiyon yapıldı. Bu bağlamda 75 cm² alana sahip flask 10 mL soğuk haldeki PBS ile yıkandı. PBS uzaklaştırıldıktan sonra flask yüzeyi 3 mL TEN tamponu ile kaplanarak buzda 5 dakika boyunca bekletildi. Bekleme sonrasında hücreler kazıyıcı ile kazınarak 2 mL hacme sahip ependorflara aktarıldı. 20 saniye boyunca +4 °C'de 14.000 rpm'de santrifüj yapıldı. Süpernatant uzaklaştırıldı ve pellet soğuk haldeki PBS'den 1.5 mL eklenip 5 dakika boyunca +4 °C'de 14.000 rpm'de santrifüj edilerek yıkandı. Süpernatant uzaklaştırılarak 50 μ L Tampon A ile süspansiyon edildi ve ardından buzda 15 dakika beklemeye bırakıldı. Beklemenin ardından Tampon A ile süspansiyon edilmiş pellet insülin iğnesi ile 5 kez lizise edildi. Ardından 20 saniye 14.000 rpm'de +4 °C'de santrifüj yapıldı. Santrifüj sonrasında meydana gelen pellet Tampon C'den 60 μ L alınarak tekrar süspansiyon hale getirildi ve ardından otuz dakika buzda beklemeye bırakıldı. Bekleme sonrası 5 dakika süresince 14.000 rpm'de santrifüj yapıldı.

Süpernatant alınarak içerisindeki protein miktarının konsantrasyonu tayin edildi ve küçük hacimlere paylaştırılarak -80 °C derin dondurucuya kaldırıldı.

3.2.6.1.2 Oligonükleotitlerin İşaretlenmesi

Oligonükleotitlerin ucuna Biotin takılması reaksiyonu Terminal Deoksinükleotidil Transferaz (Thermo #EP0161) enzimi yardımıyla gerçekleştirildi. Biotinleme reaksiyonu bileşenleri Tablo 3.15’de verilmiştir. Bu bağlamda bileşenlerin birleştirilmesiyle reaksiyon 15 dakika 37 °C’de ısıya tabi tutuldu. Hemen ardından 70 °C’de 10 dakika tutulup TdT enziminin inaktive olması sağlanarak reaksiyon sonlandırıldı.

Tablo 3.15: İşaretleme reaksiyonu içeriği.

Bileşen	Hacim (µL)	Son konsantrasyon
5 X TdT reaksiyon tamponu	10 µL	1 X
Kontrol oligo (1 µM)	5 µL	100 nM
Biotin-11-UTP (10 µM)	2.5 µL	0.5 µM
TdT(20 U/µL)	2 µL	0.8 U/µL
Saf su	30.5 µL	-
Son hacim	50 µL	-

3.2.6.1.3 Oligonükleotitlerin Çift zincirli hale gelmesi

Biotinli ve Biotinsiz oligonükleotitler 95 °C’de 5 dakika boyunca ısıya tabi tutularak çift zincirli hale gelmeleri sağlandı. Süre sonunda cihazdan çıkarılan tüpler oda sıcaklığında soğumaya bırakıldı. Soğutulduktan sonra -20 °C’de saklandı.

3.2.6.1.4 Bağlanma Reaksiyonunun Kurulması ve Jelde Yürütülmesi

%6'lık konsantrasyona sahip EMSA jeli bağlanma reaksiyonu kurulacağı günün öncesinde Tablo 3.16'da gösterildiği gibi hazırlanarak yürütme tamponu olarak kullanılan 0.5 X TBE'de bir gece polimerleşmeye bırakıldı. Ertesi gün Tablo 3.17'de gösterildiği şekilde bağlanma reaksiyonu kurularak oda sıcaklığında 2 saat inkübe edildi. Yürütme öncesinde jel 30-60 dakika arasında Amonyum Persülfatı uzaklaştırmak, jel ısısını sabitlemek, sabitleyici faktör ve iyonları dengelemek amacıyla ön yürütmeye bırakıldı. Süre sonunda örnekler 6 X yükleme boyası ile karıştırılarak kuyucuklara 20 µL olarak yüklenip 100 V'da 1 saat yürütüldü.

Tablo 3.16: %6'lık Jel İçeriği.

Bileşenler	Son Konsantrasyon
% 50'lik Gliserol	% 4
% 40 Poli-Akrilamid solüsyonu	% 6
TEMED	0.001
5 X TBE tamponu	0.5 X
% 10 Amonyum persülfat	% 0.1
dH ₂ O	4404 µL
Jel hacmi	6000 µL

Tablo 3.17: Bağlanma Reaksiyonu İçeriği.

Bileşenler	Reaksiyonlar		Son Konsantrasyon
	Serbest R.	Yarışma R.	
Ultra saf dH ₂ O	X µL	X µL	-
KCl (1M)	-	-	50 mM
10 X Bağlanma Tamponu	2 µL	2 µL	1 X
EDTA (200 mM)	-	-	10 mM
Poly (dI•dC) (1µg/µL)	1 µL	1 µL	50 ng/µL
Biotinsiz DNA	-	2	100.000 fmol/µL
Nükleer Ekstrakt	X µL	X µL	Derişime bağlı
Biotinli DNA	1	1	20 fmol/µL
TOPLAM	20 µL	20 µL	-

3.2.6.1.5 Protein Örneğlerinin Nylon Membrana Transfer Edilmesi

Jeldeki örneğlerin membrana transfer edilmesi amacıyla nylon membran kullanıldı. Transfer işlemleri Bio-Rad Trans Blot (Bio-Rad Laboratories) sistemi kullanılarak yapıldı. Öncelikle yürütme işlemleri tamamlanan jeller ilk olarak yürütme tankından, daha sonra da camlardan çıkartıldı. Büyüklüğü jel ile orantılı olacak şekilde ayarlanan membran soğuk haldeki 0.5 X TBE tamponunda bekletildi. Kurutma kâğıtları, transfer aparatları ve süngerler de soğuk haldeki 0.5 X TBE tamponunda bekletilerek ıslanmaları sağlandı. Daha sonra transfer kasetinin negatif kısmından başlayıp sünger, kurutma kâğıdı, jel, membran, kurutma kâğıdı ve sünger sırası gözetilerek sandviç hazırlandı. Hazırlanan sandviç içinde hava kabarcıklarının bırakılmamasına özen gösterildi. Daha sonra transfer kaseti, soğuk haldeki 0.5 X TBE tamponu ile doldurulmuş olan Bio-Rad Trans Blot sistemine yerleştirildi ve 100 voltluk akım ile +4 °C’de bir saat boyunca örneğlerin transferi yapıldı. Transfer işlemleri sonrasında membran kross-link reaksiyonuna tabi tutuldu.

Bu bağlamda streç film ile kaplanan membran UV ışığında 15 dakika bekletilerek DNA'nın membrana bağlanması sağlandı. Daha sonrasında membran bloklama tamponu içerisinde oda sıcaklığında 15 dakika boyunca çalkalandı. Bu sürenin sonunda LightShift® Chemiluminescent EMSA Kit (Thermo) protokolüne göre bloklama, antikorlama, yıkama ve dengeleme aşamaları gerçekleştirildi. Biotinle işaretlenmiş DNA-protein kompleksi, ECL Substrat'ı (Thermo, Pierce) kullanılarak UVP görüntüleme cihazında görüntülendi.

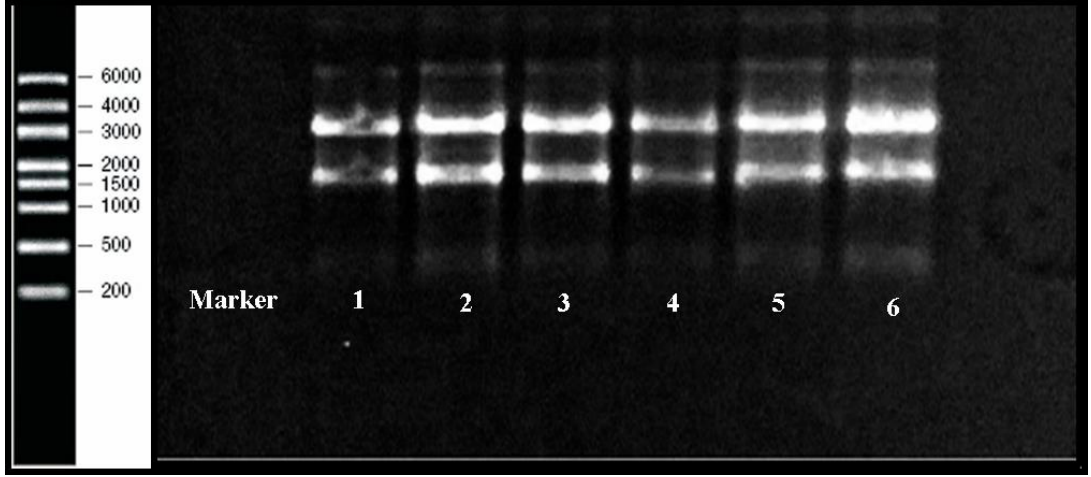
4. BULGULAR

4.1 *TNF- α* 'nın İnsan *ADAMTS-2* ve *ADAMTS-3* Genlerinin mRNA Seviyesindeki Ekspresyonlarını Belirleme Çalışmaları

İnsan *ADAMTS-2* ve *ADAMTS-3* genlerinin Saos-2 hücre hattında *TNF- α* uygulandığında oluşacak mRNA seviyesindeki ekspresyonunu belirlemek için Bölüm 3.2.2.2'de açıklandığı gibi Saos-2 hücreleri büyütülüp, Bölüm 3.2.3.1'de belirtilen konsantrasyonda *TNF- α* uygulandıktan sonra Bölüm 3.2.3.3'de açıklanan üretici firmaya ait kit protokolü uygulanmak suretiyle de hücrelerden RNA izolasyonu gerçekleştirildi. Bölüm 3.2.3.4'de açıklandığı gibi RNA miktarları belirlendikten sonra Bölüm 3.2.3.5'de açıklanan biçimde de RNA kalitesini belirlemek amacıyla RNA jel elektroforezi (Şekil 4.1) yapıldı. RNA'larda degradasyon varlığının görülmemesinin ardından konsantrasyonu 1000 ng RNA kullanılacak biçimde cDNA eldesi Bölüm 3.2.3.6'da açıklandığı üzere gerçekleştirildi. Daha sonra Bölüm 3.2.3.7'de açıklandığı biçimde İnsan β -2 geni primerleri kullanılıp Klasik PZR işlemi gerçekleştirildi ve PCR ürünleri Bölüm 3.2.3.8'de belirtilen biçimde agaroz jelde yürütme işlemine tabi tutularak (Şekil 4.2) cDNA kalitesi belirleme analizleri yapıldı. Sentezlenmiş olan cDNA'ların kullanılmasıyla Bölüm 3.2.3.9'de açıklandığı gibi Gerçek zamanlı PZR uygulamaları yapıldı. Gerçek zamanlı PZR'da kullanılmış olan İnsan *ADAMTS-2* ve *ADAMTS-3* genlerinin ekspresyon primerleri ve İnsan β -2 mikroglobulin geninin ekspresyon primerleri Tablo 4.1' de verilmiştir.

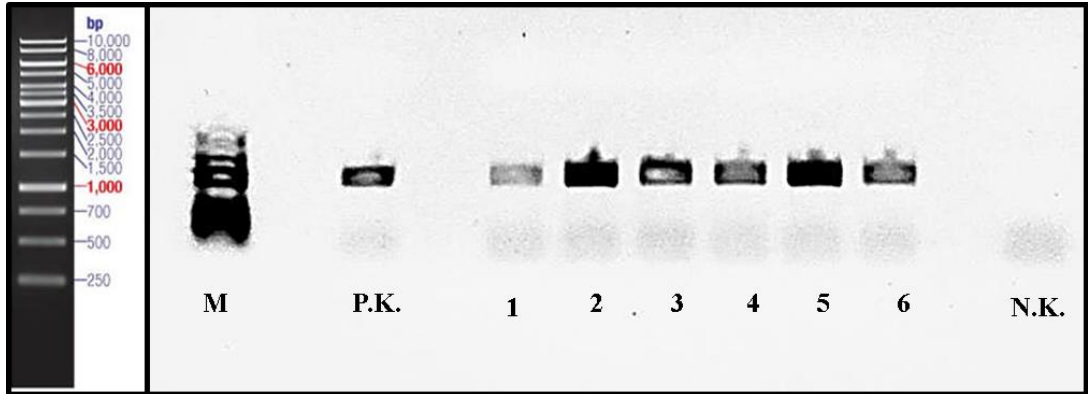
Tablo 4.1: Gen ifadesi belirleme deneylerinde kullanılmış olan primerler.

Primer	Primer Dizisi
<i>ADAMTS-2</i> İleri	5'-CTGTGGCGACGAGGTGCG- 3'
<i>ADAMTS-2</i> Geri	5'-GGTGCACACATAGTCCCGTCC- 3'
<i>ADAMTS-3</i> İleri	5'-GGAACACTGCACCAAAACCT- 3'
<i>ADAMTS-3</i> Geri	5'-TGTCTCCCAAACATGGTTCA- 3'
H β -2 İleri	5'-TTTCTGGCCTGGAGGCTATC-3'
H β -2 Geri	5'-CATGTCTCCATCCCACTTAACT-3'



Şekil 4.1: Saos-2 hücre hattında kontrol ve *TNF- α* uygulanmış örneklerin RNA jel elektroforezi görüntüsü.

1: Saos-2 RNA'sı, **2:** 1 saat *TNF- α* uygulanmış RNA, **3:** 3 saat *TNF- α* uygulanmış RNA, **4:** 6 saat *TNF- α* uygulanmış RNA, **5:** 24 saat *TNF- α* uygulanmış RNA, **6:** 48 saat *TNF- α* uygulanmış RNA.

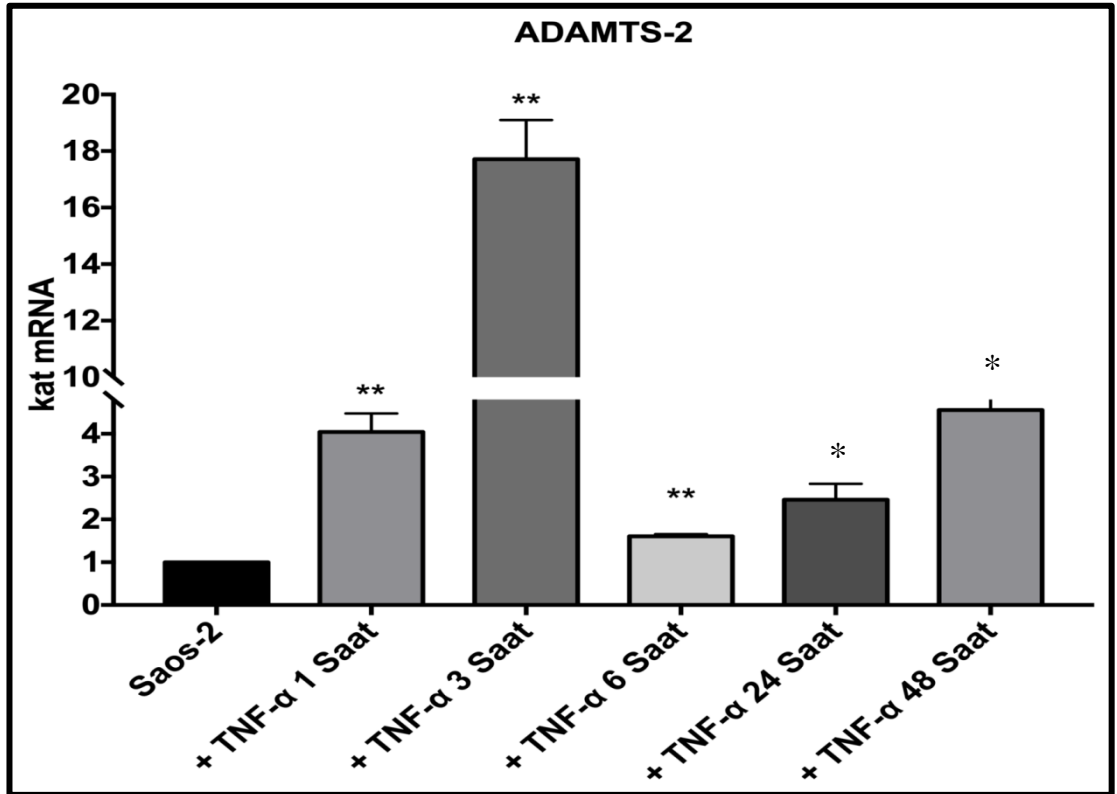


Şekil 4.2: cDNA Kontrolü İçin Agaroz Jel Elektroforezi Görüntüsü.

P.K.: Pozitif Kontrol cDNA'sı, **1:** Saos-2 cDNA'sı, **2:** 1 saat *TNF- α* uygulanmış cDNA, **3:** 3 saat *TNF- α* uygulanmış cDNA, **4:** 6 saat *TNF- α* uygulanmış cDNA, **5:** 24 saat *TNF- α* uygulanmış cDNA, **6:** 48 saat *TNF- α* uygulanmış cDNA, **N.K.:** Negatif Kontrol cDNA'sı.

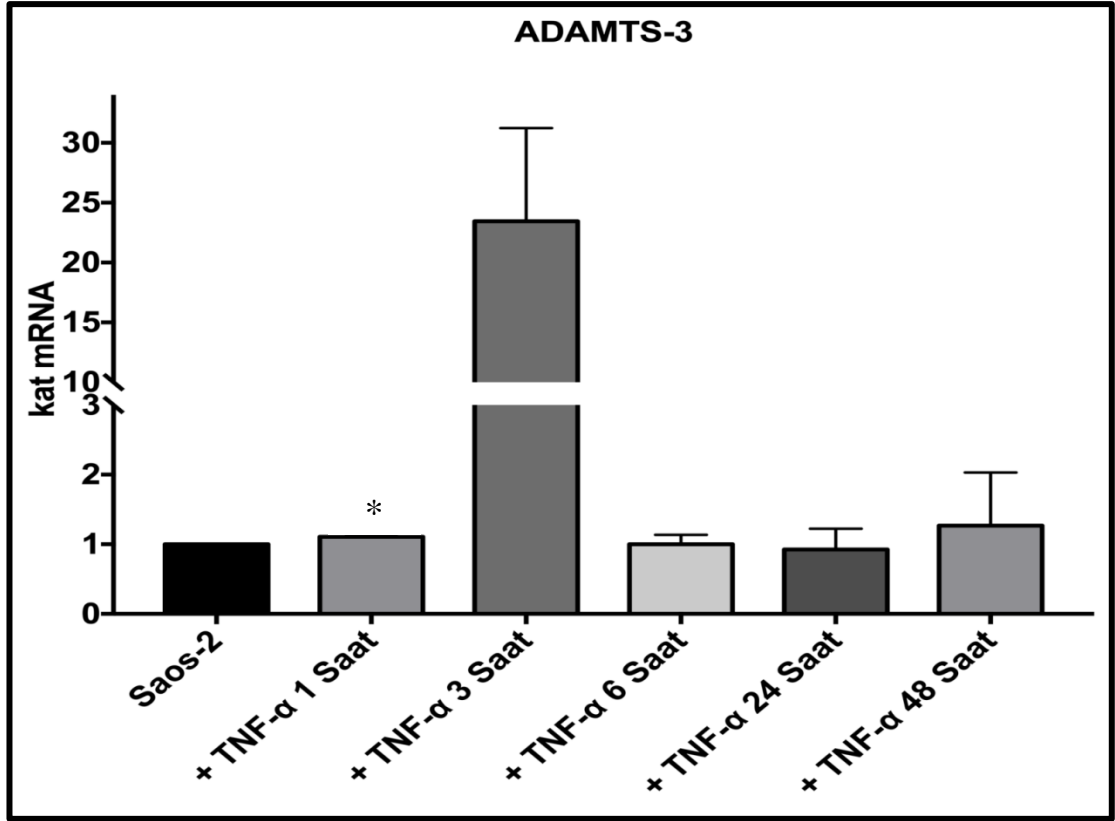
İzole edilen RNA'ların degradesi olmadığı ve sentezlenen cDNA'ların alıştır durumda olduklarının tespitinin ardından Gerçek zamanlı PCR alışmaları yapılmıştır. Bu alışmalar sonucunda yapılan değerlendirmeler neticesinde *TNF- α* 'nın Saos-2 hucelerindeki *ADAMTS-2* geninin mRNA düzeyindeki ekspresyonunu indüklediği belirlenmiştir. Bu induklenmenin çalışılan tüm saat dilimlerinde meydana geldiği ancak en belirgin induklenmenin 17 kat ile 3. saat diliminde gerçekleştiği ve istatistiksel olarak da anlamlı değer taşıdığı tespit edilmiştir.

TNF- α aracılı *ADAMTS-3* geninin mRNA seviyesindeki ekspresyonunu tespit etmek amacıyla İnsan Osteosarkoma hucere modeli olan Saos-2 hucelerine *TNF- α* uygulanmış ve sonrasında Gerçek zamanlı PCR alışmaları yapılmıştır. Bu alışmalar neticesinde elde edilen sonuçlar; *TNF- α* 'nın Saos-2 hucelerindeki *ADAMTS-3* geninin mRNA seviyesindeki ekspresyonunu belirli zaman dilimlerinde indüklediğini göstermiştir. En belirgin induklenmenin 23 kat ile 3. saat diliminde gerçekleştiği ve 1. Saat dilimindeki induklenmenin de istatistiksel olarak anlamlı değer taşıdığı tespit edilmiştir.



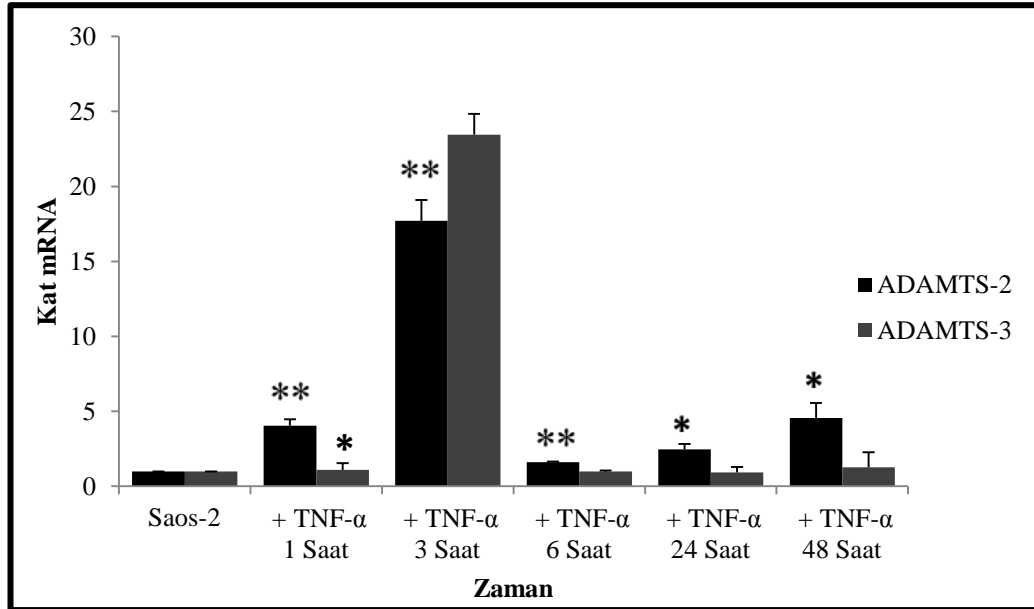
şekil 4.3: *TNF- α* 'nın *ADAMTS-2* genine mRNA düzeyindeki etkisi.

(* $p \leq 0.05$ - 0.01 Aralığındaki değer, ** $p \leq 0.01$ 'den kuck değer)



Şekil 4.4: *TNF-α*'nın *ADAMTS-3* genine mRNA düzeyindeki etkisi.

(* $p \leq 0.05$ - 0.01 Aralığındaki değer, ** $p \leq 0.01$ 'den küçük değer)

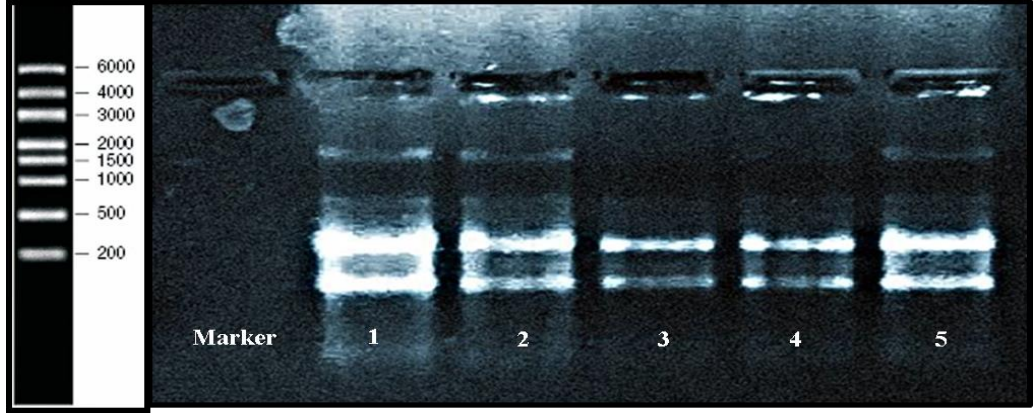


Şekil 4.5: *TNF-α*'nın *ADAMTS-2* ve *ADAMTS-3* genlerine mRNA düzeyindeki etkisinin karşılaştırmalı gösterimi.

(* $p \leq 0.05$ - 0.01 Aralığındaki değer, ** $p \leq 0.01$ 'den küçük değer)

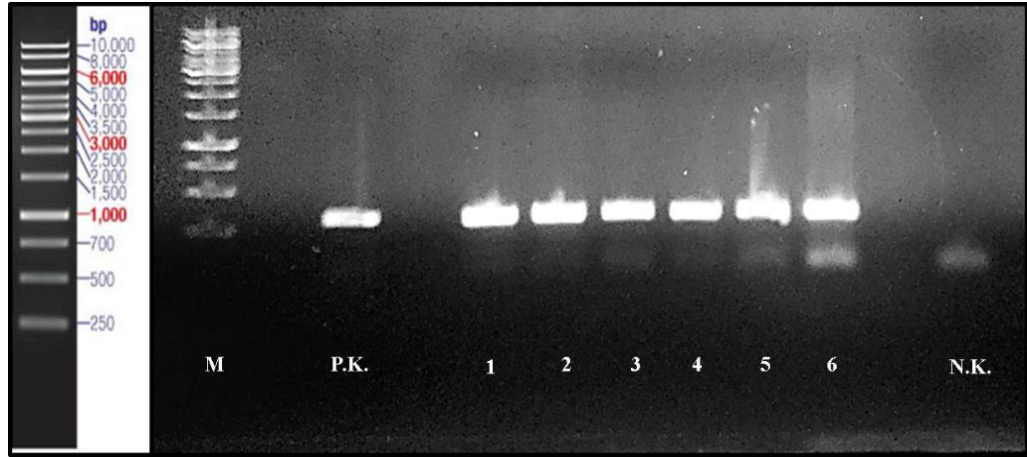
4.2 *TNF- α* 'nın *ADAMTS-2* ve *ADAMTS-3* Genlerinin mRNA Düzeyine Olan Etkisinin Yolak İnhibitörleri Varlığında Belirlenmesi

İnsan *ADAMTS-2* ve *ADAMTS-3* geninin Saos-2 hücre hattında *TNF- α* uygulandığında oluşacak mRNA seviyesindeki ekspresyonunu belirlemek için Bölüm 3.2.2.2'de açıklandığı gibi Saos-2 hücreleri büyütülüp, Bölüm 3.2.3.1'de belirtilen konsantrasyonda *TNF- α* ve Bölüm 3.2.3.2'de belirtilen konsantrasyonlarda yolak inhibitörleri uygulandıktan sonra Bölüm 3.2.3.3'de açıklanan üretici firmaya ait kit protokolü uygulanmak suretiyle de hücrelerden RNA izolasyonu gerçekleştirildi. Bölüm 3.2.3.4'de açıklandığı gibi RNA miktarları belirlendikten sonra Bölüm 3.2.3.5'de açıklanan biçimde de RNA kalitesini belirlemek amacıyla formaldehit agaroz jel elektroforezi (Şekil 4.6) yapıldı. RNA'larda degradasyon varlığının görülmemesinin ardından konsantrasyonu 1000 ng RNA kullanılacak biçimde cDNA eldesi Bölüm 3.2.3.6'da açıklandığı üzere gerçekleştirildi. Daha sonra Bölüm 3.2.3.7'de açıklandığı biçimde İnsan β -2 mikroglobulin geni primerleri kullanılıp Klasik PZR işlemi gerçekleştirildi ve PZR ürünleri Bölüm 3.2.3.8'de belirtilen biçimde agaroz jelde yürütme işlemine tabi tutularak (Şekil 4.7) cDNA kalitesi belirleme analizleri yapıldı. Sentezlenmiş olan cDNA'ların kullanılmasıyla Bölüm 3.2.3.9'de açıklandığı gibi Gerçek zamanlı PZR uygulamaları yapıldı. Gerçek zamanlı PCR'da kullanılmış olan İnsan *ADAMTS-2* ve *ADAMTS-3* genlerinin ekspresyon primerleri ve İnsan β -2 mikroglobulin geninin ekspresyon primerleri Tablo 4.1' de verilmiştir.



Şekil 4.6: Saos-2 hücre hattında *TNF-α* ve yolak inhibitörleri uygulanmış örneklerin RNA jel elektroforezi görüntüsü.

1: *TNF-α* uygulanmış RNA, **2:** *TNF-α* ve MEK İnhibitörü uygulanmış RNA, **3:** *TNF-α* ve PI3K İnhibitörü uygulanmış RNA, **4:** *TNF-α* ve JNK İnhibitörü uygulanmış RNA, **5:** *TNF-α* ve NFκB İnhibitörü uygulanmış RNA.



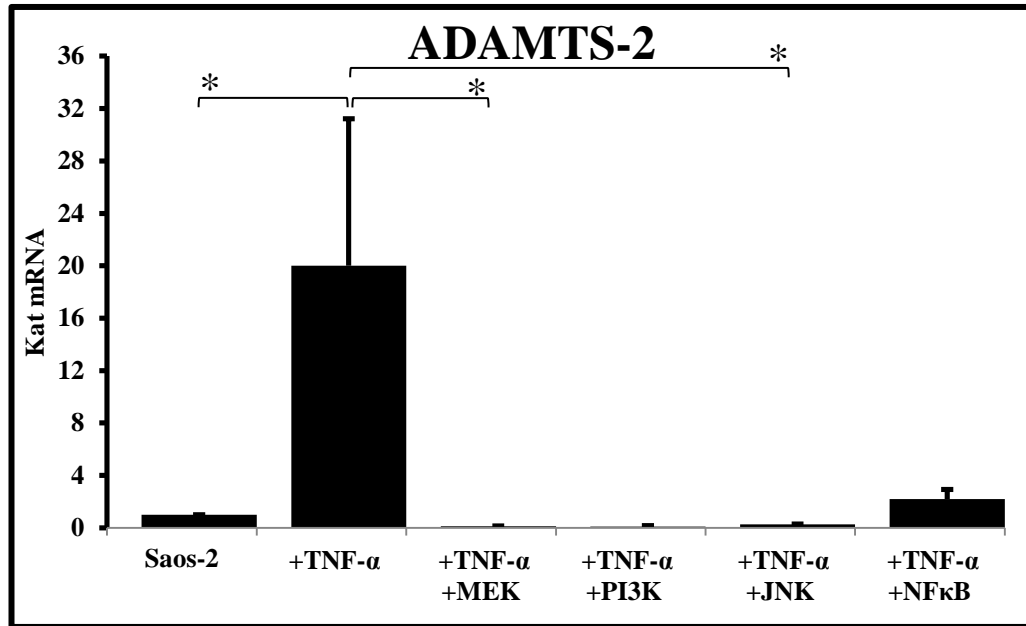
Şekil 4.7: cDNA Kontrolü İçin Agaroz Jel Elektroforezi Görüntüsü.

P.K.: Pozitif Kontrol cDNA'sı **1:** Kontrol Grubu (Saos-2) cDNA'sı, **2:** *TNF-α* uygulanmış cDNA **3:** *TNF-α* ve MEK İnhibitörü uygulanmış cDNA, **4:** *TNF-α* ve PI3K İnhibitörü uygulanmış cDNA, **5:** *TNF-α* ve JNK İnhibitörü uygulanmış cDNA, **6:** *TNF-α* ve NFκB İnhibitörü uygulanmış cDNA, **7:** Negatif Kontrol

Sitokinler hücresel işlevlerini hücre içi sinyal iletim yollarını kullanarak yerine getirirler. İnflamatuvar bir sitokin olan *TNF-α*'nın Saos-2 hücrelerindeki *ADAMTS-2* geninin mRNA düzeyindeki ekspresyonunda hangi yol ya da yolları kullandığının tespiti için hücrelere *TNF-α*'nın yanı sıra hücre içi sinyal iletim yolları inhibitörleri de uygulanmıştır.

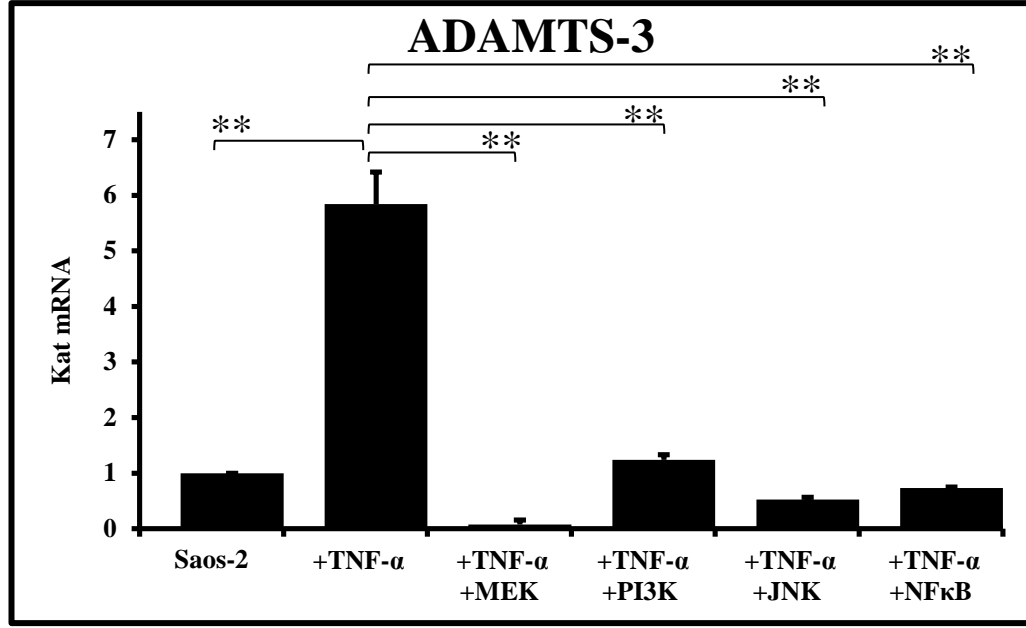
Bu uygulama sonrasında gerçekleştirilen Gerçek zamanlı PZR sonuçları neticesinde *TNF- α* 'nın Saos-2 hücrelerindeki *ADAMTS-2* geninin mRNA düzeyindeki ekspresyonunu 20 kat arttırdığı; yolak inhibitörleri uygulandığında ise bu ekspresyon indüklenmesinin MEK, PI3K ve JNK yollarında neredeyse tamamıyla baskılandığı, NF- κ B yolağında ise 2.2 kata kadar olacak şekilde azaldığı tespit edilmiştir. Bunun yanı sıra MEK ve JNK yollarındaki baskılanmanın istatistiksel olarak da anlamlı değer taşıdığı p değeri hesaplanarak ortaya konmuştur (Şekil 4.8).

TNF- α aracılı *ADAMTS-3* geninin mRNA seviyesindeki ekspresyonunda kullandığı yol ya da yolları belirlemek için Saos-2 hücrelerine *TNF- α* ve yolak inhibitörleri uygulanmış ve sonrasında Gerçek zamanlı PZR çalışmaları yapılmıştır. Bu çalışmalar neticesinde; *TNF- α* 'nın Saos-2 hücrelerindeki *ADAMTS-3* geninin mRNA seviyesindeki ekspresyonunu yaklaşık 6 kat arttırdığı; hücre içi sinyal iletim yolak inhibitörleri uygulanan hücrelerde *ADAMTS-3* gen ekspresyonunun en belirginini MEK yolağında olmak üzere çalışılan tüm yollarda baskılandığı ve bu sonucun istatistiksel olarak da anlamlı değer taşıdığı tespit edilmiştir (Şekil 4.9).



Şekil 4.8: *TNF- α* 'nın yolak inhibitörlerinin *ADAMTS-2* genine mRNA düzeyindeki etkisinin gösterimi.

(* $p \leq 0.05$ - 0.01 aralığındaki değer, ** $p \leq 0.01$ 'den küçük değer)



Şekil 4.9: *TNF-α*'nın yolak inhibitörlerinin *ADAMTS-3* genine mRNA düzeyindeki etkisinin gösterimi.

(* $p \leq 0.05-0.01$ Aralığındaki değer, ** $p \leq 0.01$ 'den küçük değer)

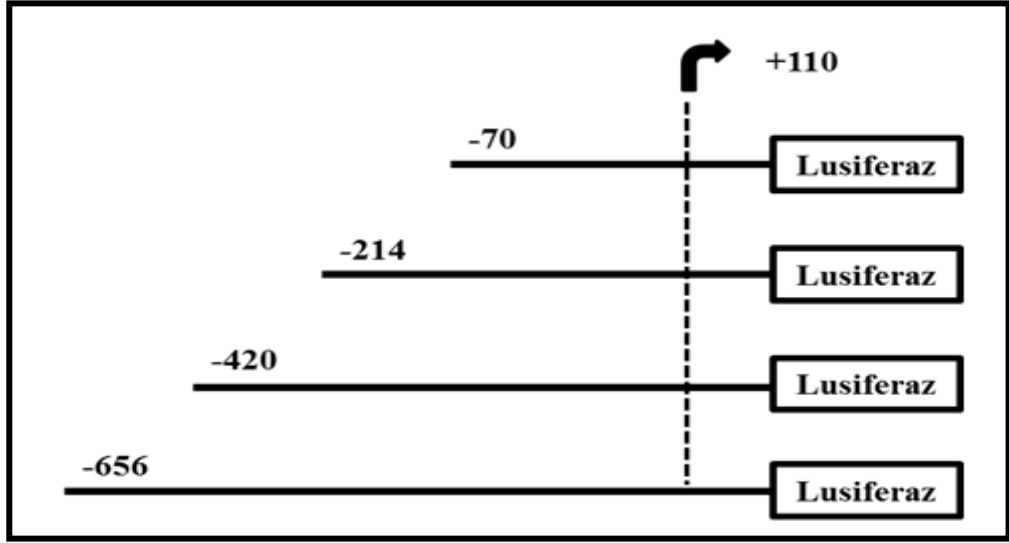
4.3 İnsan *ADAMTS-2* ve *ADAMTS-3* Promotorlarının İşlevsel Analizi

4.3.1 İnsan *ADAMTS-2* ve *ADAMTS-3* Promotorlarının Restriksiyon Endonükleaz Kontrol Kesimi

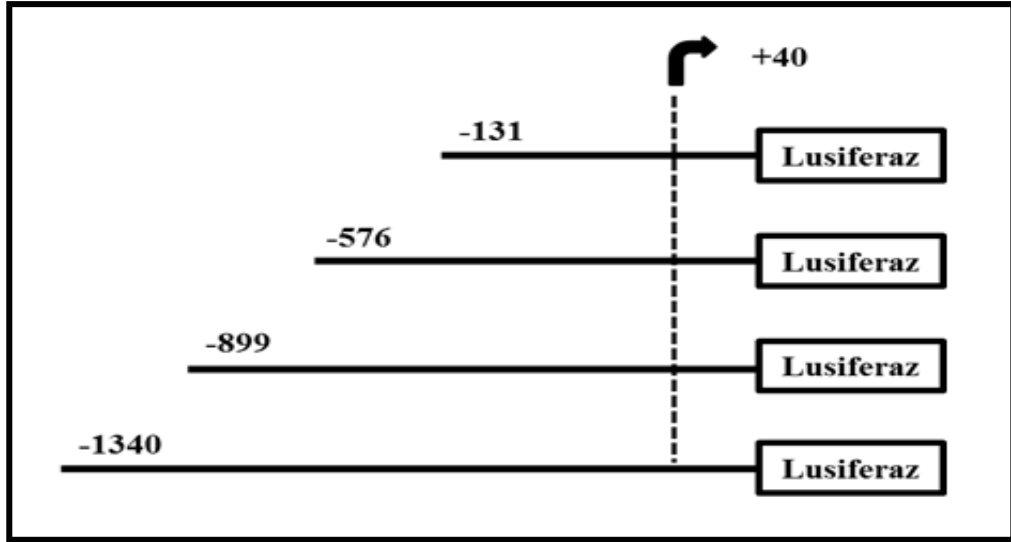
Laboratuvarımızda gerçekleştirilen daha önceki çalışmalarda Dr. Öğr. Üy. Meltem ALPER ve Dr. A. Tuğşen AYDEMİR sırasıyla *ADAMTS-2* ve *ADAMTS-3* promotorlarını klonlamışlardır. Bu klonlama doğrultusunda her bir gen için 4 adet konstrakt oluşturulmuş ve oluşturulan *ADAMTS-2* konstraktları Şekil 4.11'de, *ADAMTS-3* konstraktları ise Şekil 4.12'de verilmiştir. Transfeksiyon deneylerine geçmeden önce oluşturulan bu promotor konstraktlarının maxi-prep plazmit izolasyonu yapılarak Tablo 4.2'de verilen Restriksiyon Endonükleaz enzimleriyle kontrol kesimi yapıлып, görüntülenmiş ve bu görüntü Şekil 4.13'de verilmiştir.

Tablo 4.2: ADAMTS-3 ve ADAMTS-2 Promotor Konstraktların kontrol kesiminde kullanılan enzim listesi.

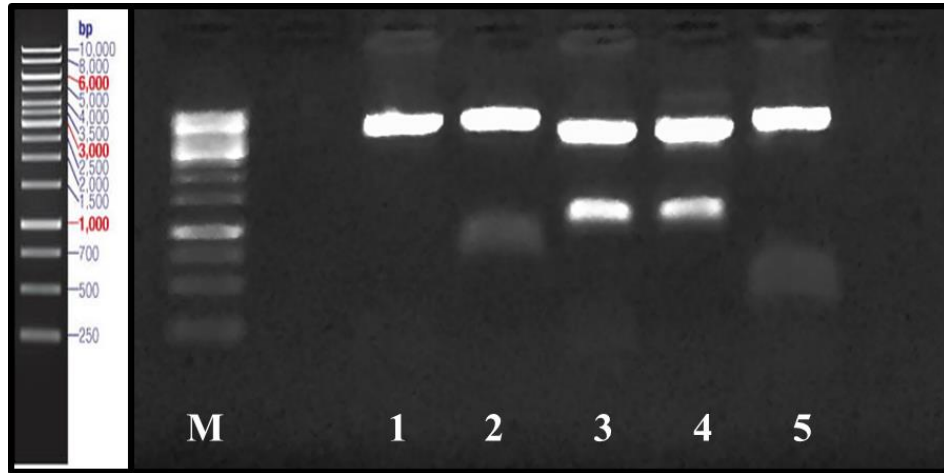
Konstrakt	Enzim
<i>ADAMTS-3</i> [-131/+40]	XhoI ve SacII
<i>ADAMTS-3</i> [-576/+40]	SacII
<i>ADAMTS-3</i> [-899/+40]	XhoI ve HindIII
<i>ADAMTS-3</i> [-1340/+40]	XhoI ve HindIII
<i>ADAMTS-2</i> [-656/+110]	XhoI ve SacII



Şekil 4.10: *ADAMTS-2* promotor konstraktları.



Şekil 4.11: *ADAMTS-3* promotor konstraktları.



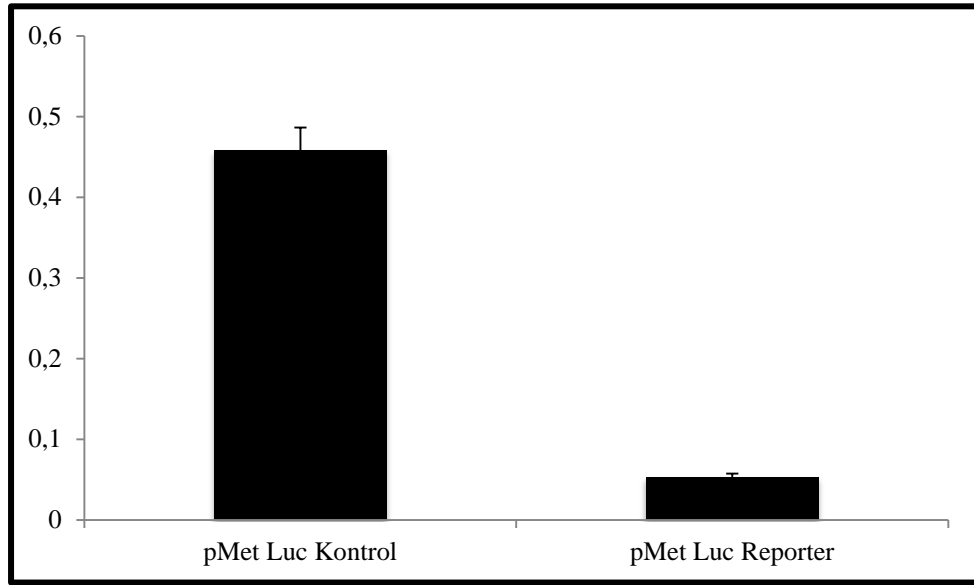
Şekil 4.12: *ADAMTS-2* ve *ADAMTS-3* promotorlarının restriksiyon endonükleaz kontrol kesimi görüntüsü

M: Marker **1:** *ADAMTS-3* [-131/+40], **2:** *ADAMTS-3* [-576/+40], **3:** *ADAMTS-3* [-899/+40], **4:** *ADAMTS-3* [-1340/+40], **5:** *ADAMTS-2* [-656/+110].

4.3.2 Kalsiyum-Fosfat Presipitasyon Metoduyla Geçici Transfeksiyonun Sekrete Edilen Lusiferaz Sisteminde Optimizasyonu

Kalsiyum-Fosfat presipitasyon metoduyla transient transfeksiyon çalışmaları Bölüm 3.2.4.1’de açıklandığı biçimde İnsan kemik kanseri hücre modeli olan Saos-2 hücrelerinde gerçekleştirildi.

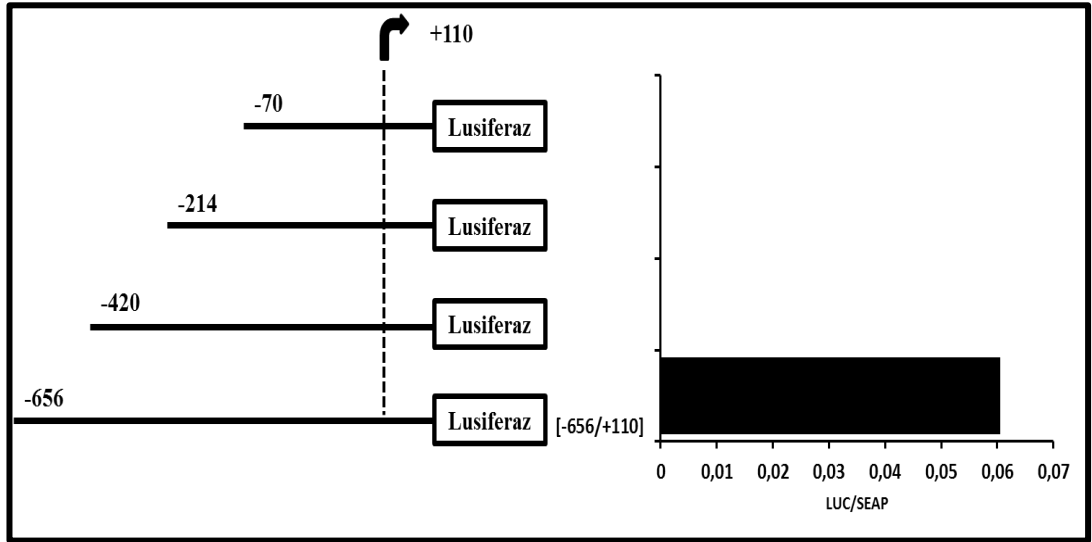
Gerçekleştirilen transfeksiyonun optimize edilmesi amacıyla viral promotora sahip pMET-Luc Kontrol vektörü ve herhangi bir promotor içermeyen pMET-Luc Reporter vektörü Saos-2 hücrelerine transfekte edildi. Bu iki vektör sisteminin tercih edilmesinin sebebi; yüksek aktivite göstermesi beklenen ve viral promotora sahip pMET Luc Kontrol vektörünün transfeksiyon aktivitesinin değerlendirilmesi için pozitif kontrol niteliğinde olması bunun yanı sıra herhangi bir promotor içermeyen pMET Luc Reporter vektörününse negatif kontrol niteliğinde olmasıdır. Bu bilgiler doğrultusunda gerçekleştirilen transfeksiyon çalışmalarında viral promotora sahip pMET Luc Kontrol vektörünün yüksek aktivite gösterdiği ve bununla birlikte herhangi bir promotor içermeyen pMET Luc Reporter vektörününse beklendiği gibi arka plan etkinliği göstermediği ve transfeksiyon sisteminin çalıştığının tespiti gerçekleştirilmiştir. Bu bağlamdaki optimizasyon sonuçları Şekil 4.14’de verilmiştir.



Şekil 4.13: Transfeksiyon etkinliği.

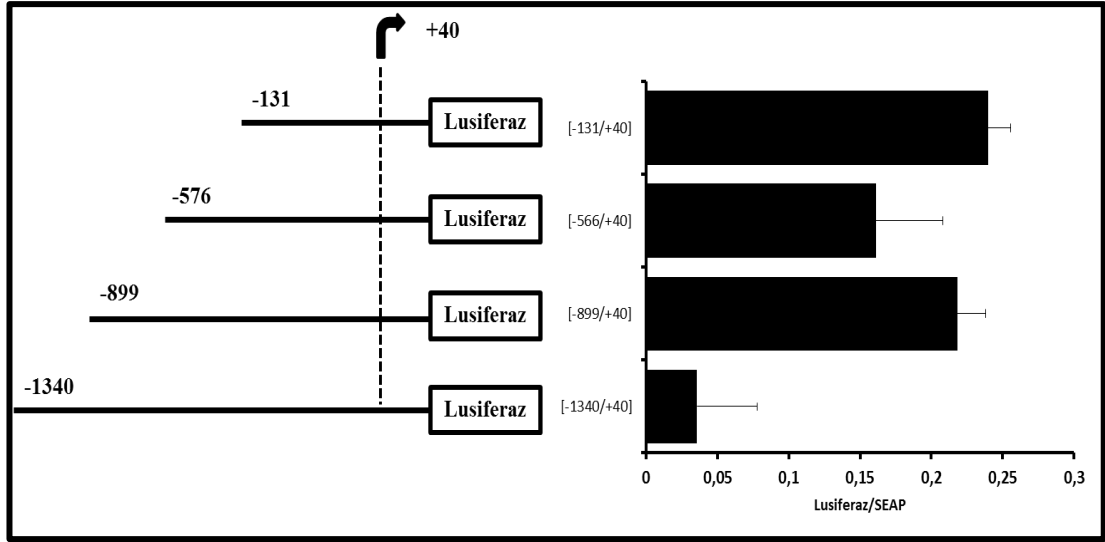
4.3.3 İnsan *ADAMTS-2* ve *ADAMTS-3* Genlerinin Bazal Promotor Aktivitesinin Tespit Edilmesi

Bazal aktivitenin belirlenmesi amacıyla yapılan çalışmalarda daha öncesinde Dr. Öğr. Üy. Meltem Alper tarafından pMet Luc Reporter vektörüne klonlanması gerçekleştirilen *ADAMTS-2* promotörü ve Dr. A. Tuğşen Aydemir tarafından yine pMet Luc Reporter vektörüne klonlanması gerçekleştirilen *ADAMTS-3* promotörü Bölüm 3.2.4.1’de anlatılan deney kapsamında 1 µg konsantrasyona sahip olacak şekilde, transfeksiyon başarısının normalizasyonu için kullanılan pSeap2-Kontrol vektörü de 0.5 µg konsantrasyona sahip olacak şekilde İnsan Kemik Kanseri hücre modeli olan ve 12 kuyucuklu plakalara kuyucuk başına 250.000 hücre olacak biçimde paylaştırılan Saos-2 hücrelerine transfekte edildi. 48 ve 72 saat olarak belirlenen inkübasyon zamanlarının sonunda transfeksiyon medyumundan 100 µL alınarak Bölüm 3.2.4.2’de belirtildiği gibi lusiferaz aktivitesi ve Bölüm 3.2.4.3’de belirttiği gibi de SEAP aktivitesi ölçüldü. Daha sonra ölçüm sonucunda elde edilen Lusiferaz değerleri SEAP değerlerine bölünerek aktivasyon tayini gerçekleştirilip, sonuçlar Şekil 4.15 ve Şekil 4.16’da verilmiştir.



Şekil 4.14: İnsan *ADAMTS-2* Promotorunun Bazal Aktivitesi.

Tasarlanan deney planı kapsamında *ADAMTS-2* geninin yalnızca en uzun konstraktının [-656/+110] bazal aktivitesine bakılmış ve aktif olduğu sonucuna varılmıştır.



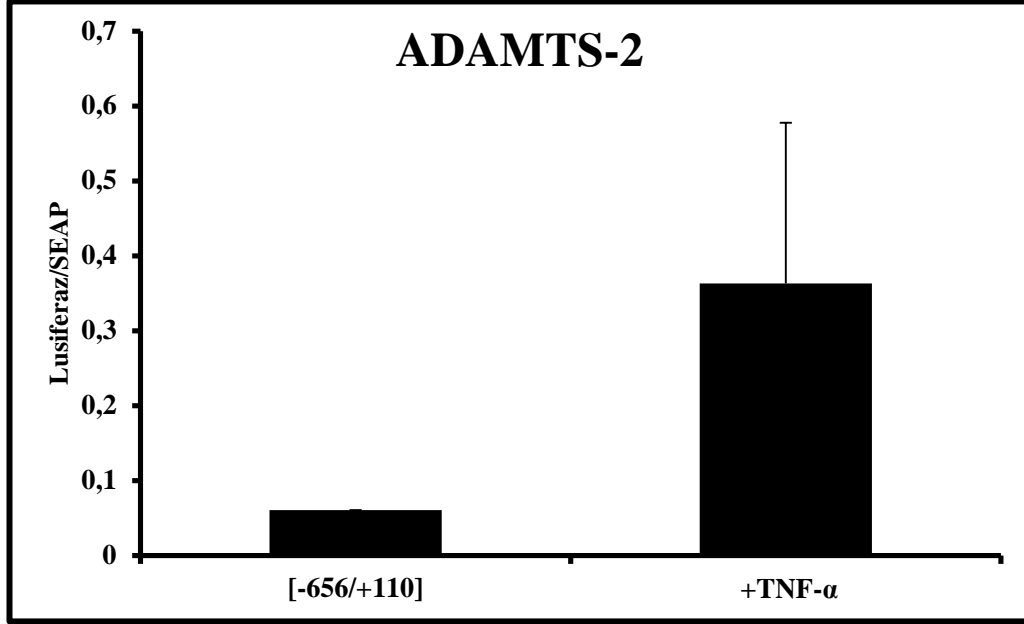
Şekil 4.15: İnsan *ADAMTS-3* promotorunun bazal aktivitesi.

İnsan *ADAMTS-3* promotorunun bazal aktivitesinin belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilmiş olan transient transfeksiyon deneylerinde en düşük transkripsiyonel aktivitenin 1380 bç'lik [-1340/+40] promotor konstraktında görüldüğü, bunun yanı sıra en yüksek transkripsiyonel aktiviteninse 171 bç'lik [-131/+40] promotor konstraktında olduğu belirlenmiştir.

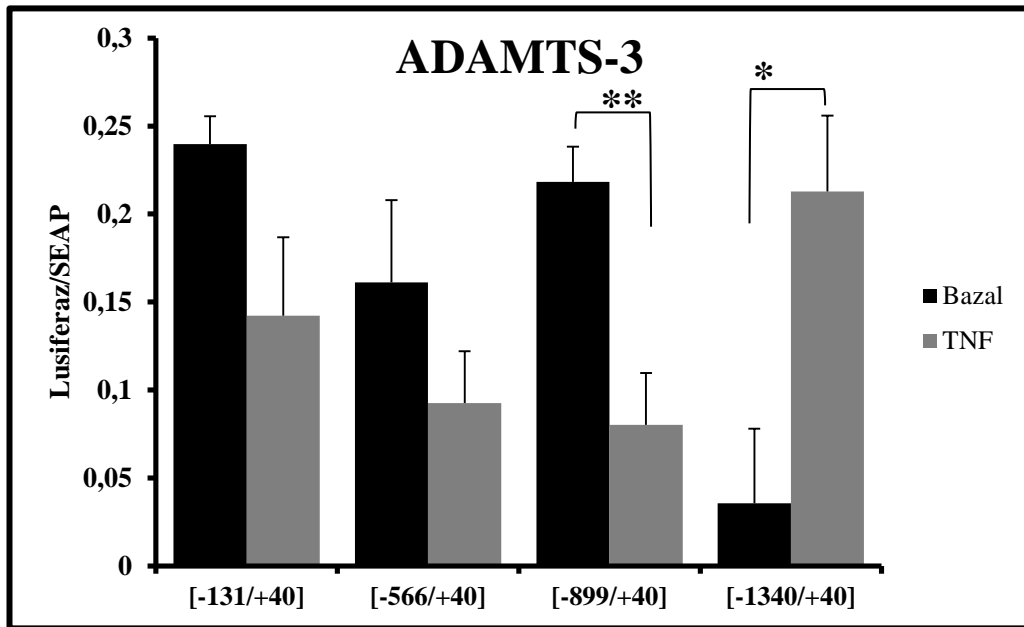
4.3.4 *TNF- α* sitokininin İnsan *ADAMTS-2* ve *ADAMTS-3* promotoruna etkisinin belirlenmesi

İnsan *ADAMTS-2* ve *ADAMTS-3* genlerinin bazal promotor aktivitesi Bölüm 3.2.4.1'de açıklandığı gibi gerçekleştirilen transient transfeksiyon çalışmalarıyla belirlenmiş, elde edilen sonuçlar *ADAMTS-2* promotoru için Şekil 4.15'de, *ADAMTS-3* promotoru içinse Şekil 4.16'da verilmiştir. *TNF- α* sitokininin İnsan *ADAMTS-2* ve *ADAMTS-3* promotoruna etkisinin tespiti için Bölüm 3.2.4.1'de açıklandığı gibi Saos-2 hücrelerine *ADAMTS-2* ve *ADAMTS-3* promotor parçaları transfekte edilmiş, bunun yanı sıra 10 ng/mL olacak şekilde de *TNF- α* sitokini uygulanmıştır. 48 ve 72 saat olarak belirlenen inkübasyon zamanlarının sonunda transfeksiyon medyumundan 100 μ L alınarak Bölüm 3.2.4.2'de belirtildiği gibi lusiferaz aktivitesi ve Bölüm 3.2.4.3'de belirttiği gibi de SEAP aktivitesi ölçülmüştür.

Daha sonra ölçüm sonucunda elde edilen Lusiferaz değerleri SEAP değerlerine bölünerek aktivasyon tayini gerçekleştirilip, sonuçlar bazal promotor aktiviteleriyle kıyaslanarak Şekil 4.17 ve Şekil 4.18’de verilmiştir.



Şekil 4.16: *TNF- α* sitokininin *ADAMTS-2* promotor aktivitesine etkisi.



Şekil 4.17: *TNF- α* sitokininin *ADAMTS-3* promotor aktivitesine etkisi.

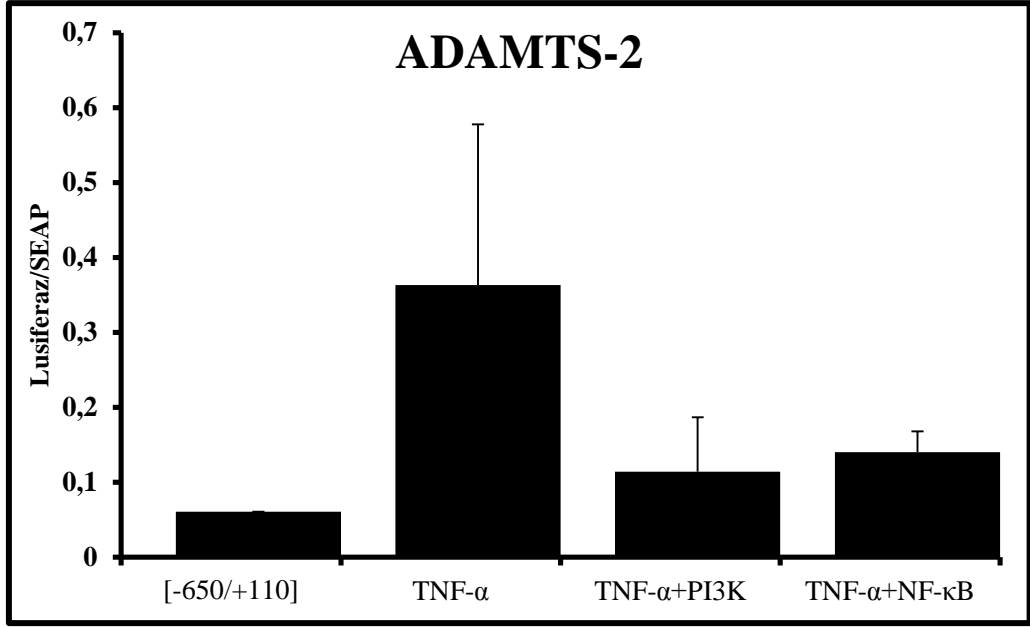
(* $p \leq 0.05-0.01$ Aralığındaki değer, ** $p \leq 0.01$ 'den küçük değer) yıldızlar yanlış konulmuş

Gerçekleştirilen analizler neticesinde *TNF- α* sitokininin *ADAMTS-2*'nin 766 bç'lik [-656/+110] promotor aktivitesini bazal aktivite ile kıyaslandığında yaklaşık 6 kat oranında indüklediği belirlenmiştir.

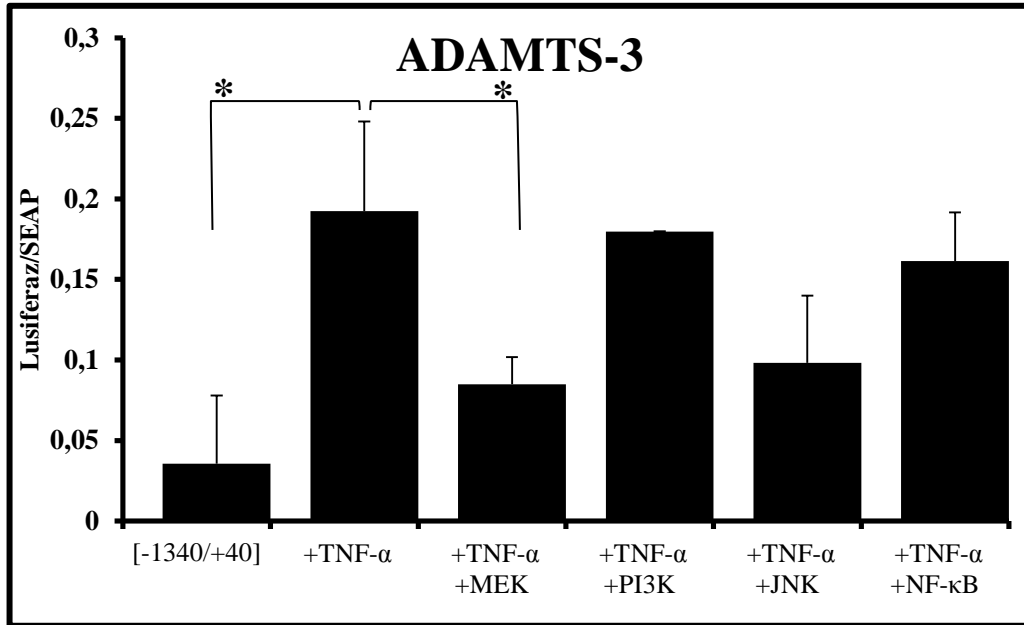
ADAMTS-3 promotoru için gerçekleştirilen analizler neticesinde bazal promotor aktivitesine kıyasla 171 bç'lik, 616 bç'lik ve 939 bç'lik konstraktalarda *TNF- α* sitokininin indükleyici bir etki göstermediği ancak 1380 bç'lik konstrakta yaklaşık 7 kata varan bir indüklenmeye sebep olduğu ve bunun istatistiksel olarak da anlamlı değer taşıdığı belirlenmiştir.

4.3.5 *TNF- α* yolak inhibitörlerinin İnsan *ADAMTS-2* ve *ADAMTS-3* promotorlarına etkisinin belirlenmesi

TNF- α sitokininin İnsan *ADAMTS-2* ve *ADAMTS-3* genlerinin en uzun promotor konstraktlarını upregüle ettiği Bölüm 4.3.4'de anlatılan çalışmalarla belirlendi. Bu regülasyonun hangi hücre içi sinyal iletim yollarını kullanarak gerçekleştirildiğinin belirlenmesi amacıyla Saos-2 hücrelerine promotor konstraktlarının Bölüm 3.2.4.1'de anlatıldığı biçimde transfeksiyonu yapıldı. Bunun yanı sıra 10 ng/mL olacak şekilde *TNF- α* ve Tablo 3.3'de belirtilen konsantrasyonlarda hücre içi sinyal iletim yolak inhibitörleri uygulandı. 48 ve 72 saat olarak belirlenen inkübasyon zamanlarının ardından transfeksiyon medyumundan 100 μ L alınarak Bölüm 3.2.4.2'de belirtildiği gibi lusiferaz aktivitesi ve Bölüm 3.2.4.3'de belirttiği gibi de SEAP aktivitesi ölçüldü. Daha sonra ölçüm sonucunda elde edilen Lusiferaz değerleri SEAP değerlerine bölünerek aktivasyon tayini gerçekleştirilip, *TNF- α* uygulanmış hücrelerden elde edilen değerler bazal promotor aktivitesiyle, yolak inhibitörü uygulanmış hücrelerden elde edilen değerler de *TNF- α* uygulanmış promotor aktiviteleriyle kıyaslanarak sonuçlar Şekil 4.19 ve Şekil 4.20'de verildi.



Şekil 4.18: *TNF- α* yolak inhibitörlerinin *ADAMTS-2* promotor aktivitesine etkisi.



Şekil 4.19: *TNF- α* yolak inhibitörlerinin *ADAMTS-2* promotor aktivitesine etkisi.

(* $p \leq 0.05-0.01$ Aralığındaki değer, ** $p \leq 0.01$ 'den küçük değer)

Gerçekleştirilen analizler neticesinde *TNF- α* sitokininin *ADAMTS-2* geninin 766 bç'lik [-656/+110] promotor aktivitesini arttırıcı etkisinin PI3K ve NF- κ B yolak inhibitörleri uygulandığında yaklaşık olarak sırasıyla 3.2 ve 2.5 kata kadar baskılandığı belirlendi.

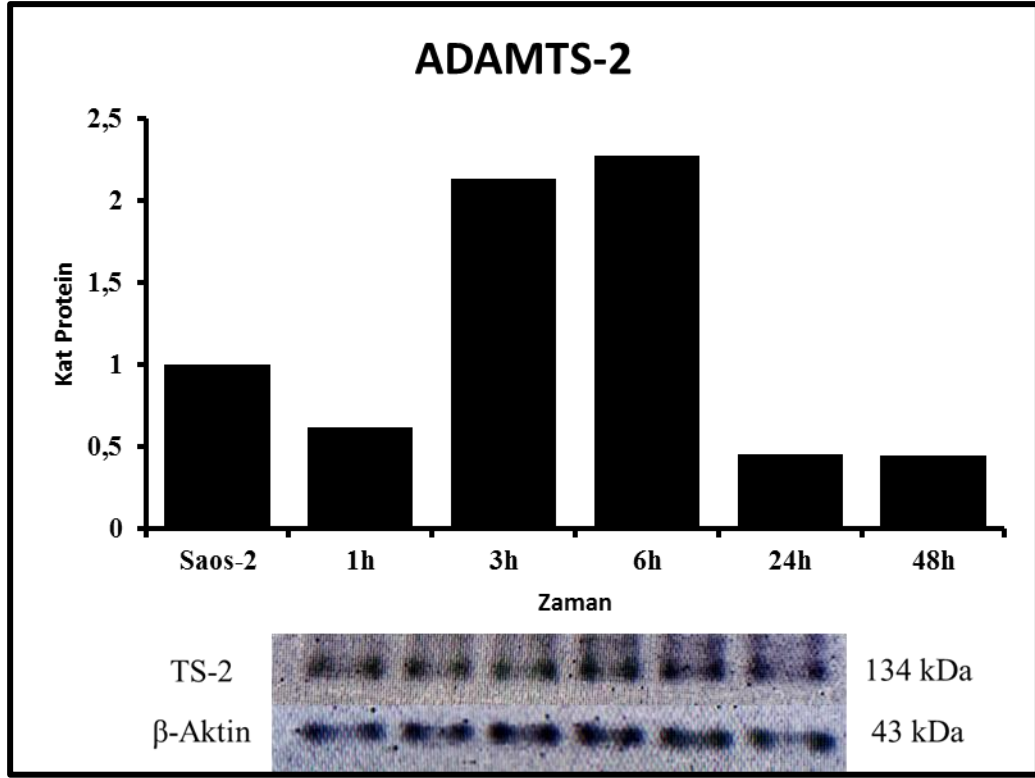
ADAMTS-3 promotoru için gerçekleştirilen analizler neticesinde *TNF- α* sitokininin *ADAMTS-3* geninin 1380 bç'lik [-1340/+40] promotor aktivitesini upregüle edici etkisinin MEK ve JNK yolak inhibitörleri uygulandığında yaklaşık olarak sırasıyla 2.3 ve 2.1 kata kadar baskılandığı, MEK yolundaki baskılanmanın istatistiksel olarak da anlamlı değer taşıdığı belirlenmiştir.

4.4 *TNF- α* 'nın İnsan *ADAMTS-2* ve *ADAMTS-3* Genlerinin Protein Seviyesindeki Ekspresyonlarını Belirleme Çalışmaları

4.4.1 *TNF- α* 'nın İnsan *ADAMTS-2* ve *ADAMTS-3* Genlerinin Protein Seviyesindeki Ekspresyonlarının Western Blot ile Tespit Edilmesi

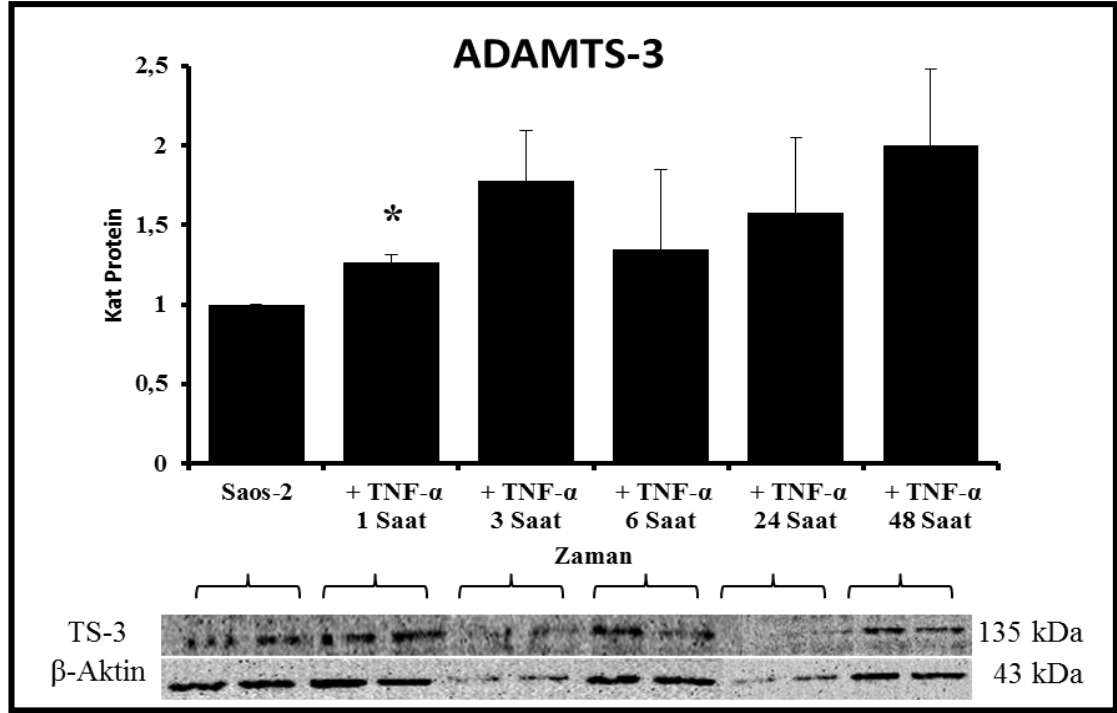
İnsan *ADAMTS-2* ve *ADAMTS-3* genlerinin Saos-2 hücre hattında *TNF- α* uygulandığında oluşacak protein seviyesindeki ekspresyonunu belirlemek için Bölüm 3.2.2.2'de açıklandığı gibi Saos-2 hücreleri büyütülüp, Bölüm 3.2.5.1.1'de belirtilen şekil ve konsantrasyonda *TNF- α* uygulandıktan sonra Bölüm 3.2.5.1.4'de açıklanan RIPA tamponuyla izolasyon protokolü uygulanmak suretiyle de hücrelerden protein izolasyonu gerçekleştirildi. Deney ve kontrol grupları için protein miktarı 30-50 μ g olacak şekilde eşit olarak ayarlanmış olan ekstraktlar SDS-Poliakrilamid jel elektroforezinde yürütüldü.

Bunu takiben jeldeki proteinler membrana aktarılarak, 1 μ g/mL konsantrasyonda primer *ADAMTS-2* antikoru (ab125226-Abcam), 1:500 oranında primer *ADAMTS-3* antikoru (y058016-Abm) ve 1:5000 oranında ise sekonder antikorla (goat, anti-rabbit) (Ab97069-Abcam) muamele edilerek işaretlendi. ECL sistem kullanılarak ışına otoradyografik olarak belirlendi. Normalizasyon amacıyla aynı membran beta aktin antikoru (Ab8227-Abcam) ile de işaretlenerek İmage J programı ile yoğunluk analizi yapıldı.



Şekil 4.20: *TNF- α* 'nın *ADAMTS-2* genine protein düzeyindeki etkisi.

Yapılan densitometrik analizler sonucunda 10 ng/mL konsantrasyonda uygulanmış olan *TNF- α* 'nın İnsan *ADAMTS-2* geninin protein seviyesindeki ekspresyonunu 3. ve 6. saat dilimlerinde sırasıyla 2,1 ve 2,2 kat indüklediği belirlenmiştir (Şekil 4.20).



Şekil 4.21: *TNF- α* 'nın *ADAMTS-3* genine protein düzeyindeki etkisi.

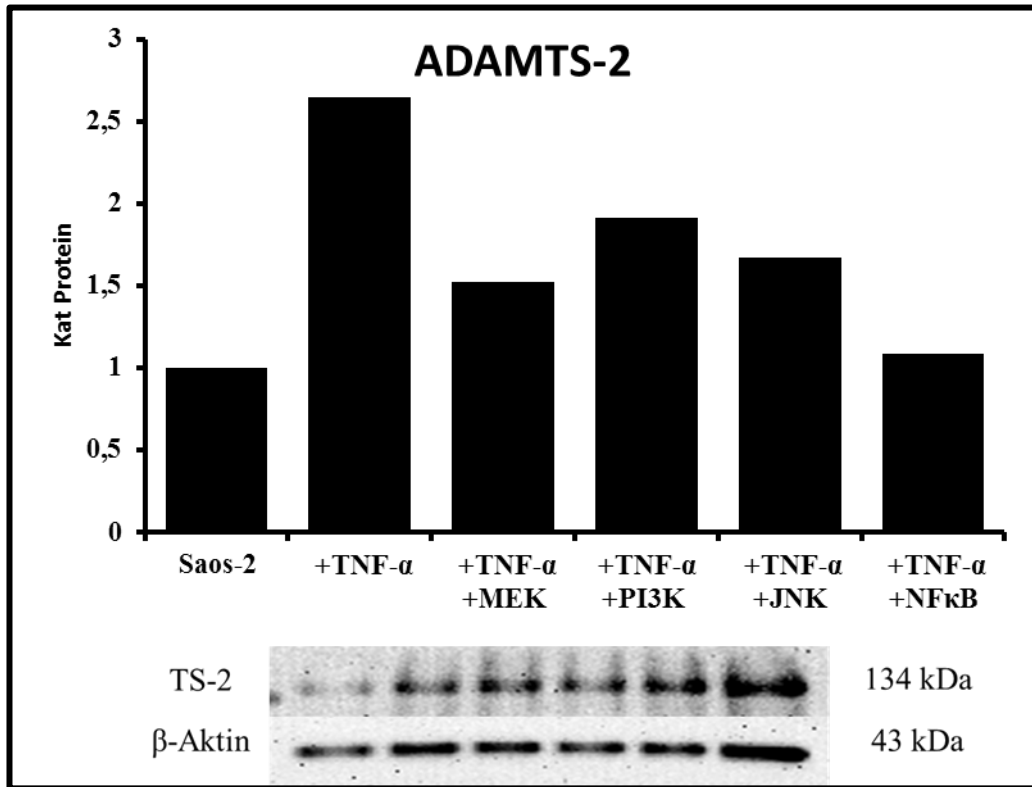
Yapılan densitometrik analizler sonucunda 10 ng/mL konsantrasyonda uygulanmış olan *TNF- α* 'nın İnsan *ADAMTS-3* geninin protein seviyesindeki ekspresyonunu en yükseği 48. saat diliminde olmak üzere tüm saat dilimlerinde arttırdığı ve 3. saattaki artışın da istatistiksel olarak anlamlı değer taşıdığı belirlenmiştir (Şekil 4.21).

4.4.2 *TNF- α* 'nın *ADAMTS-2* ve *ADAMTS-3* Genlerinin Protein Düzeyine Olan Etkisinin Yolak İnhibitörleri Varlığında Western Blot Belirlenmesi

TNF- α sitokininin İnsan *ADAMTS-2* ve *ADAMTS-3* genlerinin protein seviyelerine etki ederken hangi hücre içi sinyal iletim yol ya da yollarını kullandığının belirlenmesi amacıyla İnsan kemik kanseri hücre modeli olan Saos-2 hücreleriyle Bölüm 3.2.5.1.2'de anlatıldığı gibi yolak inhibisyon çalışmaları kuruldu. Bu bağlamda Saos-2 hücrelerine 10 ng/mL olacak şekilde *TNF- α* ve Tablo 3.3'de belirtilen konsantrasyonlarda hücre içi sinyal iletim yolak inhibitörleri uygulandı. Bölüm 3.2.5.1.4'de açıklanan RIPA tamponuyla izolasyon protokolü uygulanarak hücrelerden protein izolasyonu gerçekleştirildi.

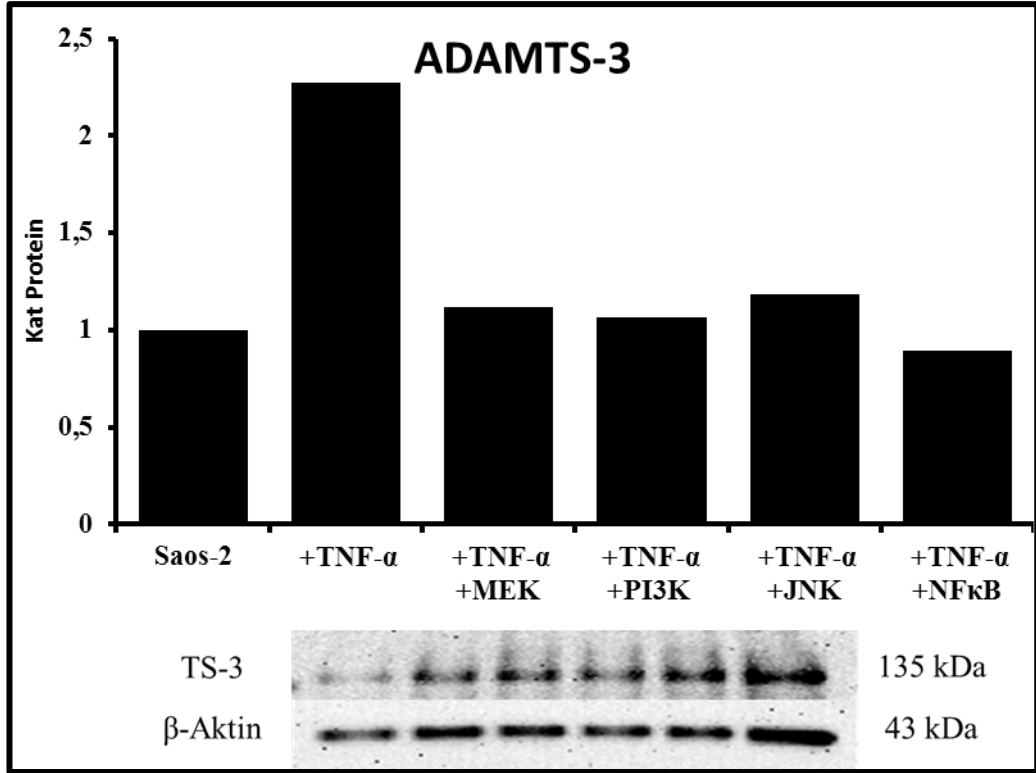
Protein izolasyonu sonucunda izole edilen protein miktarının tayini yapıldı. Deneysel ve kontrol grupları için protein miktarı 30-50 µg olacak şekilde eşit olarak ayarlanıp, protein örnekleri SDS-Poliakrilamid jel elektroforezinde yürütüldü.

Bunu takiben jeldeki proteinler membrana aktarılıp, 1 µg/mL konsantrasyonda primer *ADAMTS-2* antikoruna (ab125226-Abcam), 1:500 oranında primer *ADAMTS-3* antikoruna (y058016-Abm) ve 1:5000 oranında ise sekonder antikorla (goat, anti-rabbit) (Ab97069-Abcam) muamele edilerek işaretlendi. ECL sistem kullanılarak ışımaya otoradyografik olarak belirlendi. Normalizasyon amacıyla aynı membran beta aktin antikoruna (Ab8227-Abcam) ile de işaretlenerek Image J programı ile yoğunluk analizi yapıldı.



Şekil 4.22: *TNF-α*'nın yolak inhibitörlerinin *ADAMTS-2* genine protein düzeyindeki etkisinin gösterimi.

Yapılan densitometrik analizler sonucunda 10 ng/mL konsantrasyonda uygulanmış olan *TNF-α*'nın İnsan *ADAMTS-2* geninin protein seviyesindeki ekspresyonunu indükleyici etkisinin yolak inhibitörleri uygulanan tüm yollarda baskılandığı ve bu baskılanmanın yaklaşık olarak 2.4 kat ile en fazla NFκB yolağında gerçekleştiği belirlenmiştir (Şekil 4.22).



Şekil 4.23: *TNF- α* 'nın yolak inhibitörlerinin *ADAMTS-3* genine protein düzeyindeki etkisinin gösterimi.

Yapılan densitometrik analizler sonucunda 10 ng/mL konsantrasyonda uygulanmış olan *TNF- α* 'nın İnsan *ADAMTS-3* geninin protein seviyesindeki ekspresyonunu indükleyici etkisinin yolak inhibitörleri uygulanan tüm yollarda baskılandığı ve bu baskılanmanın yaklaşık olarak 2.5 kat ile en fazla NF κ B yolağında gerçekleştiği belirlenmiştir (Şekil 4.23).

4.5 İnsan *ADAMTS-2* ve *ADAMTS-3* promotorlarının EMSA deneyleri kullanılarak STAT-3 ve NF κ B transkripsiyon faktörlerinin işlevsel bağlanma analizlerinin tespit edilmesi

Promotor, bir genin transkripsiyonunun başlatıldığı kısımdır. Transkripsiyon faktörleri de genin promotor kısmına bağlanarak gen ekspresyonunun düzenlenmesinde rol oynarlar. Bu bağlamda genin promotor kısmına hangi transkripsiyon faktörlerinin bağlanacağını bilmesi, ilgili genin transkripsiyonel anlamda nasıl regüle edildiğinin anlaşılmasını sağlayacaktır.

Buradan hareketle İnsan ADAMTS-2 ve ADAMTS-3 promotorlarındaki muhtemel transkripsiyon faktörü bağlanma bölgelerine STAT-3 ve NFκB'nin bağlanırlığının tespiti amacıyla Bölüm 3.2.6.1'de açıklandığı biçimde gibi EMSA deneyleri gerçekleştirildi. İnsan kemik kanseri hücre modeli olan 10 ng/mL TNF-α uygulanmış ve uygulama yapılmamış Saos-2 hücrelerinden Bölüm 3.2.6.1.1'de anlatıldığı gibi nükleer ekstraksiyon gerçekleştirildi. EMSA deneylerinde kullanılmak üzere tasarlanmış olan proplar (Tablo 4.3) Terminal Deoksinükleotidil Transferaz enzimi yardımıyla Bölüm 3.2.6.1.2'de açıklandığı biçimde biyotinlendi. Biyotinli proplar, biyotinsiz proplar ve kullanılacak olan transkripsiyon faktörleri Bölüm 3.2.6.1.3'de açıklandığı biçimde anneal edilerek çift zincirli hale getirildi. DNA-protein etkileşimi temeline dayanan EMSA deneyi için DNA ve protein örnekleri yukarıda bahsedildiği gibi hazırlandıktan sonra Bölüm 3.2.6.1.4'de açıklandığı gibi bağlanma reaksiyonu kuruldu. Bağlanma reaksiyonunda biyotinsiz proplar ve transkripsiyon faktörleri, biyotinli proplara göre ADAMTS-2 için 4000 kat ADAMTS-3 içinse 3000 kat fazla olacak biçimde kullanıldı. Bağlanma reaksiyonunun ardından örnekler Tablo 3.16'da belirtilen içeriğe sahip jelde Bölüm 3.2.6.1.4'de açıklandığı gibi yürütüldü. Yürütme işlemi sonrasında Bölüm 3.2.6.1.5'de açıklandığı biçimde örneklerin naylon membrana transferi gerçekleştirildi. Transfer işlemi sonrasında membran kross-link reaksiyonuna tabi tutuldu. Bu bağlamda streç film ile kaplanan membran UV ışığında 15 dakika bekletilerek DNA'nın membrana bağlanması sağlandı. Daha sonrasında membran bloklama tamponu içerisinde oda sıcaklığında 15 dakika boyunca çalkalandı.

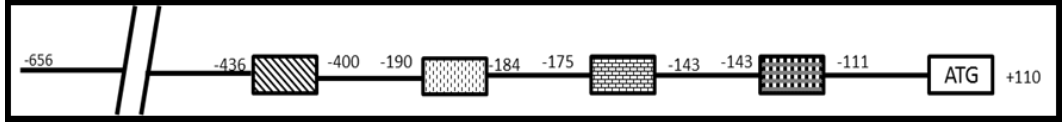
Bu sürenin sonunda LightShift® Chemiluminescent EMSA Kit (Thermo) protokolüne göre bloklama, antikorlama, yıkama ve dengeleme aşamaları gerçekleştirildi. Biyotinle işaretlenmiş DNA-protein kompleksi, ECL Substrat'ı (Thermo, Pierce) kullanılarak UVP görüntüleme cihazında görüntülendi.

Tablo 4.3: EMSA çalışmalarında kullanılmış olan *ADAMTS-2* promotor parçaları ve konsensus problemler ve sahip oldukları bağlanma motifleri

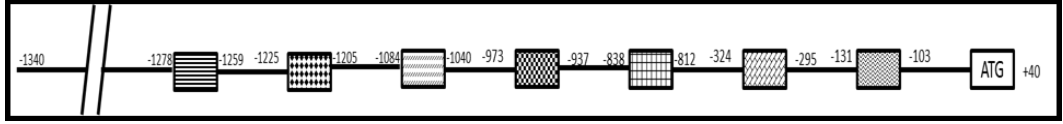
Prob Adı	Dizisi	İçerdiği Bağlanma Motifi
[-143/-111]	5' GCCTCCTCCGCCCGCGCCCTGCGGTGCTGCA 3' 3' CGGAGGAGGCGGGGCGCGGGACGCCACGACGT 5'	E2F
[-175/-143]	5' TCCGCGCTCCCCGCCCCCTCCGCGCCTC 3' 3' AGGCGCGAGGGGCGGGGAGGCGCGGAG 5'	GC, SP1
[-190/-184]	5' CCGCGCCCCGCGCCCCGCGCC 3' 3' GCGCGGGGCGCGGGGCGCGG 5'	TF2B
[-436/-400]	5' CAGGGGGATGCACCCCTTGAATTCCAGGGCTGATGGG 3' 3' GTCCCCCTACGTGGGAACTTAAGTCCCGACTACCC 5'	STAT, NFκB
NFκB	5' AGTTGAGGGGACTTTCCAGGC 3' 5' GCCTGGGAAAGTCCCCTCAACT 3'	Konsensus Dizi
STAT3	5' GATCCTTCTGGGAATTCCTAGA 3' 5' GATCTAGGAATCCAGAAGGATC 3'	Konsensus Dizi

Tablo 4.4: EMSA çalışmalarında kullanılmış olan *ADAMTS-3* promotor parçaları ve konsensus problemler ve sahip oldukları bağlanma motifleri

Prob Adı	Dizisi	İçerdiği Bağlanma Motifi
-131/-103	5'GCTCAAATTTTCATTTTCATTGAAGCAAAG3' 5'CTTTGCTTCAATGAAAATGAAAATTTGAGC3'	STAT
-324/-295	5'ATGGTGCTCGAAAAGCCTCGAAAAGCTGC3' 5'GCAGCTTTTTTCGAGGCTTTTCGAGCACCAT3'	E2F CCAAT
-838/-812	5'TCGGACCCTCCCCCTTCTATAATTAA3' 5'TTAATTATAGGAAGGGGAGGGTCCGA3'	GC-KL- AP-STAT
-973/-937	5'GACTGGTGCCTGGAAGGAGATCACCGGTGGTTAAG3' 5'CTTAACCACGCGGTGATCTCCCTTCCAGGCACCAGTC3'	STAT
-1084/-1040	5'TTAGTTTTAAAAGATACCACGTCTTTTCTTACTCCACCCGGAT3' 5'ATCCGGGTGAGTCAAGGAAAGGACGTGGTATCTTTTAAAATAA3'	Ebox-AP1
-1225/-1205	5'CTAGGATTCCAGCAAACCTCTC3' 5'GAGAGTTTGCTGGAATCCTAG3'	STAT
-1278/-1259	5'TCTGCTTTCTGGAAAGCACCC3' 5'GGTGCTTTCCAGAAAGCAGA3'	STAT
NFκB	5'AGTTGAGGGGACTTTCCAGGC3' 5'GCCTGGGAAAGTCCCCTCAACT3'	Konsensus dizi
STAT	5'GATCCTTCTGGGAATTCCTAGA3' 5'GATCTAGGAATCCAGAAGGATC3'	Konsensus dizi

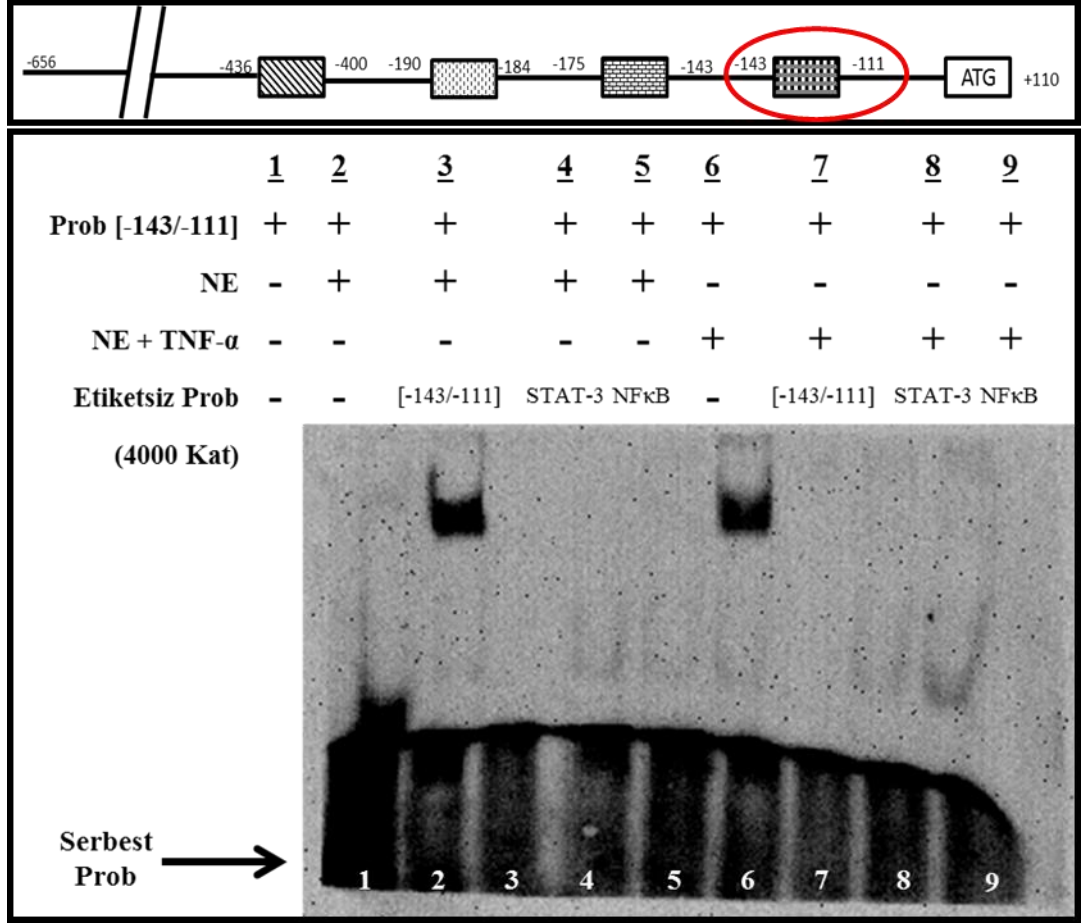


Şekil 4.24: ADAMTS-2 promotoruna ait problemlerin lokalizasyonu



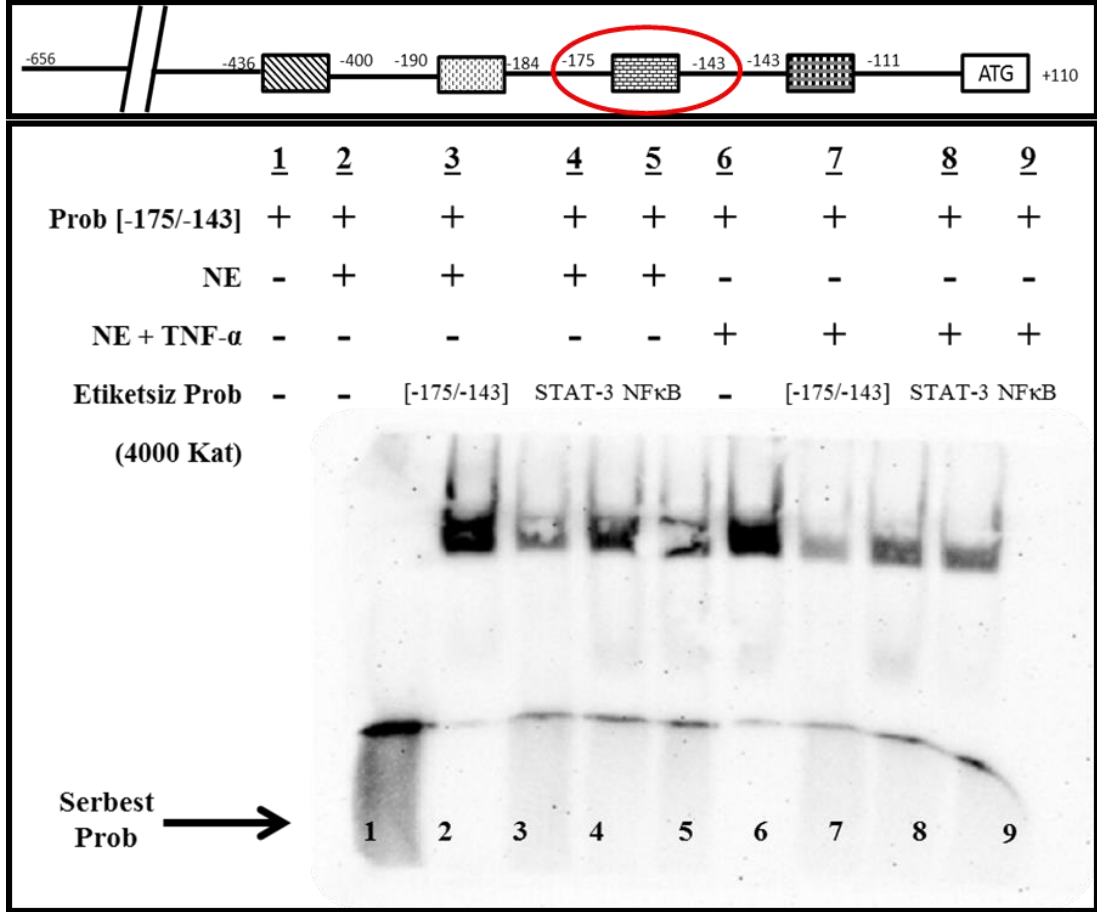
Şekil 4.25: ADAMTS-3 promotoruna ait problemlerin lokalizasyonu

Yapılan EMSA deneyleri sonucunda elde edilen görüntüler analiz edildiğinde; *TNF- α* uygulanmış ve uygulanmamış olan Saos-2 hücrelerinden ekstrakte edilmiş nüklear ekstraktların kullanıldığı ADAMTS-2 [-143/-111] probuyla gerçekleştirilen çalışmada yalnızca biyotinli problemlerin yer aldığı ve yarışma yapılmayan kuyularda bağlanma gerçekleşmesine bağlı olarak kompleks oluşumunun görüldüğü belirlendi. Her iki grupta da biyotinlenmiş ADAMTS-2 [-143/-111] probuyla yarışmaya giren ve 4000 kat oranında kullanılan biyotinsiz probun olduğu kuyularda bant oluşumu gözlenmemiş ve gerçekleşen bağlanmanın spesifik olduğu sonucuna varılmıştır. Bu sonucun yanı sıra transkripsiyon faktörleri bağlanma bölgelerinin tespiti için aynı membran üzerinde biyotinlenmiş ADAMTS-2 [-143/-111] probuyla, biyotinsiz ve 4000 kat oranında kullanılan STAT-3 ve NF κ B transkripsiyon faktörleri yarışmaya tabi tutularak bant oluşmadığı gözlenmiş ve her iki transkripsiyon faktörünün de bölgeye spesifik bağlanma gösterdiği sonucuna ulaşılmıştır (Şekil 4.26).



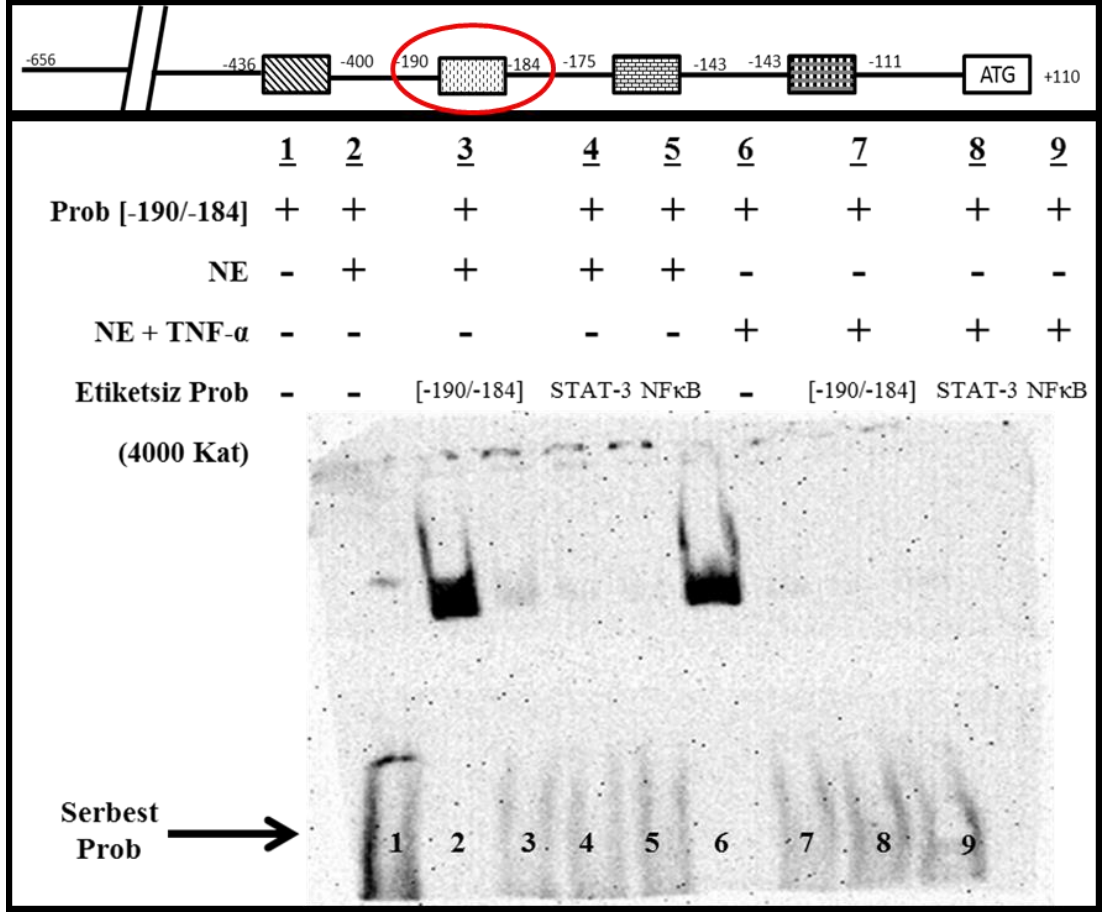
Şekil 4.26: ADAMTS-2 [-143/-111] probunun EMSA görüntüsü.

Saos-2 nüklear ekstraktlarıyla yapılan bir diğer çalışma GC/SP1 motifi içeren ADAMTS-2 [-175/-143] probu kullanılarak gerçekleştirildi. Elde edilen görüntü analiz edildiğinde TNF- α uygulanmış ve uygulanmamış olan Saos-2 hücrelerinden ekstrakte edilmiş nüklear ekstraktların kullanıldığı kuyucuklarda kompleks oluştuğu belirlenmiştir. Elde edilen kompleks görüntüleri, biyotinli ve 4000 kat olarak kullanılan biyotinsiz ADAMTS-2 [-175/-143] probunun yarıştırdığı her iki kuyucukda da azaldığı görülmüştür. Transkripsiyon faktörü bağlanma analizi için aynı membranda biyotinli ADAMTS-2 [-175/-143] probu ve 4000 kat kullanılan STAT-3 ve NF κ B transkripsiyon faktörleri yarışmaya tabi tutulmuş ve yarışma sonucunda hem STAT-3 hem de NF κ B kuyularındaki kompleksin tam olarak kaybolmadığı belirlenmiştir (Şekil 4.27).



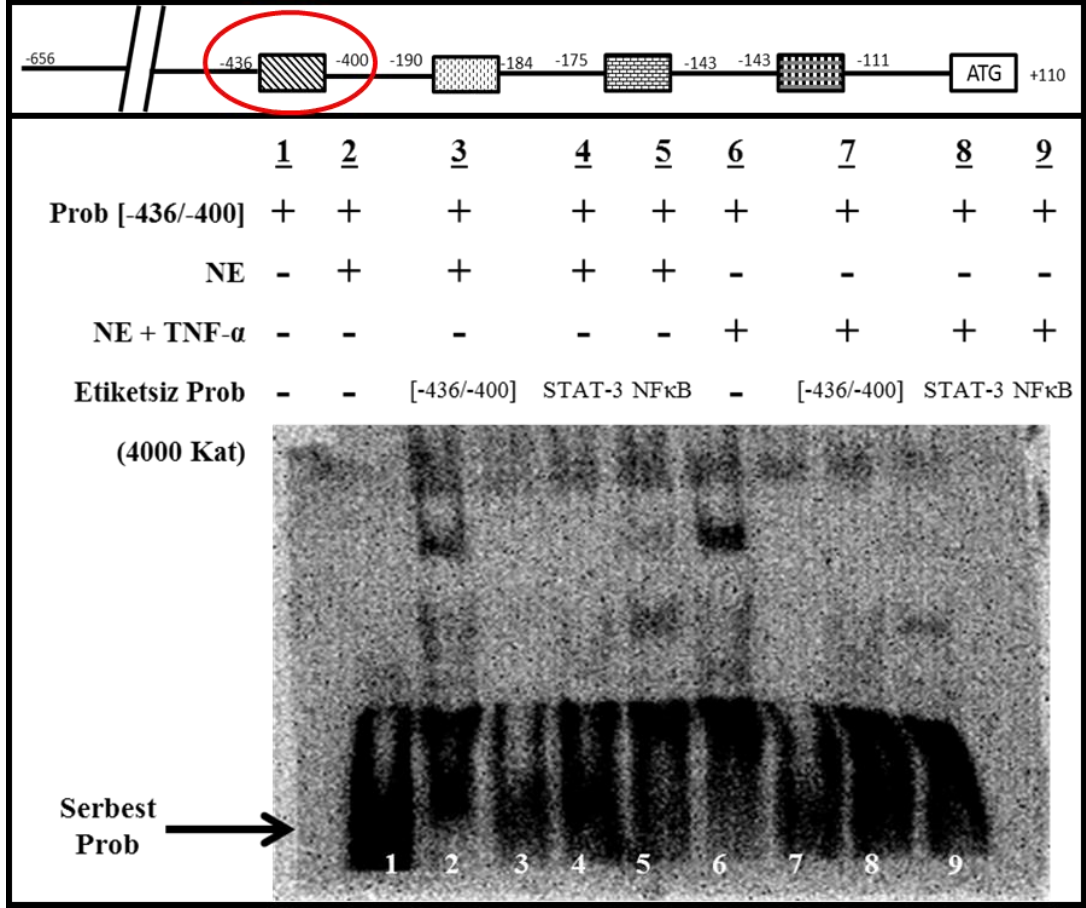
Şekil 4.27: ADAMTS-2 [-175/-143] probunun EMSA görüntüsü.

TNF- α uygulanmış ve uygulanmamış olan Saos-2 hücrelerinden ekstrakte edilmiş nüklear ekstraktları ADAMTS-2 [-190/-184] probu ile yapılan EMSA deneyleri neticesinde iki adet kompleks oluşumu gözlenmiştir. Yalnızca biyotinli problemlerin kullanıldığı nüklear ekstrakt içeren kuyularda kompleks oluştuğu ve bu kompleksin 4000 kat oranında kullanılan biyotinsiz prob ile biyotinli problemlerin yarıştığı kuyularda kaybolduğu belirlenmiştir. Transkripsiyon faktörü bağlanma analizi için aynı membranda biyotinli ADAMTS-2 [-190/-184] probu ve 4000 kat kullanılan STAT-3 ve NF κ B transkripsiyon faktörleri yarışmaya tabi tutulmuş ve yarışma sonucunda hem STAT-3 hem de NF κ B kuyularındaki kompleksin kaybolduğu ve bağlanmanın spesifik olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.28).



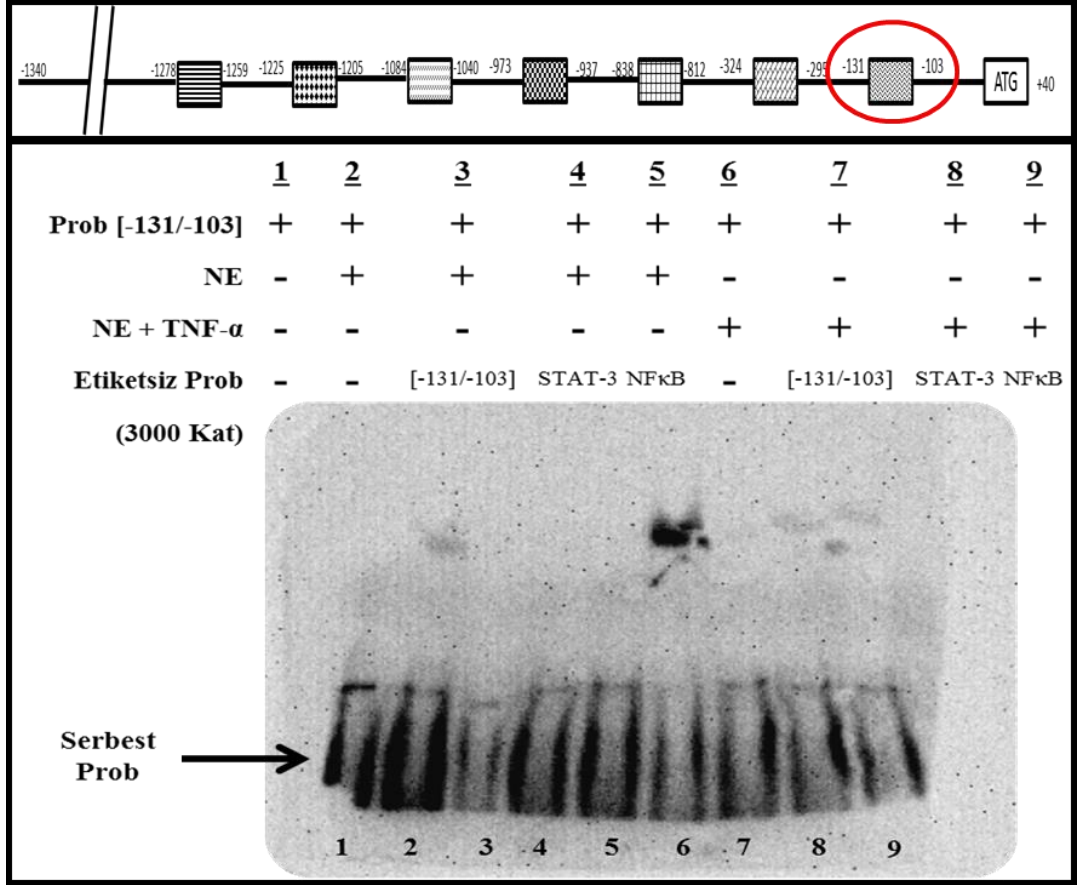
Şekil 4.28: ADAMTS-2 [-190/-184] probunun EMSA görüntüsü.

STAT ve NF κ B bağlanma motifi içeren ADAMTS-2 [-436/-400] probu kullanılarak TNF- α uygulanmış ve uygulanmamış olan nükleer ekstraktlarla EMSA deneyi yapılmıştır. Deney neticesinde TNF- α ve kontrol grubunda kompleks görülmüş ve TNF- α 'nın kontrol grubuna kıyasla bağlanma afinitesini upregüle ettiği belirlenmiştir. Bu kompleks 4000 kat oranında biyotinsiz prob kullanılıp yarıştırdığında kaybolmuştur. Transkripsiyon faktörü bağlanma analizi için aynı membranda biyotinli ADAMTS-2 [-436/-400] probu ve 4000 kat kullanılan STAT-3 ve NF κ B transkripsiyon faktörleri yarışmaya tabi tutulmuş ve kompleksin kontrol grubunda yer alan NF κ B kuyusundaki varlığını zayıflayarak da olsa devam ettirdiği gözlenirken, diğer tüm kuyularda kaybolduğu belirlenmiştir (Şekil 4.29).



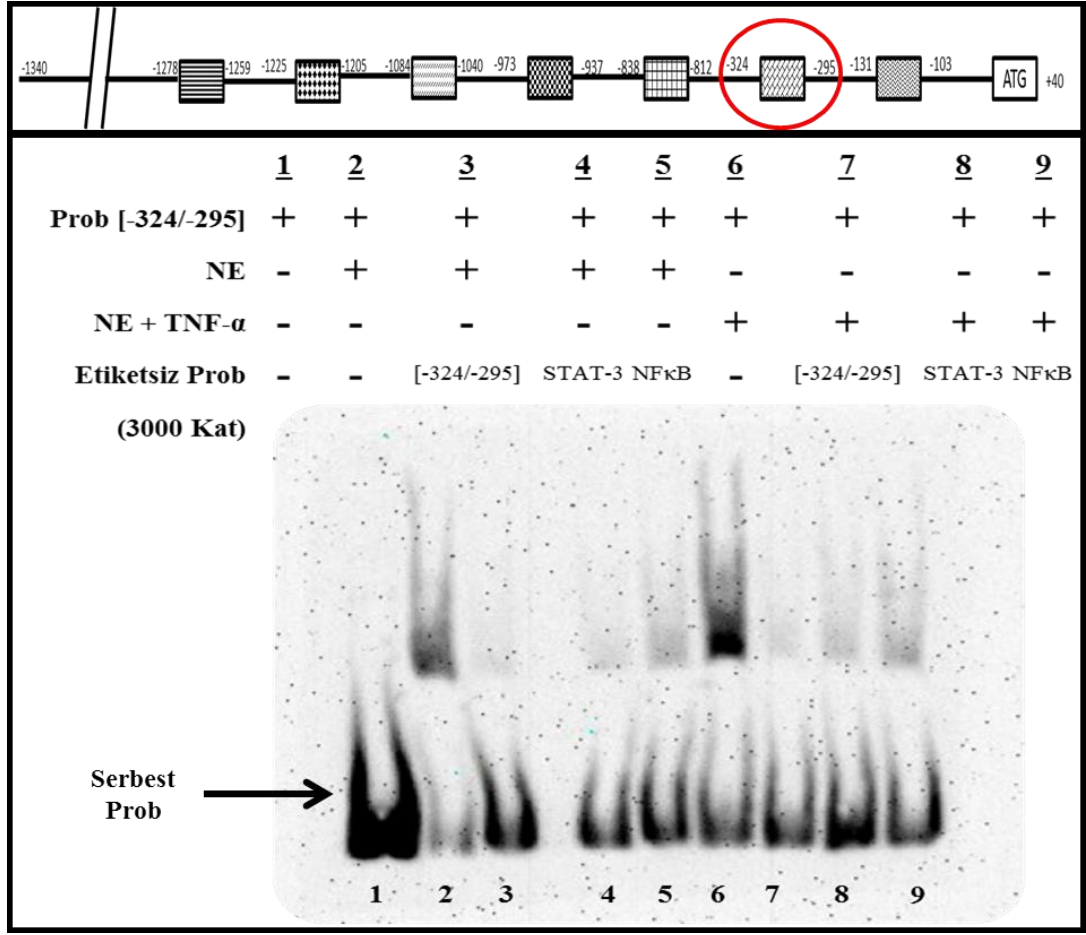
Şekil 4.29: ADAMTS-2 [-436/-400] probunun EMSA görüntüsü.

ADAMTS-3 promotörü için yapılan EMSA deneyleri sonucunda elde edilen görüntüler analiz edildiğinde; *TNF- α* uygulanmış ve uygulanmamış olan Saos-2 hücrelerinden ekstrakte edilmiş nüklear ekstraktların kullanıldığı ADAMTS-3 [-131/-103] probuyla gerçekleştirilen çalışmada *TNF- α* uygulanmış kuyucukta oluşan bantın, uygulanmamış olan kuyucuktakine kıyasla daha kalın olduğu ve *TNF- α* 'nın bağlanma afinitesini upregüle ettiği belirlenmiştir. Her iki grupta da biyotinlenmiş ADAMTS-3 [-131/-103] probuyla yarışmaya giren ve 3000 kat oranında kullanılan biyotinsiz probun olduğu kuyularda bant oluşumu gözlenmemiş ve gerçekleşen bağlanmanın spesifik olduğu sonucuna varılmıştır. Bu sonucun yanı sıra transkripsiyon faktörleri bağlanma bölgelerinin tespiti için aynı membran üzerinde biyotinlenmiş ADAMTS-3 [-131/-103] probuyla, biyotinsiz ve 3000 kat oranında kullanılan STAT-3 ve NF κ B transkripsiyon faktörleri yarışmaya tabi tutularak bant oluşmadığı gözlenmiş ve her iki transkripsiyon faktörünün de bölgeye spesifik bağlanma gösterdiği sonucuna ulaşılmıştır (Şekil 4.30).



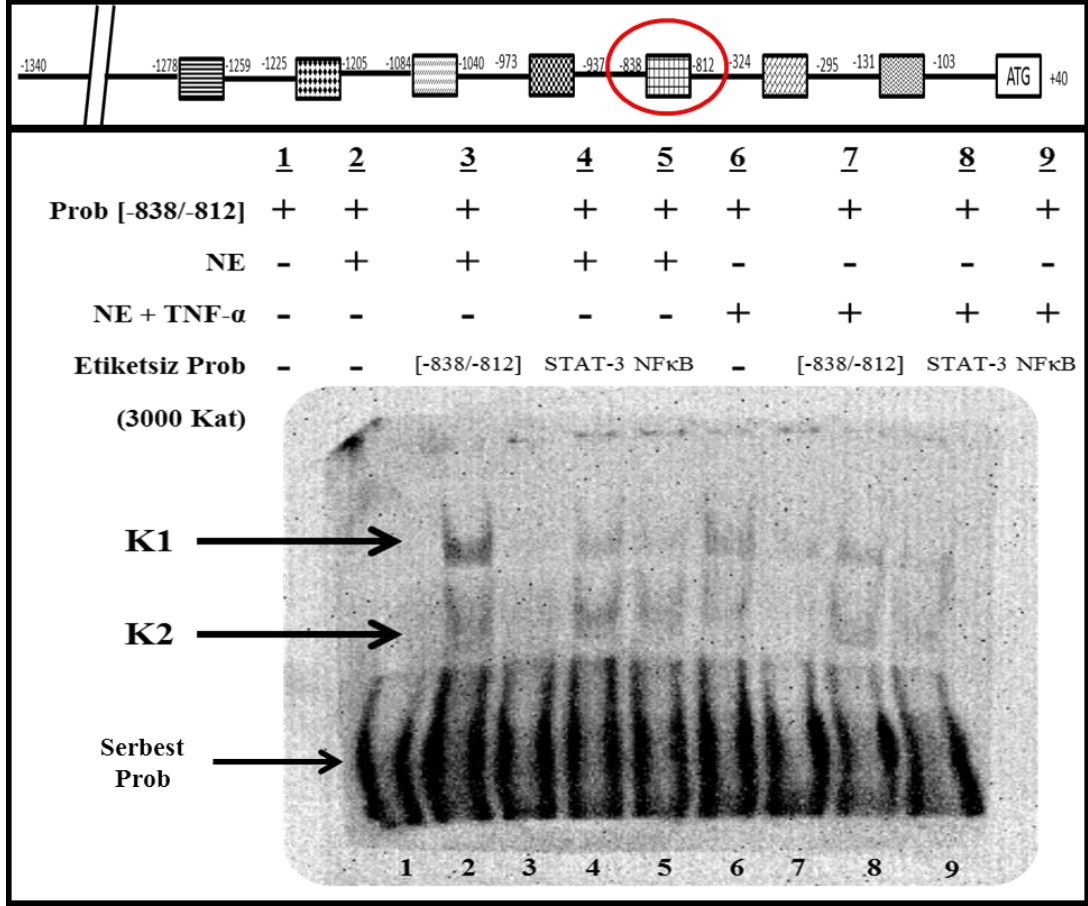
Şekil 4.30: ADAMTS-3 [-131/-103] probunun EMSA görüntüsü.

Saos-2 nüklear ekstraktlarıyla yapılan bir diğer çalışma E2F CCAAT motifi içeren ADAMTS-3 [-324/-295] probu kullanılarak gerçekleştirildi. Elde edilen görüntü analiz edildiğinde TNF- α uygulanmış ve uygulanmamış olan Saos-2 hücrelerinden ekstrakte edilmiş nüklear ekstraktların kullanıldığı kuyucuklarda kompleks oluştuğu ve oluşan bu kompleks sonucu ortaya çıkan bantın TNF- α uygulanmış olan kuyucukta daha kalın olarak görüldüğü ve TNF- α 'nın bağlanma afinitesini upregüle ettiği belirlenmiştir. Elde edilen kompleks görüntüleri, biyotinli ve 3000 kat olarak kullanılan biyotinsiz ADAMTS-3 [-324/-295] probunun yarıştırdığı her iki kuyucukta da kaybolmuş ve gerçekleşen bağlanmanın spesifik olduğu sonucuna varılmıştır. Transkripsiyon faktörü bağlanma analizi için aynı membranda biyotinli ADAMTS-3 [-324/-295] probu ve 3000 kat kullanılan STAT-3 ve NF κ B transkripsiyon faktörleri yarışmaya tabi tutulmuş ve yarışma sonucunda hem STAT-3 hem de NF κ B kuyularındaki kompleksin tam olarak kaybolmadığı belirlenmiştir (Şekil 4.31).



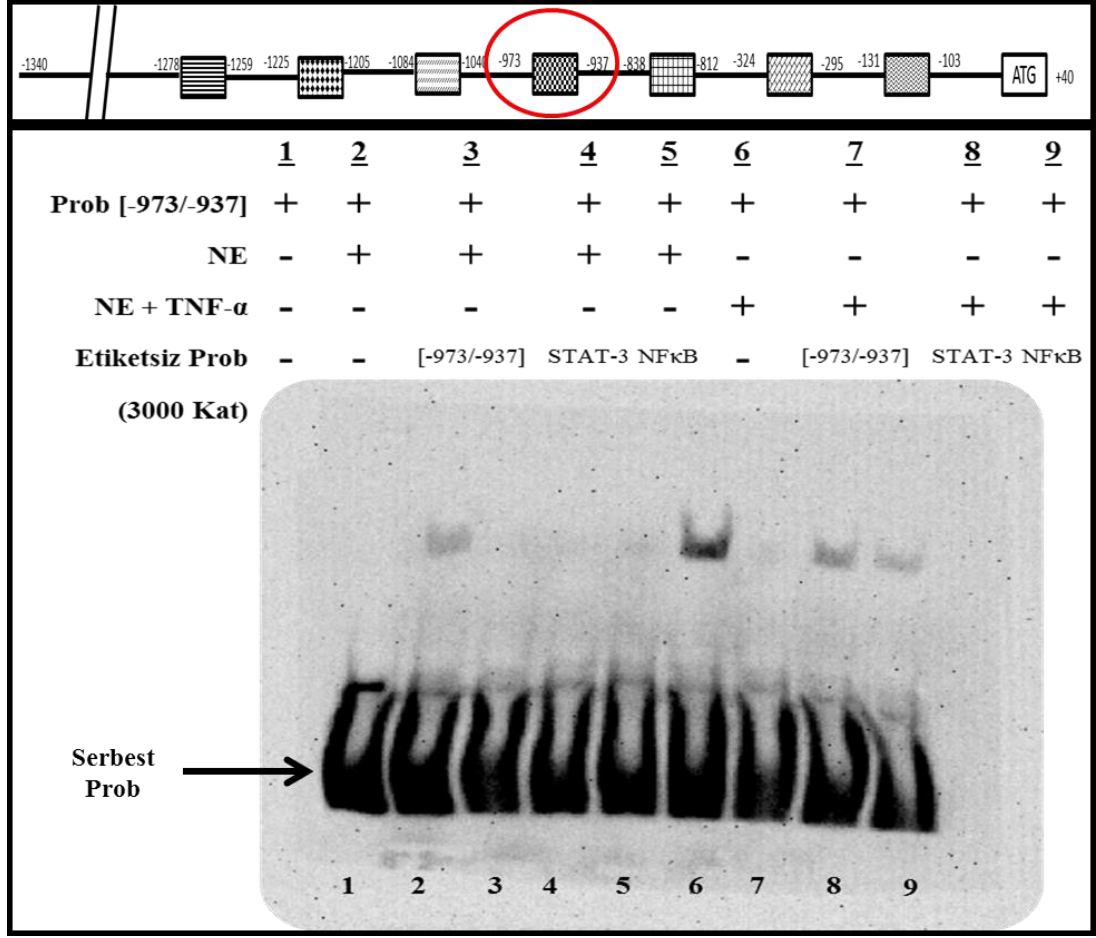
Şekil 4.31: ADAMTS-3 [-324/-295] probunun EMSA görüntüsü.

TNF-α uygulanmış ve uygulanmamış olan Saos-2 hücrelerinden ekstrakte edilmiş nüklear ekstraktları ADAMTS-3 [-838/-812] probu ile yapılan EMSA deneyleri neticesinde iki adet kompleks oluşumu gözlenmiştir. Yalnızca biyotinli problemlerin kullanıldığı nüklear ekstrakt içeren kuyularda kompleks oluştuğu ve bu kompleksin 3000 kat oranında kullanılan biyotinsiz prob ile biyotinli problemlerin yarıştığı kuyularda kaybolduğu belirlenmiştir. Transkripsiyon faktörü bağlanma analizi için aynı membranda biyotinli ADAMTS-3 [-838/-812] probu ve 3000 kat kullanılan STAT-3 ve NFκB transkripsiyon faktörleri yarışmaya tabi tutulmuş ve yarışma sonucunda hem STAT-3 hem de NFκB kuyularındaki kompleksin tam olarak kaybolmadığı belirlenmiştir (Şekil 4.32).



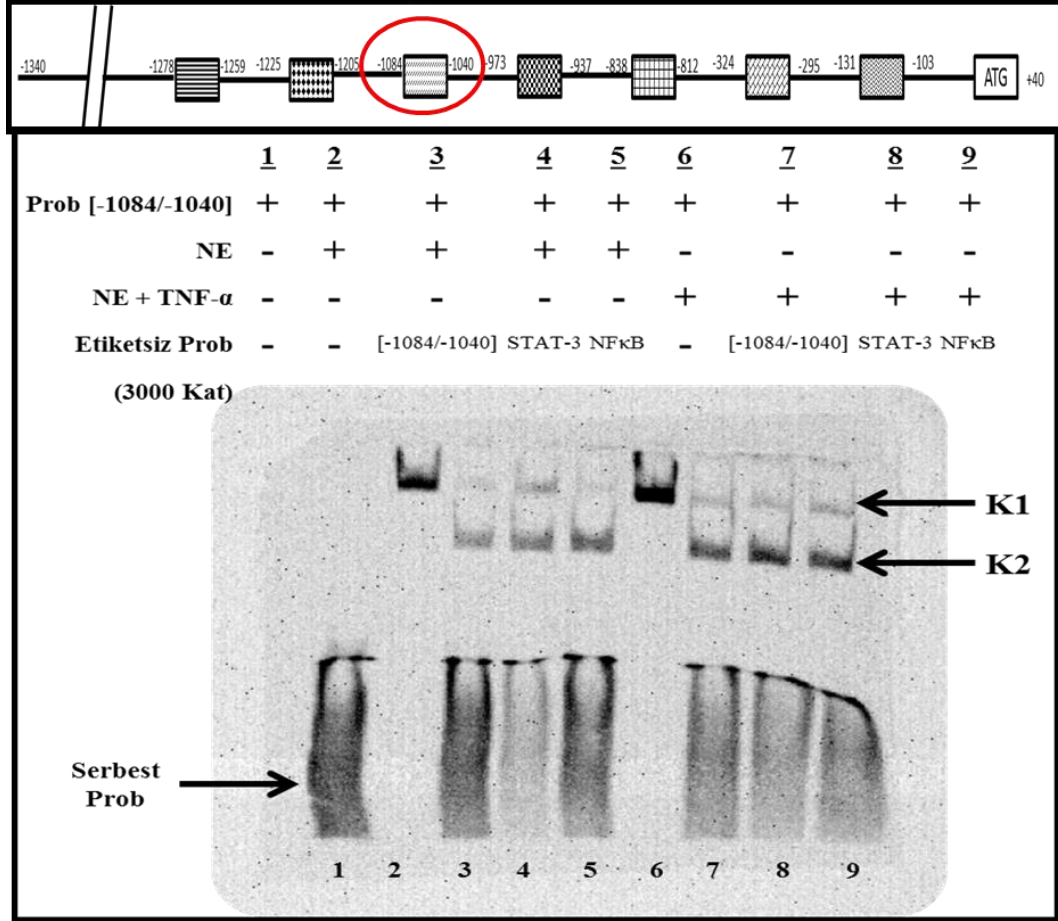
Şekil 4.32: *ADAMTS-3* [-838/-812] probunun EMSA görüntüsü.

STAT motifi içeren *ADAMTS-3* [-973/-937] probu kullanılarak *TNF- α* uygulanmış ve uygulanmamış olan nüklear ekstraktlarla EMSA deneyi yapılmıştır. Deney neticesinde *TNF- α* ve kontrol grubunda kompleks görülmüş ve *TNF- α* 'nın kontrol grubuna kıyasla bağlanma afinitesini upregüle ettiği belirlenmiştir. Bu kompleks 3000 kat oranında biyotinsiz prob kullanılıp yarıştırdığında kaybolmuştur. Transkripsiyon faktörü bağlanma analizi için aynı membranda biyotinli *ADAMTS-3* [-973/-937] probu ve 3000 kat kullanılan STAT-3 ve NF κ B transkripsiyon faktörleri yarışmaya tabi tutulmuş ve kompleksin kontrol grubu kuyularında kaybolurken *TNF- α* uygulanmış kuyularda kaybolmadığı belirlenmiştir (Şekil 4.33).



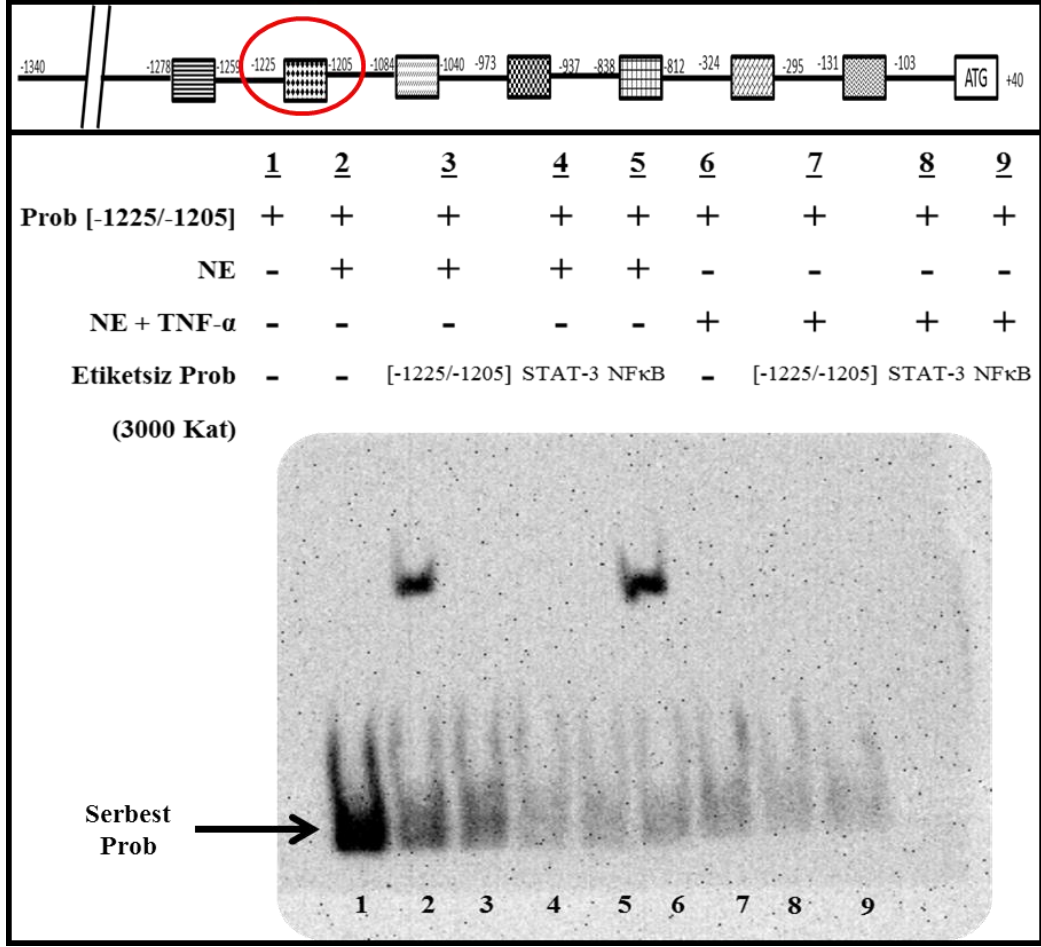
Şekil 4.33: *ADAMTS-3* [-973/-937] probunun EMSA görüntüsü.

Ebox-AP1 motifi içeren *ADAMTS-3* [-1084/-1040] probu kullanılarak *TNF-α* uygulanmış ve uygulanmamış olan nüklear ekstraktlarla yapılan EMSA deneyinde iki adet kompleks oluşumu gözlenmiştir. *TNF-α* ve kontrol grubunda kompleks görülmüş ve *TNF-α*'nın kontrol grubuna kıyasla bağlanma afinitesini upregüle ettiği belirlenmiştir. Bu kompleks 3000 kat oranında biyotinsiz prob kullanılıp yarıştırdığında bant kalınlığının azalış gösterdiği tespit edilmiştir. Transkripsiyon faktörü bağlanma analizi için aynı membranda biyotinli *ADAMTS-3* [-1084/-1040] probu ve 3000 kat kullanılan STAT-3 ve NFκB transkripsiyon faktörleri yarışmaya tabi tutulmuş ve kompleksin tam olarak kaybolmadığı belirlenmiştir (Şekil 4.34).



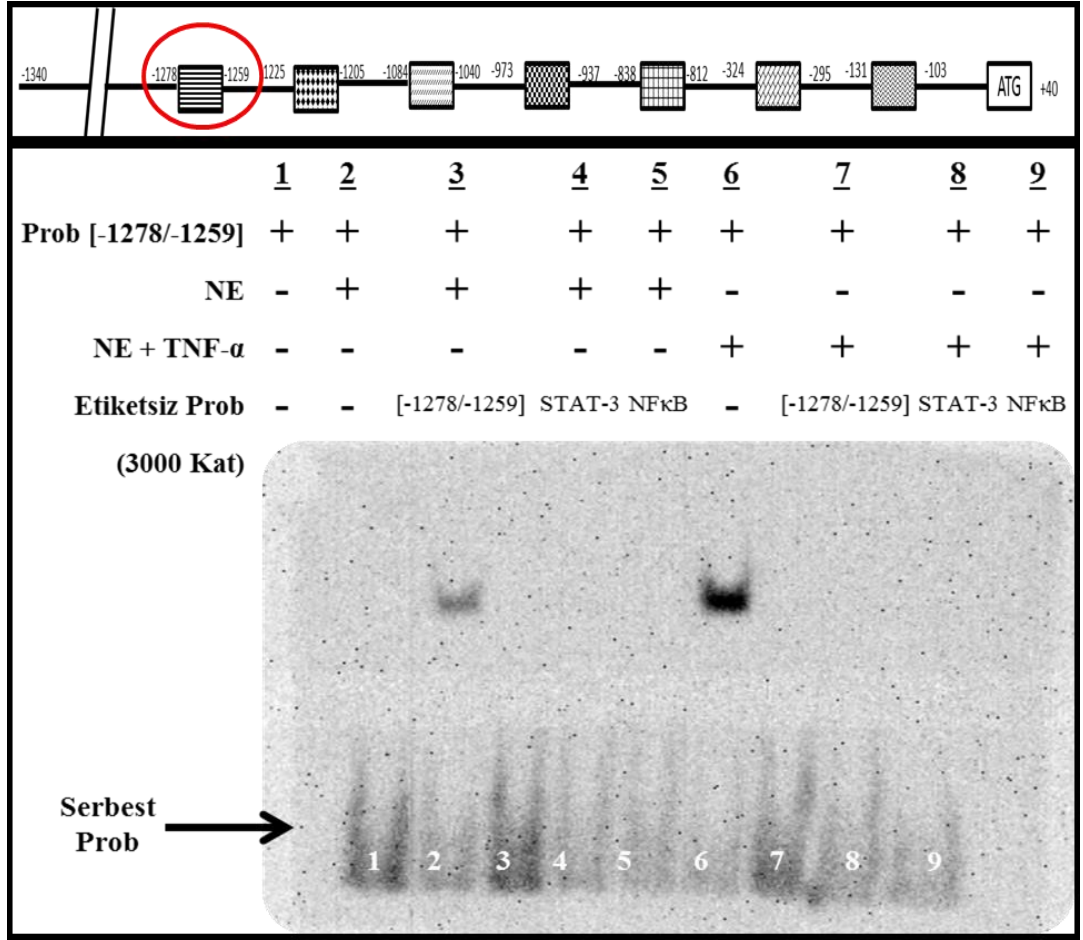
Şekil 4.34: ADAMTS-3 [-1084/-1040] probunun EMSA görüntüsü.

STAT motifi içeren ADAMTS-3 [-1225/-1205] probu kullanılarak *TNF-α* uygulanmış ve uygulanmamış olan nükleer ekstraktlarla EMSA deneyi yapılmıştır. *TNF-α* ve kontrol grubunda kompleks görülmüş ve *TNF-α*'nın kontrol grubuna kıyasla bağlanma afinitesini upregüle ettiği belirlenmiştir. Bu kompleks 3000 kat oranında biyotinsiz prob kullanılıp yarıştırdığında oluşan kompleksin kaybolduğu tespit edilmiştir. Transkripsiyon faktörü bağlanma analizi için aynı membranda biyotinli ADAMTS-3 [-1225/-1205] probu ve 3000 kat kullanılan STAT-3 ve NFκB transkripsiyon faktörleri yarışmaya tabi tutularak bant oluşmadığı gözlenmiş ve her iki transkripsiyon faktörünün de bölgeye spesifik bağlanma gösterdiği sonucuna ulaşılmıştır (Şekil 4.35).



Şekil 4.35: *ADAMTS-3* [-1225/-1205] probunun EMSA görüntüsü.

STAT motifi içeren *ADAMTS-3* [-1278/-1259] probu kullanılarak *TNF- α* uygulanmış ve uygulanmamış olan nükleer ekstraktlarla EMSA deneyi yapılmıştır. *TNF- α* ve kontrol grubunda kompleks görülmüş ve *TNF- α* 'nın kontrol grubuna kıyasla bağlanma afinitesini upregüle ettiği belirlenmiştir. Bu kompleks 3000 kat oranında biyotinsiz prob kullanılıp yarıştırdığında oluşan kompleksin kaybolduğu tespit edilmiştir. Transkripsiyon faktörü bağlanma analizi için aynı membranda biyotinli *ADAMTS-3* [-1278/-1259] probu ve 3000 kat kullanılan STAT-3 ve NF κ B transkripsiyon faktörleri yarışmaya tabi tutularak bant oluşmadığı gözlenmiş ve her iki transkripsiyon faktörünün de bölgeye spesifik bağlanma gösterdiği sonucuna ulaşılmıştır (Şekil 4.36).



Şekil 4.36: ADAMTS-3 [-1278/-1259] probunun EMSA görüntüsü.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Kollajenler, ECM'de %30'luk bulunma oranıyla en bol bulunan lifli proteinler olup ağırlıklı olarak fibroblastlar tarafından sekrete edilirler [18]. Kollajenler; gerilme kuvveti sağlar, hücre yapışmasını düzenler, kemotaksiyi ve göçü desteklemekle birlikte doğrudan doku gelişimini de sağlar [20]. Kollajenler, üç sarmal oluşumundan önce hidroksilasyon, glikosilasyon ve disülfid köprülerin oluşumunun gerçekleştiği endoplazmik retikulumda translasyon sonrası düzeyde yaygın olarak modifiye edilirler. Fibriller Kollajenler, üçlü sarmal domainin her bir ucunda N ve C propeptidleri içeren prokollajenler olarak sentezlenir. Fibrilogenез için C propeptidlerin uzaklaştırılması gerekir. C-propeptidler, BMP-1 / tolloid proteinazlarına özdeş olan prokollajen C-proteinazlar ve Furin proteinleri tarafından kesilerek uzaklaştırılır [33]. N-propeptidler ise, dokunun yeniden yapılandırılması, pıhtılaşma, anjiyogenez, ECM'nin degradasyonu, metastaz ve invazyon gibi olaylarda etkinlik gösteren *ADAMTS* gen ailesi üyeleri olan *ADAMTS-2*, *ADAMTS-3* ve *ADAMTS-14* proteinazlarına özdeş olan prokollajen N-proteinazlar ile kesilirler [47].

Vücutta bu denli önemli görevlere sahip olan *ADAMTS-2* ve *ADAMTS-3* ile ilgili transkripsiyonel regülasyon anlamında bazı çalışmalar mevcut olsa da bu regülasyonun *TNF-α* aracılığında nasıl gerçekleştiği bildiren bir çalışma mevcut değildir. Literatürdeki mevcut olan eksikliği giderebilmek adına planlanan bu tez çalışmasında temel olarak osteosarkoma hücre modelinde (Saos-2) *TNF-α*'nın *ADAMTS-2* ve *ADAMTS-3* genlerine mRNA, protein, transkripsiyonel aktivite ve transkripsiyonel regülasyon düzeyindeki etkisinin belirlenmesi, ikinci olarak da spesifik yolak inhibitörlerinin kullanılmasıyla *TNF-α*'nın *ADAMTS-2* ve *ADAMTS-3* mRNA ve protein düzeyindeki ekspresyonlarının yanı sıra transkripsiyonel aktivitesine olan etkisini hücre içinde hangi yol ya da yolları kullanarak gösterdiğinin aydınlatılması amaçlanmıştır.

Bu amaç doğrultusunda ilk olarak Saos-2 hücreleri büyütülüp, pasajlanarak deney kurulması için hazır hale getirilmiştir. Daha sonra hücelere 10 ng/mL *TNF- α* uygulanmış ve belirli inkübasyon zamanlarının neticesinde hücreler buldukları yüzeyden kaldırılarak RNA ve protein izolasyonu için hazır hale getirilmişlerdir. İzole edilen örnekler; RNA için Gerçek zamanlı PCR, protein için ise western blot çalışmalarında kullanılmışlardır. Deneylerden elde edilmiş olan veriler doğrultusunda *TNF- α* 'nın *ADAMTS-2* ve *ADAMTS-3* mRNA ve protein seviyesindeki ifadesini indüklediği belirlenmiştir.

Sitokinler hücre içerisinde etki gösterirken hücre içi sinyal iletim yollarını kullanırlar. *TNF- α* 'nın *ADAMTS-2* ve *ADAMTS-3* mRNA ve protein ekspresyonu seviyesinde oluşturduğu indüklenmeyi hangi hücre içi sinyal iletim yol ya da yollarıyla gerçekleştirdiğinin belirlenmesi amacıyla büyütülüp, pasajlanarak deneye hazır hale getirilen Saos-2 hücrelerine Tablo 3.3'de belirtilen konsantrasyonlarda MEK, PI3K, JNK ve NF κ B yollarının inhibitörleri *TNF- α* ile birlikte uygulanmış ve hücrelerden RNA ve protein izolasyonu yapılmıştır. Gerçek zamanlı PZR ve western blot çalışmaları neticesinde *TNF- α* *ADAMTS-2* ve *ADAMTS-3* genlerinin mRNA ve protein seviyesindeki ekspresyonlarını regüle ederken MEK, PI3K, JNK ve NF κ B yollarını kullandığı tespit edilmiştir.

Transkripsiyonel etkinlik belirleme çalışmaları kapsamında da klonlaması Dr. Öğr. Üy. Meltem ALPER tarafından gerçekleştirilen *ADAMTS-2* promotor konstraktları ve klonlaması Dr. Ayşe Tuğşen AYDEMİR tarafında gerçekleştirilen *ADAMTS-3* promotor konstraktları kullanıldı. Öncelikli olarak pMET Luc Reporter vektörüne klonlanan bu parçaların maxi prepleri gerçekleştirildi. Daha sonra 12 kuyucuklu plakalara bölünmüş hücelere transient transfeskiyon metoduyla aktarıldı. Belirlenen inkübasyon sürecinin sonunda Lusiferaz ve SEAP etkinliği ölçüldü. Bu ölçüm neticesinde tüm konstraktların bazal bakımdan aktivite gösterdiği belirlendi. *TNF- α* 'nın *ADAMTS-2* ve *ADAMTS-3* promotorlarının transkripsiyonel aktivitesine olan etkisinin belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilen transient transfeskiyon çalışmaları neticesinde *ADAMTS-2* ve *ADAMTS-3* promotorunu en uzun konstraktlarında bazal aktiviteye göre bir indüklenmeye sebep olduğu belirlendi.

TNF- α 'nın *ADAMTS-2* ve *ADAMTS-3* promotorlarını transkripsiyonel aktivite anlamında indüklerken hangi hücre içi sinyal iletimi yol veya yollarını kullandığını tespit edilmesi amacıyla *ADAMTS-2* promotorunun en uzun konstraktına PI3K ve NF κ B inhibitörleri, *ADAMTS-3* promotorunun en uzun konstraktına ise MEK, PI3K, JNK ve NF κ B yollarının inhibitörleri *TNF- α* ile birlikte uygulandı. Belirlenen inkübasyon sürecinin sonunda Lusiferaz ve SEAP etkinliği ölçüldü. Bu ölçüm sonucunda *TNF- α* aracılı *ADAMTS-2* promotor aktivitesi uygulanan her iki yolk inhibitöründen etkilenip baskılanırken, *TNF- α* aracılı *ADAMTS-3* promotor aktivitesi uygulanan yolk inhibitörlerinden yalnızca MEK ve JNK tarafından baskılandığı ve bu yollar üzerinde regüle olduğu belirlenmiştir.

Moleküler biyoloji ve genetikte transkripsiyonel regülasyon; bir hücrenin, DNA'nın RNA'ya dönüşümünü kontrol ederek genin aktivitesini düzenlediği yoldur. Bir gen, transkribe edilen RNA kopyalarının sayısının değiştirilmesinden, genin ne zaman transkribe edildiğinin zamansal kontrolüne kadar çeşitli şekillerde düzenlenir. Transkripsiyonun düzenlenmesi tüm canlı organizmalarda hayati bir süreçtir. Transkripsiyonel regülasyon, transkripsiyon faktörleri ve çeşitli mekanizmalarla üretilen RNA miktarını hassas bir şekilde ayarlamak için çalışan diğer proteinler tarafından yönetilir [159].

Gen düzenlemesinin büyük bir kısmı, polimerazın bağlanmasını ya indükleyen ya da inhibe eden transkripsiyon faktörleri vasıtasıyla meydana gelir [162]. Moleküler biyolojide bir transkripsiyon faktörü (TF) (veya sekansa özgü DNA bağlama faktörü), spesifik bir DNA sekansına bağlanarak genetik bilginin DNA'dan mesajcı RNA'ya transkripsiyon oranını kontrol eden bir proteindir. TF'lerin işlevi, hücre ve organizmanın yaşamı boyunca doğru hücrede doğru zamanda ve doğru miktarda ifade edilmelerini sağlamak için genleri düzenlemektir [163, 164].

Biz de bu tez çalışması kapsamında *TNF- α* varlığı ya da yokluğunda *ADAMTS-2* ve *ADAMTS-3* promotorundaki STAT-3 ve NF κ B transkripsiyon faktörlerinin işlevsel bağlanma analizini gerçekleştirdik.

STAT-3 insanlarda STAT-3 geni tarafından kodlanan bir transkripsiyon faktörüdür. STAT protein ailesinin bir üyesidir [187]. STAT ailesi proteinlerinin özellikle de STAT-3'ün, hem malign transformasyonun başlangıcında hem de kanser progresyonu sırasında, prokarsinojenik bir inflamatuvar mikro-çevrenin seçici olarak indüklenmesi ve korunmasında rol oynadığı düşünülmektedir [188-190].

NF-κB, DNA'nın transkripsiyonunun, sitokin üretimini ve hücre yaşamının kontrolünü sağlayan bir protein kompleksidir. NF-κB birçok hücrede tipinde bulunur ve sitokinler, serbest radikaller, ağır metaller, ultraviyole ışınlar, okside LDL ve bakteri veya viral antijenler gibi uyaranlara hücresel tepkilerde bulunur NF-κB, enfeksiyona karşı immün yanıtın düzenlenmesinde anahtar rol oynar [172-174].

DNA-protein etkileşimi temeline dayanan işlevsel bağlanma analizi çalışmaları için ilk önce biyoinformatik olarak *ADAMTS-2* ve *ADAMTS-3* promotorlarındaki muhtemel transkripsiyon faktörü bağlanma bölgelerinin tespiti yapıldı ve bu bölgelere uygun olacak biçimde proplar tasarlandı. Tasarlanan proplara Terminal Deoksinükleotidil Transferaz enzimi kullanılarak Biotin takıldı. Biotinlenen ve biyotinsiz olarak kullanılacak olan proplar anneal edilerek çift zincirli hale getirildi. *TNF-α* uygulanmış ve uygulanmamış olan Saos-2 hücrelerinden protein kaynağı olarak kullanılmak üzere nüklear ekstrakt elde edildi. Bağlanma reaksiyonu, membrana transfer, kross-link, bloklama, yıkama ve dengeleme basamaklarının ardından görüntüleme işlemi yapıldı.

Gerçekleştirilen analizler neticesinde *ADAMTS-2* [-143/-111] ve [-190/-184] proplarında hem STAT-3 hem de NFκB transkripsiyon faktörü bağlanma bölgesinin bulunduğu tespit edilmiştir. *ADAMTS-2* [-400/-436] probunda ise *ADAMTS-2* [-436/-400] probu ve 4000 kat kullanılan STAT-3 ve NFκB transkripsiyon faktörleri yarışmaya tabi tutulmuş ve kompleksin kontrol grubunda yer alan NFκB kuyusundaki varlığını zayıflatarak da olsa devam ettirdiği gözlenirken, diğer tüm kuyularda kaybolduğu belirlenmiştir. *ADAMTS-2* [-175/-143] probu ele alındığında da transkripsiyon faktörü bağlanma analizi için aynı membranda biyotinli *ADAMTS-2* [-175/-143] probu ve 4000 kat kullanılan STAT-3 ve NFκB transkripsiyon faktörleri yarışmaya tabi tutulmuş ve yarışma sonucunda hem STAT-3 hem de NFκB kuyularındaki kompleksin tam olarak kaybolmadığı sonucuna varılmıştır.

ADAMTS-3 [-131/-103], [-1225/-1205] ve [-1278/-1259] problemlerinde hem STAT-3 hem de NFκB transkripsiyon faktörü bağlanma bölgesinin bulunduğu ve sadece biyotinli prob ve nükleer ekstraktın kullandığı örneklerde *TNF-α* aracılı bir indüklemenin söz konusu olduğu belirlendi. *ADAMTS-3* [-973/-937] probunda ise *TNF-α* uygulanmamış hücrelerde her iki TF için de kompleks oluşumu gözlenmezken, *TNF-α* uygulanmış hücrelerde gözlemlendi.

E2F bağlanma motifine sahip *ADAMTS-3* [-973/-937] probunda *TNF-α* kaynaklı yüksek bir bağlanma afinitesi gözlemlendi. Transkripsiyon faktörleri açısından değerlendirildiğinde ise mevcut olan kompleksin tam olarak kaybolmadığı belirlendi.

ADAMTS-3 [-838/-812] ve *ADAMTS-3* [-1084/-1040] problemlerinde ise iki kompleks oluşumu gözlemlendi. Ayrıca *ADAMTS-3* [-1084/-1040] probunda *TNF-α* aracılı bağlanmanın yüksek bir afinite oluşturduğu sonucuna varıldı.

Sonuç olarak; transkripsiyonel regülasyon odaklı bazı çalışmalarla bazı yönleri aydınlatılan *ADAMTS-2* ve *ADAMTS-3* genlerinin *TNF-α* aracılığında gerçekleşen regülasyonunun nasıl olduğu ilk kez bu çalışmayla aydınlatılmıştır. *TNF-α* varlığında *ADAMTS-2* ve *ADAMTS-3* mRNA ve protein seviyelerindeki ekspresyonun indüklendiği ve bu indüklenmenin hangi yollar üzerinden gerçekleştirildiği ilk kez yine bu çalışmayla ortaya konmuştur. Ayrıca transkripsiyonel aktivite açısından *ADAMTS-2* ve *ADAMTS-3* promotorları *TNF-α* varlığında incelenerek, *TNF-α*'nın promotor aktivitesini upregüle ettiği ve bu regülasyonun hangi hücre içi sinyal iletim yollarını kullanarak gerçekleştirdiği de ilk defa bu tez çalışmasıyla aydınlatılmıştır. Bir diğer sonuç olarak da *ADAMTS-2* ve *ADAMTS-3* promotorlarına STAT3 ve NFκB transkripsiyon faktörlerinin işlevsel olarak bağlanma analizi ilk kez bu çalışmayla gerçekleştirilerek ortaya konmuştur.

Bu çalışma gelecekte yapılması muhtemel olan *ADAMTS-2* ve *ADAMTS-3* genlerinin transkripsiyonel regülasyonun başka sitokin, inhibitör ve transkripsiyon faktörlerince de araştırılarak etraflıca aydınlatılmasına basamak oluşturmuştur.

6. KAYNAKLAR

- [1] Frantz, C., Stewart, K.M., Weaver, V.M., "The extracellular matrix at a glance", *Journal of Cell Science*, 123(24), 4195-4200, (2010).
- [2] Charras, G.ve Sahai, E., "Physical influences of the extracellular environment on cell migration", *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 15, 813, (2014).
- [3] Guilak, F., et al., "Control of stem cell fate by physical interactions with the extracellular matrix", *Cell Stem Cell*, 5(1), 17-26, (2009).
- [4] Grossman, M., et al., "Tumor Cell Invasion Can Be Blocked by Modulators of Collagen Fibril Alignment That Control Assembly of the Extracellular Matrix", in *Cancer Res*, 4249-58,(2016).
- [5] Lu, P., Weaver, V.M., Werb, Z., "The extracellular matrix: a dynamic niche in cancer progression", *J Cell Biol*, 196(4), 395-406, (2012).
- [6] Levental, K.R., et al., "Matrix crosslinking forces tumor progression by enhancing integrin signaling", *Cell*, 139(5), 891-906, (2009).
- [7] Jarvelainen, H., Sainio, A., Koulu, M., Wight, T.N., Penttinen, R., "Extracellular matrix molecules: potential targets in pharmacotherapy", *Pharmacol Rev*, 61(2), 198-223, (2009).
- [8] Schaefer, L.veSchaefer, R.M., "Proteoglycans: from structural compounds to signaling molecules", *Cell Tissue Res*, 339(1), 237-46, (2010).
- [9] Iozzo, R.V.veMurdoch, A.D., "Proteoglycans of the extracellular environment: clues from the gene and protein side offer novel perspectives in molecular diversity and function", *Faseb j*, 10(5), 598-614, (1996).
- [10] Wagenseil, J.E.veMecham, R.P., "New insights into elastic fiber assembly", *Birth Defects Res C Embryo Today*, 81(4), 229-40, (2007).
- [11] Theocharis, A.D., Skandalis, S.S., Gialeli, C., Karamanos, N.K., "Extracellular matrix structure", *Advanced Drug Delivery Reviews*, 97, 4-27, (2016).
- [12] Wells, J.M., Gagar, A., Blalock, J.E., "MMP generated matrikines", *Matrix Biol*, 44-46, 122-9, (2015).

- [13] George, E.L., Georges-Labouesse, E.N., Patel-King, R.S., Rayburn, H., Hynes, R.O., "Defects in mesoderm, neural tube and vascular development in mouse embryos lacking fibronectin", *Development*, 119(4), 1079-91, (1993).
- [14] Pankov, R.veYamada, K.M., "Fibronectin at a glance", *J Cell Sci*, 115(Pt 20), 3861-3, (2002).
- [15] Durbeej, M., "Laminins", *Cell Tissue Res*, 339(1), 259-68, (2010).
- [16] Iorio, V., Troughton, L.D., Hamill, K.J., "Laminins: Roles and Utility in Wound Repair", *Adv Wound Care (New Rochelle)*, 4(4), 250-263, (2015).
- [17] Helbling-Leclerc, A., et al., "Mutations in the laminin alpha 2-chain gene (LAMA2) cause merosin-deficient congenital muscular dystrophy", *Nat Genet*, 11(2), 216-8, (1995).
- [18] Kadler, K.E., Baldock, C., Bella, J., Boot-Handford, R.P., "Collagens at a glance", *J Cell Sci*, 120(Pt 12), 1955-8, (2007).
- [19] Gerhardt, S., et al., "Crystal structures of human ADAMTS-1 reveal a conserved catalytic domain and a disintegrin-like domain with a fold homologous to cysteine-rich domains", *J Mol Biol*, 373(4), 891-902, (2007).
- [20] Heino, J., "The collagen family members as cell adhesion proteins", *Bioessays*, 29(10), 1001-10, (2007).
- [21] Gordon, M.K.veHahn, R.A., "Collagens", *Cell Tissue Res*, 339(1), 247-57, (2010).
- [22] Ricard-Blum, S., "The collagen family", *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 3(1), a004978, (2011).
- [23] Khoshnoodi, J., Pedchenko, V., Hudson, B.G., "Mammalian collagen IV", *Microsc Res Tech*, 71(5), 357-70, (2008).
- [24] Bella, J., Liu, J., Kramer, R., Brodsky, B., Berman, H.M., "Conformational effects of Gly-X-Gly interruptions in the collagen triple helix", *J Mol Biol*, 362(2), 298-311, (2006).
- [25] Bonnans, C., Chou, J., Werb, Z., "Remodelling the extracellular matrix in development and disease", *Nat Rev Mol Cell Biol*, 15(12), 786-801, (2014).
- [26] Payne, L.S.veHuang, P.H., "The pathobiology of collagens in glioma", *Mol Cancer Res*, 11(10), 1129-40, (2013).
- [27] Shoulders, M.D.veRaines, R.T., "Collagen structure and stability", *Annu Rev Biochem*, 78, 929-58, (2009).
- [28] Page, A.P.veJohnstone, I.L., "The cuticle", *WormBook*, 1-15, (2007).

- [29] Mak, K.M., Png, C.Y., Lee, D.J., "Type V Collagen in Health, Disease, and Fibrosis", *Anat Rec (Hoboken)*, 299(5), 613-29, (2016).
- [30] Smith, S.M.veBirk, D.E., "Focus on molecules: collagens V and XI", *Exp Eye Res*, 98, 105-6, (2012).
- [31] Fichard, A., Kleman, J.P., Ruggiero, F., "Another look at collagen V and XI molecules", *Matrix Biol*, 14(7), 515-31, (1995).
- [32] Boot-Handford, R.P., Tuckwell, D.S., Plumb, D.A., Rock, C.F., Poulsom, R., "A novel and highly conserved collagen (pro(alpha)1(XXVII)) with a unique expression pattern and unusual molecular characteristics establishes a new clade within the vertebrate fibrillar collagen family", *J Biol Chem*, 278(33), 31067-77, (2003).
- [33] Greenspan, D.S., *Biosynthetic processing of collagen molecules*, in *Collagen*. 2005, Springer. p. 149-183.
- [34] Bekhouche, M., et al., "Determination of the substrate repertoire of ADAMTS2, 3, and 14 significantly broadens their functions and identifies extracellular matrix organization and TGF-beta signaling as primary targets", *Faseb j*, 30(5), 1741-56, (2016).
- [35] Bekhouche, M.veColige, A., "The procollagen N-proteinases ADAMTS2, 3 and 14 in pathophysiology", *Matrix Biology*, 44-46(1569-1802), 46-53, (2015).
- [36] Ohnishi, J., Ohnishi, E., Shibuya, H., Takahashi, T., "Functions for proteinases in the ovulatory process", *Biochim Biophys Acta*, 1751(1), 95-109, (2005).
- [37] Egeblad, M.veWerb, Z., "New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression", *Nat Rev Cancer*, 2(3), 161-74, (2002).
- [38] Overall, C.M.veLopez-Otin, C., "Strategies for MMP inhibition in cancer: innovations for the post-trial era", *Nat Rev Cancer*, 2(9), 657-72, (2002).
- [39] Sarras, M.P., Jr., "BMP-1 and the astacin family of metalloproteinases: a potential link between the extracellular matrix, growth factors and pattern formation", *Bioessays*, 18(6), 439-42, (1996).
- [40] Kessler, E., Takahara, K., Biniaminov, L., Brusel, M., Greenspan, D.S., "Bone morphogenetic protein-1: the type I procollagen C-proteinase", *Science*, 271(5247), 360-2, (1996).

- [41] Amano, S., et al., "Bone morphogenetic protein 1 is an extracellular processing enzyme of the laminin 5 gamma 2 chain", *J Biol Chem*, 275(30), 22728-35, (2000).
- [42] Hsieh, Y.Y., et al., "Upregulation of bone morphogenetic protein 1 is associated with poor prognosis of late-stage gastric Cancer patients", *BMC Cancer*, 18(1), 508, (2018).
- [43] Yang, C.Y., Chanalaris, A., Troeberg, L., "ADAMTS and ADAM metalloproteinases in osteoarthritis - looking beyond the 'usual suspects'", *Osteoarthritis Cartilage*, 25(7), 1000-1009, (2017).
- [44] Seals, D.F.veCourtneidge, S.A., "The ADAMs family of metalloproteases: multidomain proteins with multiple functions", *Genes Dev*, 17(1), 7-30, (2003).
- [45] Edwards, D.R., Handsley, M.M., Pennington, C.J., "The ADAM metalloproteinases", *Mol Aspects Med*, 29(5), 258-89, (2008).
- [46] Weber, S.veSaftig, P., "Ectodomain shedding and ADAMs in development", *Development*, 139(20), 3693-709, (2012).
- [47] Kuno, K., et al., "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).
- [48] Porter, S., Clark, I.M., Kevorkian, L., Edwards, D.R., "The ADAMTS metalloproteinases", *Biochem J*, 386(Pt 1), 15-27, (2005).
- [49] Apte, S.S., *Chapter 259 - The ADAMTS Endopeptidases*, in *Handbook of Proteolytic Enzymes (Third Edition)*, N.D. RawlingsveG. Salvesen, Editors. 2013, Academic Press. p. 1149-1155.
- [50] Mosyak, L., et al., "Crystal structures of the two major aggrecan degrading enzymes, ADAMTS4 and ADAMTS5", *Protein Sci*, 17(1), 16-21, (2008).
- [51] 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).
- [52] Akiyama, M., Takeda, S., Kokame, K., Takagi, J., Miyata, T., "Crystal structures of the noncatalytic domains of ADAMTS13 reveal multiple discontinuous exosites for von Willebrand factor", *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(46), 19274-9, (2009).

- [53] Wang, L.W., et al., "O-fucosylation of thrombospondin type 1 repeats in ADAMTS-like-1/punctin-1 regulates secretion: implications for the ADAMTS superfamily", *J Biol Chem*, 282(23), 17024-31, (2007).
- [54] Wang, L.W., Leonhard-Melief, C., Haltiwanger, R.S., Apte, S.S., "Post-translational modification of thrombospondin type-1 repeats in ADAMTS-like 1/punctin-1 by C-mannosylation of tryptophan", *J Biol Chem*, 284(44), 30004-15, (2009).
- [55] Tortorella, M., et al., "The thrombospondin motif of aggrecanase-1 (ADAMTS-4) is critical for aggrecan substrate recognition and cleavage", *J Biol Chem*, 275(33), 25791-7, (2000).
- [56] Somerville, R.P., et al., "Characterization of ADAMTS-9 and ADAMTS-20 as a distinct ADAMTS subfamily related to *Caenorhabditis elegans* GON-1", *J Biol Chem*, 278(11), 9503-13, (2003).
- [57] Somerville, R.P., et al., "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).
- [58] Nardi, J.B., Martos, R., Walden, K.K., Lampe, D.J., Robertson, H.M., "Expression of lacunin, a large multidomain extracellular matrix protein, accompanies morphogenesis of epithelial monolayers in *Manduca sexta*", *Insect Biochem Mol Biol*, 29(10), 883-97, (1999).
- [59] Fernandes, R.J., et al., "Procollagen II amino propeptide processing by ADAMTS-3. Insights on dermatosparaxis", *J Biol Chem*, 276(34), 31502-9, (2001).
- [60] Zheng, X., et al., "Structure of von Willebrand factor-cleaving protease (ADAMTS13), a metalloprotease involved in thrombotic thrombocytopenic purpura", *J Biol Chem*, 276(44), 41059-63, (2001).
- [61] Colige, A., et al., "cDNA cloning and expression of bovine procollagen I N-proteinase: a new member of the superfamily of zinc-metalloproteinases with binding sites for cells and other matrix components", *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(6), 2374-9, (1997).
- [62] Blemloch, R.veKimble, J., "Control of organ shape by a secreted metalloprotease in the nematode *Caenorhabditis elegans*", *Nature*, 399(6736), 586-90, (1999).

- [63] Llamazares, M., Cal, S., Quesada, V., Lopez-Otin, C., "Identification and characterization of ADAMTS-20 defines a novel subfamily of metalloproteinases-disintegrins with multiple thrombospondin-1 repeats and a unique GON domain", *J Biol Chem*, 278(15), 13382-9, (2003).
- [64] Vazquez, F., et al., "METH-1, a human ortholog of ADAMTS-1, and METH-2 are members of a new family of proteins with angio-inhibitory activity", *J Biol Chem*, 274(33), 23349-57, (1999).
- [65] Chen, J., et al., "Downregulation of ADAMTS8 by DNA Hypermethylation in Gastric Cancer and Its Clinical Significance", *Biomed Res Int*, 2016, 5083841, (2016).
- [66] Yatabe, T., et al., "Hyaluronan inhibits expression of ADAMTS4 (aggrecanase-1) in human osteoarthritic chondrocytes", *Ann Rheum Dis*, 68(6), 1051-8, (2009).
- [67] Bateman, J.F., et al., "Transcriptomics of wild-type mice and mice lacking ADAMTS-5 activity identifies genes involved in osteoarthritis initiation and cartilage destruction", *Arthritis Rheum*, 65(6), 1547-60, (2013).
- [68] Wierinckx, A., et al., "A diagnostic marker set for invasion, proliferation, and aggressiveness of prolactin pituitary tumors", *Endocr Relat Cancer*, 14(3), 887-900, (2007).
- [69] Lopez-Mejias, R., et al., "Lack of association between ABO, PPAP2B, ADAMST7, PIK3CG, and EDNRA and carotid intima-media thickness, carotid plaques, and cardiovascular disease in patients with rheumatoid arthritis", *Mediators Inflamm*, 2014, 756279, (2014).
- [70] Lai, Y., et al., "ADAMTS-7 forms a positive feedback loop with TNF-alpha in the pathogenesis of osteoarthritis", *Ann Rheum Dis*, 73(8), 1575-84, (2014).
- [71] Liu, C.J., "The role of ADAMTS-7 and ADAMTS-12 in the pathogenesis of arthritis", *Nat Clin Pract Rheumatol*, 5(1), 38-45, (2009).
- [72] Kern, C.B., et al., "Reduced versican cleavage due to Adamts9 haploinsufficiency is associated with cardiac and aortic anomalies", *Matrix Biol*, 29(4), 304-16, (2010).
- [73] Demircan, K., Cömertoğlu, İ., Akyol, S., Yiğitoğlu, B.N., Sarıkaya, E., "A new biological marker candidate in female reproductive system diseases:

- Matrix metalloproteinase with thrombospondin motifs (ADAMTS)", *Journal of the Turkish German Gynecological Association*, 15(4), 250, (2014).
- [74] Hanby, H.A.veZheng, X.L., "Current status in diagnosis and treatment of hereditary thrombotic thrombocytopenic purpura", *Hereditary Genet*, 3(1)(2014).
- [75] Dancevic, C.M., et al., "Biosynthesis and expression of a disintegrin-like and metalloproteinase domain with thrombospondin-1 repeats-15: a novel versican-cleaving proteoglycanase", *J Biol Chem*, 288(52), 37267-76, (2013).
- [76] Kelwick, R., et al., "Metalloproteinase-dependent and -independent processes contribute to inhibition of breast cancer cell migration, angiogenesis and liver metastasis by a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs-15", *Int J Cancer*, 136(4), E14-26, (2015).
- [77] Zeng, W., et al., "Glycosaminoglycan-binding properties and aggrecanase activities of truncated ADAMTSs: Comparative analyses with ADAMTS-5, -9, -16 and -18", *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1760(3), 517-524, (2006).
- [78] Davidson, R.K., et al., "Expression profiling of metalloproteinases and their inhibitors in synovium and cartilage", *Arthritis Res Ther*, 8(4), R124, (2006).
- [79] Kochhar, A., et al., "Similarity of geleophysic dysplasia and Weill-Marchesani syndrome", *Am J Med Genet A*, 161a(12), 3130-2, (2013).
- [80] Silver, D.L., et al., "The secreted metalloprotease ADAMTS20 is required for melanoblast survival", *PLoS Genet*, 4(2), e1000003, (2008).
- [81] Canty, E.G.veKadler, K.E., "Procollagen trafficking, processing and fibrillogenesis", *J Cell Sci*, 118(Pt 7), 1341-53, (2005).
- [82] Alper, M., Aydemir, A.T., Köçkar, F., "Induction of human ADAMTS-2 gene expression by IL-1 α is mediated by a multiple crosstalk of MEK/JNK and PI3K pathways in osteoblast like cells", *Gene*, 573(2), 321-327, (2015).
- [83] Li, S.W., et al., "Transgenic mice with inactive alleles for procollagen N-proteinase (ADAMTS-2) develop fragile skin and male sterility", *Biochem J*, 355(Pt 2), 271-8, (2001).
- [84] Colige, A., et al., "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).

- [85] Poonpet, T., Honsawek, S., Tammachote, N., Kanitnate, S., Tammachote, R., "ADAMTS14 gene polymorphism associated with knee osteoarthritis in Thai women", *Genet Mol Res*, 12(4), 5301-9, (2013).
- [86] Colige, A., et al., "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).
- [87] Dubail, J., et al., "ADAMTS-2 functions as anti-angiogenic and anti-tumoral molecule independently of its catalytic activity", *Cell Mol Life Sci*, 67(24), 4213-32, (2010).
- [88] Engle, J.M., Tam, L., Goldring, M., Apte, S. *ADAMTS-9 and ADAMTS-10, two novel, unusual ADAMTS proteases and regulation of the ADAMTS family in three human chondrocyte cell lines.* in *47th Annual Meeting, Orthopaedic Research Society, San Francisco, California.* 2001.
- [89] Alper, M.veKockar, F., "IL-6 upregulates a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 2 (ADAMTS-2) in human osteosarcoma cells mediated by JNK pathway", *Molecular and Cellular Biochemistry*, 393(1), 165-175, (2014).
- [90] Aydemir, A.T., Alper, M., Kockar, F., "SP1-mediated downregulation of ADAMTS3 gene expression in osteosarcoma models", *Gene*, 659, 1-10, (2018).
- [91] Yamakage, Y., et al., "Reducing ADAMTS-3 Inhibits Amyloid β Deposition in App Knock-in Mouse", *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 42(3), 354-356, (2019).
- [92] Janssen, L., et al., "ADAMTS3 activity is mandatory for embryonic lymphangiogenesis and regulates placental angiogenesis", *Angiogenesis*, 19(1), 53-65, (2016).
- [93] Jeltsch, M., et al., "CCBE1 enhances lymphangiogenesis via A disintegrin and metalloprotease with thrombospondin motifs-3-mediated vascular endothelial growth factor-C activation", *Circulation*, 129(19), 1962-71, (2014).
- [94] Brouillard, P., et al., "Loss of ADAMTS3 activity causes Hennekam lymphangiectasia-lymphedema syndrome 3", *Hum Mol Genet*, 26(21), 4095-4104, (2017).

- [95] Kelwick, R., Desanlis, I., Wheeler, G.N., Edwards, D.R., "The ADAMTS (A Disintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin motifs) family", *Genome Biol*, 16, 113, (2015).
- [96] Forouzanfar, M., "Global, regional, and national comparative risk assessment of 79 behavioural, environmental and occupational, and metabolic risks or clusters of risks, 1990-2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015", *Lancet*, 388(10053), 1659-1724, (2016).
- [97] Plummer, M., et al., "Global burden of cancers attributable to infections in 2012: a synthetic analysis", *Lancet Glob Health*, 4(9), e609-16, (2016).
- [98] Jayasekara, H., MacInnis, R.J., Room, R., English, D.R., "Long-Term Alcohol Consumption and Breast, Upper Aero-Digestive Tract and Colorectal Cancer Risk: A Systematic Review and Meta-Analysis", *Alcohol Alcohol*, 51(3), 315-30, (2016).
- [99] Cross, N.A., et al., "The expression and regulation of ADAMTS-1, -4, -5, -9, and -15, and TIMP-3 by TGFbeta1 in prostate cells: relevance to the accumulation of versican", *Prostate*, 63(3), 269-75, (2005).
- [100] Turner, S.L., Mangnall, D., Bird, N.C., Bunning, R.A., Blair-Zajdel, M.E., "Expression of ADAMTS-1, ADAMTS-4, ADAMTS-5 and TIMP3 by hepatocellular carcinoma cell lines", *Int J Oncol*, 41(3), 1043-9, (2012).
- [101] Le Bras, G.F., et al., "TGFbeta loss activates ADAMTS-1-mediated EGF-dependent invasion in a model of esophageal cell invasion", *Exp Cell Res*, 330(1), 29-42, (2015).
- [102] Rocks, N., et al., "ADAMTS-1 metalloproteinase promotes tumor development through the induction of a stromal reaction in vivo", *Cancer Res*, 68(22), 9541-50, (2008).
- [103] Liu, Y.J., Xu, Y., Yu, Q., "Full-length ADAMTS-1 and the ADAMTS-1 fragments display pro- and antimetastatic activity, respectively", *Oncogene*, 25(17), 2452-67, (2006).
- [104] Wang, W.M., et al., "Transforming growth factor-beta induces secretion of activated ADAMTS-2. A procollagen III N-proteinase", *J Biol Chem*, 278(21), 19549-57, (2003).
- [105] Acar, M., et al., "The effects of hypericin on ADAMTS and p53 gene expression in MCF-7 breast cancer cells", *J buon*, 19(3), 627-32, (2014).

- [106] Rao, N., et al., "ADAMTS4 and its proteolytic fragments differentially affect melanoma growth and angiogenesis in mice", *Int J Cancer*, 133(2), 294-306, (2013).
- [107] Kumar, S., Rao, N., Ge, R., "Emerging Roles of ADAMTSs in Angiogenesis and Cancer", *Cancers (Basel)*, 4(4), 1252-99, (2012).
- [108] Kim, Y.H., et al., "Epigenomic analysis of aberrantly methylated genes in colorectal cancer identifies genes commonly affected by epigenetic alterations", *Ann Surg Oncol*, 18(8), 2338-47, (2011).
- [109] Kumar, S., Sharghi-Namini, S., Rao, N., Ge, R., "ADAMTS5 functions as an anti-angiogenic and anti-tumorigenic protein independent of its proteoglycanase activity", *Am J Pathol*, 181(3), 1056-68, (2012).
- [110] Filou, S., et al., "Expression and distribution of aggrecanases in human larynx: ADAMTS-5/aggrecanase-2 is the main aggrecanase in laryngeal carcinoma", *Biochimie*, 95(4), 725-34, (2013).
- [111] Choi, G.C., et al., "The metalloprotease ADAMTS8 displays antitumor properties through antagonizing EGFR-MEK-ERK signaling and is silenced in carcinomas by CpG methylation", *Mol Cancer Res*, 12(2), 228-38, (2014).
- [112] Dunn, J.R., et al., "Expression of ADAMTS-8, a secreted protease with antiangiogenic properties, is downregulated in brain tumours", *Br J Cancer*, 94(8), 1186-93, (2006).
- [113] Porter, S., et al., "Dysregulated expression of adamalysin-thrombospondin genes in human breast carcinoma", *Clin Cancer Res*, 10(7), 2429-40, (2004).
- [114] Lo, P.H., et al., "Extracellular protease ADAMTS9 suppresses esophageal and nasopharyngeal carcinoma tumor formation by inhibiting angiogenesis", *Cancer Res*, 70(13), 5567-76, (2010).
- [115] Lung, H.L., et al., "Characterization of a novel epigenetically-silenced, growth-suppressive gene, ADAMTS9, and its association with lymph node metastases in nasopharyngeal carcinoma", *Int J Cancer*, 123(2), 401-408, (2008).
- [116] Clark, M.E., et al., "ADAMTS9, a novel member of the ADAM-TS/metallospodin gene family", *Genomics*, 67(3), 343-50, (2000).
- [117] El Hour, M., et al., "Higher sensitivity of Adamts12-deficient mice to tumor growth and angiogenesis", *Oncogene*, 29(20), 3025-32, (2010).

- [118] Llamazares, M., et al., "The ADAMTS12 metalloproteinase exhibits anti-tumorigenic properties through modulation of the Ras-dependent ERK signalling pathway", *J Cell Sci*, 120(Pt 20), 3544-52, (2007).
- [119] Fontanil, T., et al., "Interaction between the ADAMTS-12 metalloprotease and fibulin-2 induces tumor-suppressive effects in breast cancer cells", *Oncotarget*, 5(5), 1253-64, (2014).
- [120] Wang, D., Zhu, T., Zhang, F.B., He, C., "Expression of ADAMTS12 in colorectal cancer-associated stroma prevents cancer development and is a good prognostic indicator of colorectal cancer", *Dig Dis Sci*, 56(11), 3281-7, (2011).
- [121] Porter, S., et al., "ADAMTS8 and ADAMTS15 expression predicts survival in human breast carcinoma", *Int J Cancer*, 118(5), 1241-7, (2006).
- [122] Vilorio, C.G., et al., "Genetic inactivation of ADAMTS15 metalloprotease in human colorectal cancer", *Cancer Res*, 69(11), 4926-34, (2009).
- [123] Chuu, C.P., et al., "Androgens as therapy for androgen receptor-positive castration-resistant prostate cancer", *J Biomed Sci*, 18, 63, (2011).
- [124] Guven-Maiorov, E., Acuner-Ozbabacan, S.E., Keskin, O., Gursoy, A., Nussinov, R., "Structural pathways of cytokines may illuminate their roles in regulation of cancer development and immunotherapy", *Cancers*, 6(2), 663-683, (2014).
- [125] Vacchelli, E., et al., "Trial Watch: Immunostimulatory cytokines", *Oncoimmunology*, 1(4), 493-506, (2012).
- [126] Lee, S.veMargolin, K., "Cytokines in cancer immunotherapy", *Cancers (Basel)*, 3(4), 3856-93, (2011).
- [127] Luo, J.L., Maeda, S., Hsu, L.C., Yagita, H., Karin, M., "Inhibition of NF-kappaB in cancer cells converts inflammation-induced tumor growth mediated by TNFalpha to TRAIL-mediated tumor regression", *Cancer Cell*, 6(3), 297-305, (2004).
- [128] Dranoff, G., "Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy", *Nat Rev Cancer*, 4(1), 11-22, (2004).
- [129] Sultani, M., Stringer, A.M., Bowen, J.M., Gibson, R.J., "Anti-inflammatory cytokines: important immunoregulatory factors contributing to chemotherapy-induced gastrointestinal mucositis", *Chemother Res Pract*, 2012, 490804, (2012).

- [130] Zhang, J.M.veAn, J., "Cytokines, inflammation, and pain", *Int Anesthesiol Clin*, 45(2), 27-37, (2007).
- [131] Scarpioni, R., Ricardi, M., Albertazzi, V., "Secondary amyloidosis in autoinflammatory diseases and the role of inflammation in renal damage", *World J Nephrol*, 5(1), 66-75, (2016).
- [132] Sallam, N.veLaher, I., "Exercise Modulates Oxidative Stress and Inflammation in Aging and Cardiovascular Diseases", *Oxid Med Cell Longev*, 2016, 7239639, (2016).
- [133] Gahring, L.C., Carlson, N.G., Kulmar, R.A., Rogers, S.W., "Neuronal expression of tumor necrosis factor alpha in the murine brain", *Neuroimmunomodulation*, 3(5), 289-303, (1996).
- [134] Old, L.J., "Tumor necrosis factor (TNF)", *Science*, 230(4726), 630-2, (1985).
- [135] Swardfager, W., et al., "A meta-analysis of cytokines in Alzheimer's disease", *Biol Psychiatry*, 68(10), 930-41, (2010).
- [136] Locksley, R.M., Killeen, N., Lenardo, M.J., "The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology", *Cell*, 104(4), 487-501, (2001).
- [137] Dowlati, Y., et al., "A meta-analysis of cytokines in major depression", *Biol Psychiatry*, 67(5), 446-57, (2010).
- [138] Shibata, H., et al., "Creation and X-ray structure analysis of the tumor necrosis factor receptor-1-selective mutant of a tumor necrosis factor-alpha antagonist", *J Biol Chem*, 283(2), 998-1007, (2008).
- [139] Faustman, D.veDavis, M., "TNF receptor 2 pathway: drug target for autoimmune diseases", *Nat Rev Drug Discov*, 9(6), 482-93, (2010).
- [140] Byla, P., et al., "Selection of a novel and highly specific tumor necrosis factor alpha (TNFalpha) antagonist: insight from the crystal structure of the antagonist-TNFalpha complex", *J Biol Chem*, 285(16), 12096-100, (2010).
- [141] Mukai, Y., et al., "Fast binding kinetics and conserved 3D structure underlie the antagonistic activity of mutant TNF: useful information for designing artificial proteo-antagonists", *J Biochem*, 146(2), 167-72, (2009).
- [142] Kriegler, M., Perez, C., DeFay, K., Albert, I., Lu, S.D., "A novel form of TNF/cachectin is a cell surface cytotoxic transmembrane protein: ramifications for the complex physiology of TNF", *Cell*, 53(1), 45-53, (1988).

- [143] Tang, P., Hung, M.C., Klostergaard, J., "Human pro-tumor necrosis factor is a homotrimer", *Biochemistry*, 35(25), 8216-25, (1996).
- [144] Black, R.A., et al., "A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells", *Nature*, 385(6618), 729-33, (1997).
- [145] Palladino, M.A., Bahjat, F.R., Theodorakis, E.A., Moldawer, L.L., "Anti-TNF-alpha therapies: the next generation", *Nat Rev Drug Discov*, 2(9), 736-46, (2003).
- [146] Luque, A., Carpizo, D.R., Iruela-Arispe, M.L., "ADAMTS1/METH1 inhibits endothelial cell proliferation by direct binding and sequestration of VEGF165", *J Biol Chem*, 278(26), 23656-65, (2003).
- [147] Bevitt, D.J., et al., "Expression of ADAMTS metalloproteinases in the retinal pigment epithelium derived cell line ARPE-19: transcriptional regulation by TNF α ", *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression*, 1626(1), 83-91, (2003).
- [148] Koshy, P.J., et al., "The modulation of matrix metalloproteinase and ADAM gene expression in human chondrocytes by interleukin-1 and oncostatin M: a time-course study using real-time quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction", *Arthritis Rheum*, 46(4), 961-7, (2002).
- [149] Beristain, A.G., Zhu, H., Leung, P.C.K., "Regulated Expression of ADAMTS-12 in Human Trophoblastic Cells: A Role for ADAMTS-12 in Epithelial Cell Invasion?", *PLOS ONE*, 6(4), e18473, (2011).
- [150] Do, M.S., et al., "Inflammatory gene expression patterns revealed by DNA microarray analysis in TNF-alpha-treated SGBS human adipocytes", *Yonsei Med J*, 47(5), 729-36, (2006).
- [151] Demircan, K., et al., "ADAMTS-9 is synergistically induced by interleukin-1beta and tumor necrosis factor alpha in OUMS-27 chondrosarcoma cells and in human chondrocytes", *Arthritis Rheum*, 52(5), 1451-60, (2005).
- [152] Song, R.H., et al., "Aggrecan degradation in human articular cartilage explants is mediated by both ADAMTS-4 and ADAMTS-5", *Arthritis Rheum*, 56(2), 575-85, (2007).
- [153] Naito, S., et al., "Expression of ADAMTS4 (aggrecanase-1) in human osteoarthritic cartilage", *Pathol Int*, 57(11), 703-11, (2007).
- [154] Zhu, H., Leung, P.C.K., Ng, Y.H., MacCalman, C.D., Pallen, C.J., "Differential effects of interleukin-1 β and transforming growth factor- β 1 on

- the expression of the inflammation-associated protein, ADAMTS-1, in human decidual stromal cells in vitro", *Human Reproduction*, 21(8), 1990-1999, (2006).
- [155] Wachsmuth, L., et al., "ADAMTS-1, a gene product of articular chondrocytes in vivo and in vitro, is downregulated by interleukin 1beta", *J Rheumatol*, 31(2), 315-20, (2004).
- [156] Xue, J., Wang, J., Liu, Q., Luo, A., "Tumor necrosis factor-alpha induces ADAMTS-4 expression in human osteoarthritis chondrocytes", *Mol Med Rep*, 8(6), 1755-60, (2013).
- [157] Wang, L., et al., "ADAMTS-7 mediates vascular smooth muscle cell migration and neointima formation in balloon-injured rat arteries", *Circ Res*, 104(5), 688-98, (2009).
- [158] Wei, J.L., et al., "Role of ADAMTS-12 in Protecting Against Inflammatory Arthritis in Mice By Interacting With and Inactivating Proinflammatory Connective Tissue Growth Factor", *Arthritis Rheumatol*, 70(11), 1745-1756, (2018).
- [159] Roeder, R.G., "The complexities of eukaryotic transcription initiation: regulation of preinitiation complex assembly", *Trends Biochem Sci*, 16(11), 402-8, (1991).
- [160] Weis, L.veReinberg, D., "Transcription by RNA polymerase II: initiator-directed formation of transcription-competent complexes", *Faseb j*, 6(14), 3300-9, (1992).
- [161] Saunders, A., Core, L.J., Lis, J.T., "Breaking barriers to transcription elongation", *Nat Rev Mol Cell Biol*, 7(8), 557-67, (2006).
- [162] Struhl, K., "Fundamentally different logic of gene regulation in eukaryotes and prokaryotes", *Cell*, 98(1), 1-4, (1999).
- [163] Latchman, D.S., "Transcription factors: an overview", *Int J Biochem Cell Biol*, 29(12), 1305-12, (1997).
- [164] Karin, M., "Too many transcription factors: positive and negative interactions", *New Biol*, 2(2), 126-31, (1990).
- [165] Roeder, R.G., "The role of general initiation factors in transcription by RNA polymerase II", *Trends Biochem Sci*, 21(9), 327-35, (1996).
- [166] Nikolov, D.B.veBurley, S.K., "RNA polymerase II transcription initiation: a structural view", *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(1), 15-22, (1997).

- [167] Mitchell, P.J.veTjian, R., "Transcriptional regulation in mammalian cells by sequence-specific DNA binding proteins", *Science*, 245(4916), 371-8, (1989).
- [168] Ptashne, M.veGann, A., "Transcriptional activation by recruitment", *Nature*, 386(6625), 569-77, (1997).
- [169] Jin, J., Zhang, H., Kong, L., Gao, G., Luo, J., "PlantTFDB 3.0: a portal for the functional and evolutionary study of plant transcription factors", *Nucleic Acids Res*, 42(Database issue), D1182-7, (2014).
- [170] Brivanlou, A.H.veDarnell, J.E., Jr., "Signal transduction and the control of gene expression", *Science*, 295(5556), 813-8, (2002).
- [171] Gill, G., "Regulation of the initiation of eukaryotic transcription", *Essays Biochem*, 37, 33-43, (2001).
- [172] Gilmore, T.D., "Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives", *Oncogene*, 25(51), 6680-4, (2006).
- [173] Brasier, A.R., "The NF-kappaB regulatory network", *Cardiovasc Toxicol*, 6(2), 111-30, (2006).
- [174] Perkins, N.D., "Integrating cell-signalling pathways with NF-kappaB and IKK function", *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8(1), 49-62, (2007).
- [175] Albensi, B.C.veMattson, M.P., "Evidence for the involvement of TNF and NF-kappaB in hippocampal synaptic plasticity", *Synapse*, 35(2), 151-9, (2000).
- [176] Meffert, M.K., Chang, J.M., Wiltgen, B.J., Fanselow, M.S., Baltimore, D., "NF-kappa B functions in synaptic signaling and behavior", *Nat Neurosci*, 6(10), 1072-8, (2003).
- [177] Levenson, J.M., et al., "A bioinformatics analysis of memory consolidation reveals involvement of the transcription factor c-rel", *J Neurosci*, 24(16), 3933-43, (2004).
- [178] Freudenthal, R., et al., "Kappa-B like DNA-binding activity is enhanced after spaced training that induces long-term memory in the crab *Chasmagnathus*", *Neurosci Lett*, 242(3), 143-6, (1998).
- [179] Merlo, E., Freudenthal, R., Romano, A., "The IkappaB kinase inhibitor sulfasalazine impairs long-term memory in the crab *Chasmagnathus*", *Neuroscience*, 112(1), 161-72, (2002).

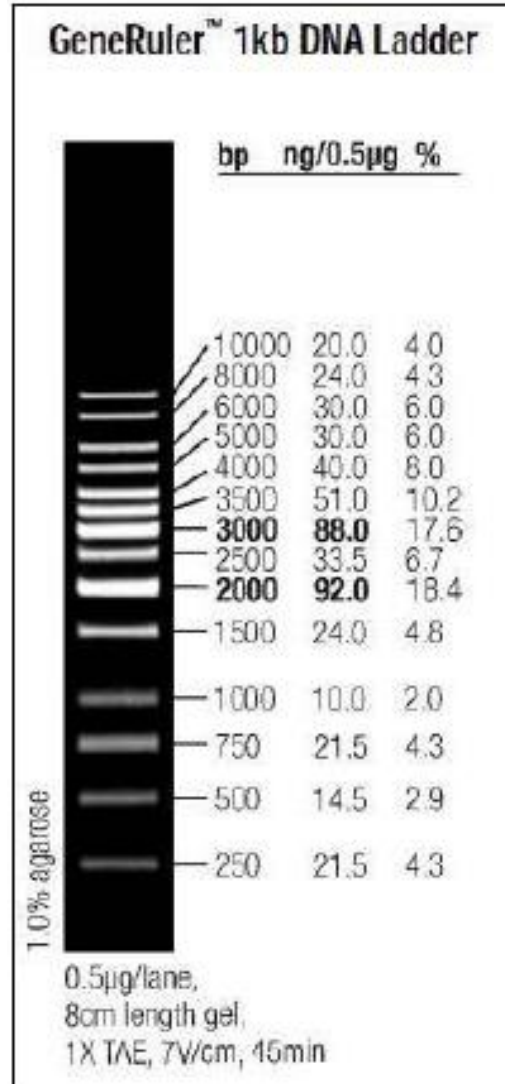
- [180] Deptala, A., Bedner, E., Gorczyca, W., Darzynkiewicz, Z., "Activation of nuclear factor kappa B (NF-kappaB) assayed by laser scanning cytometry (LSC)", *Cytometry*, 33(3), 376-82, (1998).
- [181] Calzado, M.A., Bacher, S., Schmitz, M.L., "NF-kappaB inhibitors for the treatment of inflammatory diseases and cancer", *Curr Med Chem*, 14(3), 367-76, (2007).
- [182] Hoffmann, A.veBaltimore, D., "Circuitry of nuclear factor kappaB signaling", *Immunol Rev*, 210, 171-86, (2006).
- [183] Ling, L., Cao, Z., Goeddel, D.V., "NF-kappaB-inducing kinase activates IKK-alpha by phosphorylation of Ser-176", *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(7), 3792-7, (1998).
- [184] Bonizzi, G., et al., "Activation of IKKalpha target genes depends on recognition of specific kappaB binding sites by RelB:p52 dimers", *Embo j*, 23(21), 4202-10, (2004).
- [185] Basak, S., Shih, V.F., Hoffmann, A., "Generation and activation of multiple dimeric transcription factors within the NF-kappaB signaling system", *Mol Cell Biol*, 28(10), 3139-50, (2008).
- [186] Lindstrom, T.M.veBennett, P.R., "The role of nuclear factor kappa B in human labour", *Reproduction*, 130(5), 569-81, (2005).
- [187] Akira, S., et al., "Molecular cloning of APRF, a novel IFN-stimulated gene factor 3 p91-related transcription factor involved in the gp130-mediated signaling pathway", *Cell*, 77(1), 63-71, (1994).
- [188] Mantovani, A., Allavena, P., Sica, A., Balkwill, F., "Cancer-related inflammation", *Nature*, 454(7203), 436-44, (2008).
- [189] Catlett-Falcone, R., et al., "Constitutive activation of Stat3 signaling confers resistance to apoptosis in human U266 myeloma cells", *Immunity*, 10(1), 105-15, (1999).
- [190] Bollrath, J., et al., "gp130-mediated Stat3 activation in enterocytes regulates cell survival and cell-cycle progression during colitis-associated tumorigenesis", *Cancer Cell*, 15(2), 91-102, (2009).
- [191] Yu, H., Pardoll, D., Jove, R., "STATs in cancer inflammation and immunity: a leading role for STAT3", *Nat Rev Cancer*, 9(11), 798-809, (2009).

- [192] Sano, S., et al., "Signal transducer and activator of transcription 3 is a key regulator of keratinocyte survival and proliferation following UV irradiation", *Cancer Res*, 65(13), 5720-9, (2005).
- [193] Chan, K.S., et al., "Disruption of Stat3 reveals a critical role in both the initiation and the promotion stages of epithelial carcinogenesis", *J Clin Invest*, 114(5), 720-8, (2004).
- [194] Aziz, M.H., Manoharan, H.T., Verma, A.K., "Protein kinase C epsilon, which sensitizes skin to sun's UV radiation-induced cutaneous damage and development of squamous cell carcinomas, associates with Stat3", *Cancer Res*, 67(3), 1385-94, (2007).
- [195] Rébé, C., Végran, F., Berger, H., Ghiringhelli, F., "STAT3 activation: A key factor in tumor immunoescape", *Jakstat*, 2(1), e23010, (2013).
- [196] Yoshimura, A., Naka, T., Kubo, M., "SOCS proteins, cytokine signalling and immune regulation", *Nat Rev Immunol*, 7(6), 454-65, (2007).
- [197] Hirano, T., Ishihara, K., Hibi, M., "Roles of STAT3 in mediating the cell growth, differentiation and survival signals relayed through the IL-6 family of cytokine receptors", *Oncogene*, 19(21), 2548-56, (2000).
- [198] Kujawski, M., et al., "Stat3 mediates myeloid cell-dependent tumor angiogenesis in mice", *J Clin Invest*, 118(10), 3367-77, (2008).
- [199] Livak, K.J.veSchmittgen, 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).
- [200] Hellman, L.M.veFried, M.G., "Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) for detecting protein-nucleic acid interactions", *Nat Protoc*, 2(8), 1849-61, (2007).

EKLER

7. EKLER

EK A: DNA Büyüklük Belirteci



ÖZGEÇMİŞ



Ehed Muhammed AYMAZ

E-mail: ehedaymaz@hotmail.com, ehed.aymaz@baun.edu.tr

Kişisel Bilgiler

Doğum Tarihi: 29.10.1993

Doğum Yeri: İstanbul

Eğitim Bilgileri

Lisans: Biyoloji (2011-2015)

Pedagojik Formasyon: Biyoloji Eğitimi (2015)

Yüksek Lisans: Moleküler Biyoloji ve Genetik (2016-2019)

Tez Konusu: TNF-Alfa aracılı ADAMTS-2 ve ADAMTS-3 genlerinin regülasyonu

Öğrenilmiş Bazı Metotlar: Hücre Kültürü, Real Time PCR, Geçici Transfeksiyon, Western Blot, EMSA, SRB, MTT, Scratch.

Bilgisayar Programları: Minitab14, Endnote, ImageJ, Microsof Word, Microsof Excel, Microsoft Powerpoint

Dereceler

Balıkesir Üniversitesi Onur Öğrencisi – 2013

Balıkesir Üniversitesi Onur Öğrencisi – 2014

Balıkesir Üniversitesi Onur Öğrencisi – 2015

Balıkesir Üniversitesi Poster Günleri Birincilik Ödülü – 2015

Katıldığı Kurslar

Pedagojik Formasyon Programı – 2015

Tübitak Destekli Girişimcilik ve İş Planı Hazırlama Eğitimi – 2016

UÜ TTO ve BAUN Prokob İşbirliğinde “Let’s Up” Programı – 2016

Diksiyon Eğitimi - 2017

Katıldığı Ulusal ve Uluslararası Kongreler

IV. International Congress of The Molecular Biology Association of Turkey,
November 27-29 2015 -METU, Ankara

Gebze Teknik Üniversitesi Genetik Günleri – 2016

Uludağ Üniversitesi Kanser Genetiği ve Moleküler Biyolojide Güncel Gelişmeler –
2017

V. International Congress of The Molecular Biology Association of Turkey,
Boğaziçi Üniversitesi - 2017

VI. International Congress on Molecular Biology and Biotechnology, Afyon – 2017
(Sözlü Sunum)

Boğaziçi Üniversitesi EMBO Genç Bilim İnsanları Formu – 2018

Balıkesir Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik I. Kariyer Günleri – 2018

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi GENÇOMÜ Öğrenci Kongresi – 2018

BAUGEN I. Ulusal Moleküler Biyoloji ve Genetik Kongresi – 2018 (Poster Sunum)