

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



**İNSAN ADAMTS-3 GENİNİN TRANSKRİPSİYONEL
REGÜLASYONU**

DOKTORA TEZİ

A. TUĞŞEN AYDEMİR

BALIKESİR, OCAK - 2017

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



**İNSAN *ADAMTS-3* GENİNİN TRANSKRİPSİYONEL
REGÜLASYONU**

DOKTORA TEZİ

A.TUĞŞEN AYDEMİR

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

Prof. Dr. Kemal Sami KORKMAZ

Prof. Dr. Berrin TUNCA

Yrd. Doç. Dr. Hatice YILDIRIM

Yrd. Doç. Dr. Aylin ER

BALIKESİR, OCAK – 2017

KABUL VE ONAY SAYFASI

A.Tuğşen AYDEMİR tarafından hazırlanan "İNSAN ADAMTS-3 GENİNİN TRANSKRİPSİYONEL REGÜLASYONU" adlı tez çalışmasının savunma sınavı 06.01.2017 tarihinde yapılmış olup aşağıda verilen jüri tarafından oy birliği / oy çokluğu ile Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

Danışman
Prof. Dr. Feray KÖÇKAR

Üye
Prof. Dr. Kemal Sami KORKMAZ

Üye
Prof. Dr. Berrin TUNCA

Üye
Yrd. Doç. Dr. Hatice YILDIRIM

Üye
Yrd. Doç. Dr. Aylin ER

İmza


K. Korkmaz

Berrin
Aylin

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

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Doç. Dr. Necati ÖZDEMİR

.....

Bu tez çalışması TÜBİTAK tarafından 114Z025 nolu proje ile desteklenmiştir.

ÖZET

İNSAN ADAMTS-3 GENİNİN TRANSKRİPSİYONEL REGÜLASYONU

DOKTORA TEZİ

A.TUĞŞEN AYDEMİR

BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

(TEZ DANIŞMANI: PROF.DR. FERAY KÖÇKAR)

BALIKESİR, OCAK - 2017

Bağ dokunun temel bileşeni olan kollajenlerin olgunlaşma süreci oldukça karmaşık ve önemli bir süreçtir. Prokollojen moleküllerinin N-terminal ve C-terminal uçlarındaki peptitlerin doğru şekilde uzaklaştırılmaması halinde kollajen fibril organizasyonu aksamakta ve kollajenlerle bağlantılı çeşitli hastalıklar ortaya çıkmaktadır. İnsan ADAMTS-3 (bir disintegrin ve metalloproteaz trombospondin motif 3) geni kemik ve kırıkdağın temel kollajen tipi olan tip II kollajenin olgunlaşmasında görevli bir N-propeptidazdır. ADAMTS-3 ekspresyonuyla ilgili birçok çalışma yapılmış fakat gen ekspresyonu için en önemli basamak olan transkripsiyonel regülasyonu henüz aydınlatılmamıştır.

Çalışmada ilk olarak çeşitli hücre hatlarında ADAMTS-3 genine ait ekspresyon çalışmaları yapıldı. En fazla ekspresyon PC3 hücrelerinde gözlenirken tez çalışma modeli olan Saos-2 ve MG63 hücrelerinde de ADAMTS-3 ekspresyonu belirlendi. Gen regülasyon çalışmaları için ADAMTS-3 promotor bölgesine ait 1340 bp'lik bölgenin klonlaması gerçekleştirilerek, dört farklı promotor parçası TS3[-131/+40], TS3[-576/+40], TS3[-899/+40], TS3[-1340/+40] lusiferaz vektörüne klonlandı. Saos-2 ve MG63 hücrelerinde geçici transfeksiyonları yapılan promotor parçalarından en yüksek aktiviteyi TS3[-576/+40]'nın gösterdiği belirlendi. Biyoinformatik analizleri yapılan ADAMTS-3 promotorunun TATA kutusu içermediği, GC bazları açısından oldukça zengin olduğu ve başta SP1, C/EBP α ve USF transkripsiyon faktörleri için birçok bağlanma motifi içerdiği tespit edildi. SP1, C/EBP α ve USF için kotransfeksiyonları yapılan ADAMTS-3 geninin transkripsiyonel aktivitesinin azaldığı tespit edildi. Saos-2 hücrelerinde DNA-protein bağlanma analizleri ile SP1, C/EBP α ve USF'nin promotora bağlandığı belirlendi. Söz konusu transkripsiyon faktörlerinin aşırı ifadesi neticesinde ADAMTS-3'ün mRNA ve protein düzeyinde ifadesinin azaldığı Saos-2 ve MG63 hücrelerinde belirlendi.

Tip I, II ve III kollajen ekspresyonlarının SP1, C/EBP α ve USF aşırı ifadesi yapılmış MG63 hücrelerinde azaldığı belirlendi. Saos-2 hücrelerinde SP1'in tip I kollajen ekspresyonunu azaltırken, tip II ve III ekspresyonunu arttırdığı belirlendi. C/EBP α 'nın tip I ve II kollajen ekspresyonunu arttırırken tip III kollajeni azalttığı, USF'nin ise tip I, II ve III kollajen ekspresyonlarını azalttığı yapılan ekspresyon çalışmalarıyla belirlendi.

Sonuç olarak ADAMTS-3 promotorunun ve ADAMTS-3'ün işlediği temel kollajen tipi olan tip II kollajenin bu üç TF etkisi ile azaldığı osteosarkoma hücre modelinde tespit edildi.

ANAHTAR KELİMELER:ADAMTS-3, kollajen, osteosarkoma, transkripsiyonel düzenlenme, SP1, C/EBP α , USF.

ABSTRACT

TRANSCRIPTIONAL REGULATION OF HUMAN ADAMTS-3 GENE

PH. D THESIS

A. TUGSEN AYDEMİR

BALIKESİR UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE

BIOLOGY

(SUPERVISOR: PROF. DR. FERAY KOÇKAR)

BALIKESİR, JANUARY 2017

ADAMTS-3 is an N-pro peptidase that takes an important role in collagen maturation. Removal of the N- and C-terminus propeptides by specific enzymes, the N- and C-pro peptidases, is essential for the correct organization of collagen fibrils. Otherwise, collagen fibrils will assemble in a weakened and unorganized formation that causes several disorders in the collagenous tissues. ADAMTS-3 (A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 3) is mainly responsible for the maturation of type II collagen molecule which is the main component of the bone and cartilage. There are several expression studies about ADAMTS-3 gene however its transcriptional regulation has not been lightened up, yet.

In this study, we first determined the expression profile of the ADAMTS-3 gene in several cancer cell lines. ADAMTS-3 is mostly expressed in PC3 (prostate cancer) cells. ADAMTS-3 is also expressed in Saos-2 and MG63 cell lines which are the model cell lines of this project. For gene regulation studies, 1340 bp upstream of the promoter region of the ADAMTS-3 was cloned for the first time and four different promoter fragments TS3[-131/+40], TS3[-576/+40], TS3[-899/+40], TS3[-1340/+40] were cloned into luciferase vector. Basal activity studies showed that all the promoter fragments were active and TS3[-576/+40] showed the maximal activity for Saos-2 and MG63 cell lines. Bioinformatic analysis revealed that the promoter is GC-rich, includes several transcription binding motifs especially for SP1, C/EBP α , and USF and is lack of TATA box. By the cotransfection of SP1, C/EBP α , and USF, the transcriptional activity of ADAMTS-3 promoter decreased for both cell lines. The DNA-protein binding experiments confirmed the binding of SP1, C/EBP α and USF in Saos-2 cells. The overexpression of the transcription factors decreased the ADAMTS-3 mRNA and protein expression levels for Saos-2 and MG63 cells.

In MG63 cells, the expression levels of type I, II and III collagens were decreased by the presence of SP1, C/EBP α , and USF. In Saos-2 cells, while the type I collagen expression was decreased, the type II and III collagen expressions were increased by SP1. The overexpression of C/EBP α increased the expression of type I and II collagens, on the other hand, decreased the type III collagen expression. And the results for the effect of USF in MG63 cells showed that USF decreased the type I, II and III expression levels.

KEYWORDS: ADAMTS-3, collagens, osteosarcoma, transcriptional regulation, SP1, C/EBP α , USF.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
TABLO LİSTESİ	xii
SEMBOL VE KISALTMALAR LİSTESİ	xiii
ÖNSÖZ	xiv
1. GİRİŞ	1
1.1 Kollajenler	1
1.2 Fibriller Kollajenlerin Olgunlaşması.....	3
1.2.1 Fibriller Kollajenlerin Olgunlaşmasında Görev Alan Peptidazlar	4
1.3 ADAMTS Gen Ailesi.....	7
1.3.1 Prokollajen N-proteinazlar: <i>ADAMTS-2, -3 ve 14</i>	8
1.3.1.1 Prokollajen N-proteinazların Domain yapısı	8
1.3.1.2 <i>ADAMTS-2</i> Geni	10
1.3.1.3 <i>ADAMTS-14</i> Geni	11
1.3.1.4 <i>ADAMTS-3</i> Geni	13
1.4 Transkripsiyonel Regülasyon.....	15
1.4.1 SP1 Transkripsiyon Faktörü.....	17
1.4.2 C/EBP α Transkripsiyon Faktörü	18
1.4.3 USF Transkripsiyon Faktörü.....	19
2. TEZİN AMACI	21
3. MATERYAL VE METOT	24
3.1 Materyal	24
3.1.1 Çalışmada Kullanılan Kimyasallar	24
3.1.2 Çalışmada Kullanılan Cihazlar	26
3.2 Metot	27
3.2.1 Çalışma Ortamının ve Çalışma Ortamında Kullanılan Malzemenin Temizliği ve Sterilizasyonu	27
3.2.2 Bakteri Tabanlı Teknikler	28
3.2.2.1 Bakteriyal Hücre Soyları ve Kültür Ortamları	28
3.2.2.2 Çalışmada Kullanılan Plazmitler.....	28
3.2.2.3 Katı ve Sıvı Besiyerinin Hazırlanması.....	31
3.2.2.4 <i>E.coli</i> Hücrelerinin Kompetant Hale Getirilmesi.....	31
3.2.2.5 Transformasyon.....	32
3.2.2.6 Küçük Ölçekli (Mini Prep) Plazmit DNA İzolasyonu	32
3.2.2.7 Büyük Ölçekli (Maxi Prep) Plazmit DNA İzolasyonu	32
3.2.3 DNA Tabanlı Teknikler	33
3.2.3.1 Osteosarkoma Hücrelerinden Genomik DNA İzolasyonu.....	33
3.2.3.2 DNA Miktarının Spektrofotometrik Olarak Belirlenmesi	34
3.2.3.3 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR, PCR)	34
3.2.3.4 Agaroz Jel Elektroforezi	35
3.2.3.5 DNA Örneklerinin Agaroz Jelden Saflaştırılması	36
3.2.3.6 Ligasyon.....	36
3.2.3.7 Restriksiyon endonükleaz enzim kesimleri.....	36

3.2.3.8	Defosforilasyon	37
3.2.4	Hücre Kültürü Teknikleri	37
3.2.4.1	Hücre Kültürü Tekniklerine Kullanılan Solüsyonlar	37
3.2.4.1.1	PBS Tamponunun Hazırlanması	37
3.2.4.1.2	Tripsin-EDTA (TE) Tamponunun Hazırlanması	38
3.2.4.1.3	FCS (Fetal Sığır Serumu)'un Hazırlanması	38
3.2.4.1.4	Hücre kültürü medyumunun Hazırlanması	38
3.2.4.2	Hücre Kültüründe Kullanılan Hücre Hatları	38
3.2.4.3	Hücre Soyunun Başlatılması	39
3.2.4.4	Hücrelerin Pasajlanması	39
3.2.4.5	Canlı Hücrelerin Belirlenmesi (Tripın Mavisı Canlılık Testi) ve Hücre Sayımı	39
3.2.4.6	Hücrelerin Dondurulması	40
3.2.5	Transkripsiyonel Aktivitenin Belirlenmesi ile İlgili Teknikler	40
3.2.5.1	Kalsiyum Fosfat Presipitasyonu ile Geçici Transfeksiyon	40
3.2.5.2	Salınan Sistem Lusiferaz Aktivitesinin Ölçülmesi	41
3.2.5.3	SEAP (Salınan Alkalın Fosfataz) Aktivitesinin Ölçümü	42
3.2.6	RNA Tabanlı Teknikler	42
3.2.6.1	Hücre Pelletlerinden RNA İzolasyonunun Yapılması	42
3.2.6.2	RNA Miktar Tayini	43
3.2.6.3	RNA Jel Elektroföresi (Formaldehit Agaroz Jel Elektroföresi) ..	43
3.2.6.4	cDNA Eldesi ve RT-PCR	44
3.2.6.5	Real-Time PCR	45
3.2.6.6	Sonuçların Değerlendirilmesi	45
3.2.7	Protein Tabanlı Teknikler	46
3.2.7.1	Western Blot	46
3.2.7.1.1	Western Blot Çalışmalarında Kullanılan Çözeltiler	46
3.2.7.1.2	RIPA Tamponu ile Protein Örneklerinin Hazırlanması	47
3.2.7.1.3	SDS-PAGE	47
3.2.7.1.4	SDS Jelinin PVDF Membrana Transferi	48
3.2.7.1.5	Proteinlerin Belirlenmesi	48
3.2.7.1.6	Western Blot Analizi	49
3.2.7.2	İmmünofloresans Deneyleri	49
3.2.7.2.1	İmmün Florsans Analizi	50
3.2.8	DNA-Protein Etkileşimine Dayalı Teknikler	50
3.2.8.1	EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay) Tekniğı	50
3.2.8.1.1	Osteosarkoma Hücrelerinden Nükleer Ekstraktların Hazırlanması	50
3.2.8.1.2	Oligonükleotitlerin İşaretlenmesi	51
3.2.8.1.3	Oligonükleotitlerin Bağlanması	52
3.2.8.1.4	Bağlanma Reaksiyonu ve Örneklerin EMSA Jelinde Yürütülmesi	52
3.2.8.1.5	Proteinlerin Membrana Transferi	54
4. BULGULAR		55
4.1	İnsan <i>ADAMTS-3</i> Promotorunun pGEM-T easy vektörüne Klonlanması	55
4.1.1	Dizi Analizi	58
4.2	<i>ADAMTS-3</i> Promotorunun Biyoinformatik Analizi	60

4.2.1	1380 bç <i>ADAMTS-3</i> promotoru transkripsiyon bölgeleri bağlanma analizi.....	61
4.3	Çeşitli Büyüklüklerdeki <i>ADAMTS-3</i> Promotor Parçalarının Oluşturulması	63
4.3.1	TS3[-131/+40] Konstrakt İçin Alt Klonlama Çalışmaları	63
4.3.1.1	TS3[-131/+40] Konstrakt için pMet Luc vektörünün hazırlanması	64
4.3.1.2	TS3[-131/+40] Konstrakt için insert hazırlanması.....	65
4.3.1.3	TS3 [-131/+40] Konstrakt İçin Ligasyon.....	65
4.3.2	TS3 [-576/+40] Konstrakt İçin Alt Klonlama Çalışmaları	66
4.3.2.1	TS3 [-576/+40] Konstrakt için pMet Luc vektörünün hazırlanması	66
4.3.2.2	TS3 [-576/+40] Konstrakt için insert hazırlanması.....	67
4.3.2.3	TS3 [-576/+40] Konstrakt İçin Ligasyon.....	68
4.3.3	TS3[-899/+40] Konstrakt İçin Alt Klonlama Çalışmaları	70
4.3.4	TS3 [-1340/+40] Konstrakt İçin Alt Klonlama Çalışmaları	71
4.4	Farklı Hücre Hatlarında <i>ADAMTS-3</i> Ekspresyon Çalışmaları.....	73
4.4.1	Farklı Hücre Hatlarında mRNA Düzeyinde <i>ADAMTS-3</i> Ekspresyon Çalışmaları.....	73
4.4.2	Farklı Hücre Hatlarında Protein Düzeyinde <i>ADAMTS-3</i> Ekspresyon Çalışmaları.....	75
4.5	İnsan <i>ADAMTS-3</i> Genine Ait Promotorun Fonksiyonel Analizi .	76
4.5.1	İnsan <i>ADAMTS-3</i> Promotor Konstraktlarının Büyük Ölçekli (Maxi Prep) Plazmit DNA İzolasyonu	76
4.5.2	Kalsiyum Fosfat Geçici Transfeksiyonunun Salınan Lusiferaz Sisteminde Optimize Edilmesi.....	77
4.5.3	İnsan <i>ADAMTS-3</i> Geninin Bazal Promotor Aktivitesinin Belirlenmesi	78
4.6	İnsan <i>ADAMTS-3</i> geninin SP1, C/EBP α ve USF Transkripsiyon Faktörleri ile Regülasyonu	79
4.6.1	İnsan <i>ADAMTS-3</i> geninin SP1 Transkripsiyon Faktörü ile Regülasyonu	82
4.6.1.1	Saos-2 Hücrelerinde <i>ADAMTS-3</i> Geninin SP1 ile Regülasyonu .	82
4.6.1.1.1	İnsan <i>ADAMTS-3</i> promotorunun EMSA deneyleri kullanılarak SP1 transkripsiyon faktörü fonksiyonel bağlanma analizinin belirlenmesi.....	87
4.6.1.1.2	Saos-2 Hücrelerinde Kollajen Tip I-II ve III genlerinin SP1 ile Regülasyonu	92
4.6.1.2	MG63 Hücrelerinde <i>ADAMTS-3</i> Geninin SP1 ile Regülasyonu..	94
4.6.1.2.1	MG63 Hücrelerinde Tip I-II-III Kollajen Genlerinin SP1 ile Regülasyonu	97
4.6.2	İnsan <i>ADAMTS-3</i> geninin C/EBP α Transkripsiyon Faktörü ile Regülasyonu	99
4.6.2.1	Saos-2 Hücrelerinde <i>ADAMTS-3</i> Geninin C/EBP α ile Regülasyonu	99
4.6.2.1.1	İnsan <i>ADAMTS-3</i> promotorunun EMSA deneyleri kullanılarak C/EBP α transkripsiyon faktörü fonksiyonel bağlanma analizinin belirlenmesi.....	102
4.6.2.1.2	Saos-2 Hücrelerinde Tip I-II-III Kollajen Genlerinin C/EBP α ile Regülasyonu.....	103

4.6.2.2	MG63 Hücrelerinde <i>ADAMTS-3</i> Geninin C/EBP α ile Regülasyonu	104
4.6.2.2.1	MG63 Hücrelerinde Tip I-II-III Kollajen Genlerinin C/EBP α ile Regülasyonu	107
4.6.3	İnsan <i>ADAMTS-3</i> geninin USF Transkripsiyon Faktörü ile Regülasyonu	109
4.6.3.1	Saos-2 Hücrelerinde <i>ADAMTS-3</i> Geninin USF ile Regülasyonu	109
4.6.3.2	Saos-2 Hücrelerinde Tip I-II-III Kollajen Genlerinin USF ile Regülasyonu	114
4.6.3.3	MG63 Hücrelerinde <i>ADAMTS-3</i> Geninin USF ile Regülasyonu	114
4.6.3.4	MG63 Hücrelerinde Tip I-II-III Kollajen Genlerinin USF ile Regülasyonu	117
5.	SONUÇ VE TARTIŞMA	120
6.	KAYNAKLAR.....	127
7.	EKLER.....	146

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1.1: Kollajen moleküllerinin olgunlaşma süreci. [10]'den uyarlanmıştır....	3
Şekil 1.2: Kollajen molekülünün yapısı. [10]'den uyarlanmıştır.	4
Şekil 1.3: Prokollajen N-proteinazlara ait domain yapısı. [26] 'den uyarlanmıştır.....	9
Şekil 1.4: Ökaryotik gen ekspresyonunun 6 adet kontrol noktası.	16
Şekil 2.1: Tez çalışmasını özetleyen akış diyagramı.	23
Şekil 3.1: pGEM-T Easy (Promega) vektör haritası ve klonlama bölgeleri.....	29
Şekil 3.2: pMetLuc-Reporter (Clontech) vektör haritası ve klonlama bölgeleri.	29
Şekil 3.3: pMetLuc Kontrol vektörü (Clontech) haritası.....	30
Şekil 3.4: pSEAP2-Kontrol (Clontech) vektörü haritası.	30
Şekil 3.5: Hemositometre	40
Şekil 4.1: Genomik DNA jel görüntüsü.	55
Şekil 4.2: ADAMTS-3 primerlerine ait saç tokası analizi	56
Şekil 4.3: ADAMTS-3 forward primeri NCBI blast sonucu.	56
Şekil 4.4: ADAMTS-3 promotorunun PCR amplifikasyonu agaroz jel elektroforez görüntüsü.....	57
Şekil 4.5: Promotor bölgesinin pGEM-T Easy vektörüne klonlanmasının kontrol kesimleri jel görüntüsü.	58
Şekil 4.6: pGEM-T Easy vektörüne ligasyonu yapılan 1380 bç'lik ADAMTS-3 promotor bölgesinin dizileme sonuçlarının gen bankasındaki dizi ile karşılaştırılması.	59
Şekil 4.7: ADAMTS-3 promotoru CpG adası ve % GC analizi.	60
Şekil 4.8: ADAMTS-3 promotor bölgesi sekonder yapı oluşumları maksimum ve minimum ΔG değerleri belirtilmiştir.....	61
Şekil 4.9: ADAMTS-3 promotor bölgesi üzerindeki muhtemel transkripsiyon faktörü bağlanma bölgelerinin dizi üzerinde gösterimi.....	62
Şekil 4.10: Oluşturulması planlanan ADAMTS-3 promotor parçalarının şematik görüntüsü.....	63
Şekil 4.11: TS3[-131/+40] konstrakt klonlama planı	64
Şekil 4.12: Alt klonlama için kullanılan ve linearize olmuş pMet-Luc vektör kesimi agaroz jel görüntüsü. 1-10: pMet luc vektörü, M: Büyüklük Belirteci	64
Şekil 4.13: pGEM-T Easy vektörü SacI ve SacII kesimi agaroz jel görüntüsü..	65
Şekil 4.14: TS3[-131/+40] konstrakt kontrol kesimi agaroz jel görüntüsü.	66
Şekil 4.15: TS3[-576/+40] konstrakt klonlama planı	66
Şekil 4.16: Alt klonlama için kullanılan ve linearize olmuş pMet-Luc vektör kesimi agaroz jel görüntüsü. 1-19: pMet luc vektörü, M: Büyüklük Belirteci	67
Şekil 4.17: pGEM-T Easy vektörü SacII kesimi agaroz jel görüntüsü.	68
Şekil 4.18: TS3[-576/+40] konstrakt kontrol kesimi agaroz jel görüntüsü. M: Büyüklük Belirteci, 1-2: 616 bç + pMet Luc vektörü.....	69
Şekil 4.19: TS3 [-576/+40] klonlama için oryantasyon kontrol kesimi agaroz jel görüntüsü.....	69
Şekil 4.20: 939 bç'lik PCR ürününe ait agaroz jel görüntüsü.	70
Şekil 4.21: TS3 [-899/+40] konstrakt için kontrol kesim sonucu.....	71
Şekil 4.22: TS3 [-1340/+40] PCR sonucu agaroz jel görüntüsü.	72

Şekil 4.23: TS3[-1340/+40] konstrakt için <i>SacII</i> kontrol kesim sonucu.	73
Şekil 4.24: Farklı hücre hatlarında mRNA düzeyinde <i>ADAMTS-3</i> ekspresyonunun belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilen RT-PCR sonucu agaroz jel görüntüleri.	74
Şekil 4.25: Farklı hücre hatlarında mRNA düzeyinde <i>ADAMTS-3</i> ekspresyon seviyeleri.....	75
Şekil 4.26: Farklı hücre hatlarındaki <i>ADAMTS-3</i> ekspresyon analizi bant görüntüleri	76
Şekil 4.27: Farklı hücre hatlarında protein düzeyinde <i>ADAMTS-3</i> ekspresyon seviyeleri	76
Şekil 4.28: A: pMet Luc Kontrol vektörü, B: pMet Luc reporter (haberci) vektörü transfeksiyon aktivitesi.	77
Şekil 4.29: Saos-2 hücrelerinde <i>ADAMTS-3</i> promotor parçalarının karşılaştırmalı bazal aktiviteleri	78
Şekil 4.30: MG63 hücrelerinde <i>ADAMTS-3</i> promotor parçalarının karşılaştırmalı bazal aktiviteleri.	79
Şekil 4.31: SP1, C/EBP α ve USF transkripsiyon faktörlerinin aşırı ifadesi sonrası <i>ADAMTS-3</i> ekspresyon çalışmaları için düzenlenen plan özeti.	80
Şekil 4.32: Saos-2 hücrelerinde kontrol ve deney gruplarına ait RNA'ların formaldehit agaroz jel elektroforezi görüntüsü.	81
Şekil 4.33: MG63 hücrelerinde kontrol ve deney gruplarına ait RNA'ların formaldehit agaroz jel elektroforezi görüntüsü.	81
Şekil 4.34: Saos-2 hücrelerinde SP1'in 6-24-48 ve 72 saat inkübasyon süreleri sonunda geçici over ekspresyonunu gösteren sqRT-PCR jel görüntüsü	82
Şekil 4.35: Saos-2 hücrelerinde SP1'in 6- 24- 48 ve 72 saat inkübasyon süreleri sonunda geçici over ekspresyonunu sonucu SP1'in maksimum ifade olduğu inkübasyon süresini gösteren grafik.....	83
Şekil 4.36: SP1 aşırı ifadesi sonrası Saos-2 hücrelerinde immunofloresans görüntüleri.	83
Şekil 4.37: SP1 aşırı ifadesi sonrası Saos-2 hücrelerinde immunofloresans değerlendirmeleri.	84
Şekil 4.38: Saos-2 hücrelerinde SP1 transkripsiyon faktörünün geçici over ekspresyonu ile <i>ADAMTS-3</i> geni protein düzeyine olan etkisini gösteren western blot membranı ve densitometrik analiz sonucu elde edilen sonuç grafiği.	85
Şekil 4.39: SP1 aşırı ifadesi sonrası Saos-2 hücrelerinde <i>ADAMTS-3</i> proteini immunofloresans görüntüleri.	85
Şekil 4.40: SP1 aşırı ifadesi sonrası Saos-2 hücrelerinde <i>ADAMTS-3</i> proteini immunofloresans değerlendirmeleri.....	86
Şekil 4.41: Saos-2 hücrelerinde SP1 transkripsiyon faktörünün geçici over ekspresyonunun <i>ADAMTS-3</i> mRNA düzeyine olan etkisi.....	86
Şekil 4.42: Saos-2 hücrelerinde SP1 transkripsiyon faktörünün <i>ADAMTS-3</i> promotor aktivitesine etkileri	87
Şekil 4.43: Saos-2 nükleer ekstraktı ve SP1 biotinli probu kullanılarak gerçekleştirilen EMSA sonucu.....	89
Şekil 4.44: Saos-2 nükleer ekstraktı ve prob [-40/-12] kullanılarak gerçekleştirilen yarışma EMSA sonucu.	90

Şekil 4.45: Saos-2 nükleer ekstraktı ve prob [-131/-103] kullanılarak gerçekleştirilen yarışma EMSA sonucu.	90
Şekil 4.46: Saos-2 nükleer ekstraktı ve prob [-489/-450] kullanılarak gerçekleştirilen yarışma EMSA sonucu.	91
Şekil 4.47: Saos-2 nükleer ekstraktı ve prob [-641/-607] kullanılarak gerçekleştirilen yarışma EMSA sonucu.	92
Şekil 4.48: SP1 aşırı ifadesi sonrası Saos-2 hücrelerinde Tip II Kollajen proteini immunofloresans görüntüleri.	93
Şekil 4.49: SP1 aşırı ifadesi sonrası Saos-2 hücrelerinde Tip II Kollajen proteini immunofloresans değerlendirmeleri.	93
Şekil 4.50: Saos-2 hücrelerinde SP1 transkripsiyon faktörünün geçici over ekspresyonunun tip I-II-III kollajenlerinin mRNA düzeyine olan etkisi.	94
Şekil 4.51: MG-63 hücrelerinde SP1'in 6- 24 ve 48 saatlik inkübasyonu sonunda maksimum ifade olduğu inkübasyon süresini gösteren grafik.	95
Şekil 4.52: MG63 hücrelerinde SP1 transkripsiyon faktörünün geçici over ekspresyonu ile <i>ADAMTS-3</i> geni protein düzeyine olan etkisini gösteren western blot membranı ve densitometrik analiz sonucu elde edilen sonuç grafiği.	95
Şekil 4.53: MG-63 hücrelerinde SP1 transkripsiyon faktörünün geçici over ekspresyonunun <i>ADAMTS-3</i> mRNA düzeyine olan etkisini gösteren grafik.	96
Şekil 4.54: MG63 hücrelerinde SP1 transkripsiyon faktörünün <i>ADAMTS-3</i> promotor aktivitesine üzerine etkilerini gösteren grafik.	97
Şekil 4.55: MG63 hücrelerinde SP1 transkripsiyon faktörünün Tip II Kollajen protein düzeyine olan etkisinin membran görüntüsü ve grafiği.	98
Şekil 4.56: MG63 hücrelerinde SP1 transkripsiyon faktörünün geçici over ekspresyonunun Tip II Kollajen mRNA düzeyleri üzerine olan etkisi.	98
Şekil 4.57: MG63 hücrelerinde SP1 transkripsiyon faktörünün geçici over ekspresyonunun Tip I ve Tip III Kollajen mRNA düzeyleri üzerine olan etkisi.	99
Şekil 4.58: Saos-2 hücrelerinde C/EBP α 'ın 6-24-48 ve 72 saat inkübasyon süreleri sonunda geçici over ekspresyonunu gösteren sqRT-PCR jel görüntüsü.	99
Şekil 4.59: Saos-2 hücrelerinde C/EBP α 'nın 6- 24- 48 ve 72 saat sonunda geçici over ekspresyonu sonucu C/EBP α 'nın maksimum ifade olduğu inkübasyon süresini gösteren grafik.	100
Şekil 4.60: Saos-2 hücrelerinde C/EBP α transkripsiyon faktörünün geçici over ekspresyonu ile <i>ADAMTS-3</i> geni protein düzeyine olan etkisini gösteren western blot membranı ve densitometrik analiz sonucu elde edilen sonuç grafiği.	101
Şekil 4.61: Saos-2 hücrelerinde C/EBP α transkripsiyon faktörünün geçici over ekspresyonunun <i>ADAMTS-3</i> mRNA düzeyine olan etkisi.	101
Şekil 4.62: Saos-2 hücrelerinde C/EBP α transkripsiyon faktörünün <i>ADAMTS-3</i> promotor aktivitesine üzerine etkilerini gösteren grafik.	102
Şekil 4.63: Saos-2 nükleer ekstraktı ve prob [-131/-103] kullanılarak gerçekleştirilen C/EBP α yarışma EMSA sonucu.	103

Şekil 4.64: Saos-2 hücrelerinde C/EBP α transkripsiyon faktörünün geçici over ekspresyonunun Tip I-II ve III Kollajen mRNA düzeylerine olan etkisi	104
Şekil 4.65: MG-63 hücrelerinde C/EBP α 'nın 6- 24 ve 48 saat sonunda geçici over ekspresyonu sonucu C/EBP α 'nın maksimum ifade olduğu inkübasyon süresini gösteren grafik	105
Şekil 4.66: MG-63 hücrelerinde C/EBP α transkripsiyon faktörünün geçici over ekspresyonu ile <i>ADAMTS-3</i> geni protein düzeyine olan etkisini gösteren western blot membranı ve densitometrik analiz sonucu elde edilen sonuç grafiği.	105
Şekil 4.67: MG-63 hücrelerinde C/EBP α transkripsiyon faktörünün geçici over ekspresyonunun <i>ADAMTS-3</i> mRNA düzeyine olan etkisi.....	106
Şekil 4.68: MG63 hücrelerinde C/EBP α transkripsiyon faktörünün <i>ADAMTS-3</i> promotor aktivitesine etkileri	107
Şekil 4.69: MG63 hücrelerinde C/EBP α transkripsiyon faktörünün Tip II Kollajen'in protein düzeyine olan etkisini gösteren membran ve densitometrik analiz sonucu.	108
Şekil 4.70: MG63 hücrelerinde C/EBP α transkripsiyon faktörünün geçici over ekspresyonunun tip II Kollajenin mRNA düzeyine olan etkisi.....	108
Şekil 4.71: MG63 hücrelerinde C/EBP α transkripsiyon faktörünün geçici over ekspresyonunun tip I-II-III Kollajenlerinin mRNA düzeyine olan etkisi	109
Şekil 4.72: Saos-2 hücrelerinde USF'nin 6- 24- 48 ve 72 saat inkübasyon süreleri sonunda geçici over ekspresyonunu gösteren sqRT-PCR jel görüntüsü	109
Şekil 4.73: Saos-2 hücrelerinde USF'nin 6- 24- 48 ve 72 saat sonunda geçici over ekspresyonu sonucu USF'nin maksimum ifade olduğu inkübasyon süresini gösteren grafik	110
Şekil 4.74: Saos-2 hücrelerinde USF transkripsiyon faktörünün geçici over ekspresyonu ile <i>ADAMTS-3</i> geni protein düzeyine olan etkisini gösteren western blot membranı ve densitometrik analiz sonucu elde edilen sonuç grafiği.	111
Şekil 4.75: Saos-2 hücrelerinde USF transkripsiyon faktörünün geçici over ekspresyonunun <i>ADAMTS-3</i> mRNA düzeyine olan etkisi.....	111
Şekil 4.76: Saos-2 hücrelerinde USF transkripsiyon faktörünün <i>ADAMTS-3</i> promotor aktivitesine etkileri	112
Şekil 4.77: Saos-2 nükleer ekstraktı ve biotinli prob [-973/-937] kullanılarak gerçekleştirilen EMSA sonucu.....	113
Şekil 4.78: Saos-2 nükleer ekstraktı ve prob [-641/-607] kullanılarak gerçekleştirilen yarışma EMSA sonucu.	113
Şekil 4.79: Saos-2 hücrelerinde USF transkripsiyon faktörünün geçici over ekspresyonunun Tip I-II ve III Kollajen mRNA düzeylerine olan etkisi	114
Şekil 4.80: MG-63 hücrelerinde USF'nin 6- 24- 48 ve 72 saat sonunda geçici over ekspresyonu sonucu USF'nin maksimum ifade olduğu inkübasyon süresini gösteren grafik	115
Şekil 4.81: MG-63 hücrelerinde USF transkripsiyon faktörünün geçici over ekspresyonu ile <i>ADAMTS-3</i> geni protein düzeyine olan etkisini gösteren western blot membranı ve densitometrik analiz sonucu elde edilen sonuç grafiği.	116

Şekil 4.82: MG-63 hücrelerinde USF transkripsiyon faktörünün geçici overekspresyonunun <i>ADAMTS-3</i> mRNA düzeyine olan etkisini gösteren grafik	116
Şekil 4.83: MG63 hücrelerinde USF transkripsiyon faktörünün <i>ADAMTS-3</i> promotor aktivitesine etkileri	117
Şekil 4.84: MG63 hücrelerinde USF transkripsiyon faktörünün tip II kollajenin protein düzeyine olan etkisini gösteren membran ve densitometrik analiz sonucu	118
Şekil 4.85: MG63 hücrelerinde USF transkripsiyon faktörünün geçici over ekspresyonunun Tip II Kollajen'in mRNA düzeyine olan etkisi...	119
Şekil 4.86: MG63 hücrelerinde USF transkripsiyon faktörünün geçici over ekspresyonunun Tip I ve Tip III Kollajenleri'nin mRNA düzeyine olan etkisi	119

TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 1.1: Kollajen tipleri, fonksiyonları, lokalize oldukları dokular ve olgunlaşma sürecinde görev alan enzimler.	5
Tablo 3.1: Çalışmada kullanılan kimyasalların listesi	24
Tablo 3.2: Çalışmada kullanılan cihazların listesi.	26
Tablo 3.3: Genomik DNA izolasyonunda kullanılan solüsyonlar.	33
Tablo 3.4: PCR reaksiyon kimyasalları.....	34
Tablo 3.5: PCR koşulları.....	35
Tablo 3.6: DNA agaroz jel elektroforezinde kullanılan çözeltiler.	35
Tablo 3.7: Kesim koşulları.	36
Tablo 3.8: Defosforilizasyon koşulları.....	37
Tablo 3.9: Kalsiyum fosfat presipitasyonu ile geçici transfeksiyon çalışmalarında kullanılan solüsyonlar.	41
Tablo 3.10: Lusiferaz ve SEAP aktivitesinin ölçümünde kullanılan solüsyonlar	42
Tablo 3.11: Formaldehit agaroz jel elektroforezi jel tamponu.....	43
Tablo 3.12: 1 X FA jel elektroforezi tank tamponu.	44
Tablo 3.13: cDNA eldesi için uygun RT-PCR bileşenleri.	44
Tablo 3.14: Real Time PCR döngü koşulları.	45
Tablo 3.15: Western blot çalışmalarında kullanılan tampon ve çözeltiler.....	46
Tablo 3.16: SDS-PAGE ayırma ve yığma jeli içerikleri.....	47
Tablo 3.17: Enzim sulandırma reaksiyon bileşenleri.	51
Tablo 3.18: Biotinleme reaksiyonu bileşenleri.	52
Tablo 3.19: Bağlanma reaksiyon bileşenleri.	52
Tablo 3.20: EMSA jeli bileşenleri.	53
Tablo 4.1: <i>ADAMTS-3</i> promotor primerleri.....	56
Tablo 4.2: <i>ADAMTS-3</i> promotor bölgesini için yapılan PCR reaksiyon koşulları.....	57
Tablo 4.3: TS3 [-899/+40] konstraktın klonlanması için dizayn edilen kesim bölgesi içeren primerler.	70
Tablo 4.4: TS3 [-1340/+40] konstraktın klonlanması için dizayn edilen kesim bölgesi içeren primerler.....	71
Tablo 4.5: Ekspresyon çalışmalarında kullanılan primerler.....	73
Tablo 4.6: EMSA deneylerinde kullanılan sentetik oligonükleotitler ve içerdikleri bağlanma motifleri.....	88

SEMBOL VE KISALTMALAR LİSTESİ

ADAMTS	: A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs
ADAMTS-3	: A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motif 3
ECM	: Ekstrasellüler matriks
MMP	: Matriks metallo proteinaz
SP1	: Specificity protein 1 alpha
C/EBPα	: CCAAT-enhancer-binding proteins alpha
USF	: Upstream stimulatory factor 1
DNA	: Deoksi ribonükleik asit
gDNA	: Genomik DNA
mRNA	: Mesajcı ribonükleik asit
G	: Guanin
C	: Sitozin
T	: Timin
A	: Adenin
bç	: Baz çifti
GAPDH	: Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
PBS	: Phosphate-buffered saline
GTP	: Guanozin trifosfat
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle's Medium
FCS	: Fetal calf serum
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
SEAP	: Secreted embryonic alkaline phosphatase
mg	: Miligram
μg	: Mikrogram
ng	: Nanogram
ml	: Mililitre
μl	: Mikrolitre
nm	: Nanometre
fmol	: Femtomol
EMSA	: Electromobility shift assay
DEPC	: Dietilpirokarbonat
UV	: Ultra-viyole
RPM	: Dakikadaki dönüş sayısı
O.D	: Optik Dansite
Ct	: Cycle Threshold
B	: Beta
A	: Alfa

ÖNSÖZ

Bu tezi ilime ve fene inanan, Ulu Önder M.K. Atatürk'ün izinde yürüyen, çağdaş ve Cumhuriyetçi Türk kadınlarına ithaf ediyorum.

Sekiz yıllık yüksek lisans ve doktora eğitim hayatım boyunca sabırla danışmanlığımı yapan, bilimsel araştırma adına beni ileriye taşıyan, bizlere yüksek laboratuvar imkanları sağlayarak dünya standartları ile yarışmamıza imkan veren ve benim için harcadığı tüm emeklere borçlu olduğum değerli danışman hocam Prof. Dr. Feray Köçkar'a,

Tez izleme jürimde bulunarak katkılarıyla ufkumu açan, tezimde çözülmez noktalarda destek olan ve samimiyetiyle kendime güvenmemi sağlayan değerli hocam Prof. Dr. Kemal S. Korkmaz'a,

Projede birlikte çalışmaktan keyif aldığım ve tez çalışmam boyunca bana destek olan sevgili hocam Yrd. Doç. Dr. Meltem Alper'e,

Varlıklarıyla hem deneysel anlamda hem de sosyal yaşantımda hiçbir zaman desteklerini esirgemeyen çok sevgili hocalarım Yrd. Doç. Dr. Ayla S. Avcıkurt'a, Yrd. Doç. Dr. Bahar Sunay'a, Yrd. Doç. Dr. Elif Savaş'a, Yrd. Doç. Dr. Hatice Yıldırım'a, Yrd. Doç. Dr. Sümeyye A. Türkoğlu'na ve Doç. Dr. Olga Sak'a,

Ekip arkadaşlığından öte dostum, kardeşim, sırdaşım ve kahrkahanam olan, başarılarıyla övündüğüm çok kıymetli dostlarım Derya O. Altan, Esra S. Tokay ve Gülinay Selçuk'a,

Laboratuvarda birlikte çalışmaktan ve karşılıklı yardımlaşmaktan mutluluk duyduğum tüm değerli ekip arkadaşlarıma,

Çok sevgili ve kıymetli arkadaşım, kendimi güçlü hissetmemi sağlayan hayattaki desteğim ve neşe kaynağım Filiz Uzun'a,

Kıymetli genleriyle oluşturdukları muhteşem çaprazlama neticesinde bana hayat veren, sanatsal ve duygusal zekasını aldığım canım anneme, mantıksal ve sayısal zekasını aldığım canım babama, oyuncaklarını aldığım canım abime, hayatta daima dik durmamı sağladıkları ve her zaman daha çok çalışmam konusunda beni destekledikleri için en kıymetli varlığım aileme,

Sonsuz teşekkürlerimi, sevgi ve saygılarımı sunarım.

A. Tuğşen Aydemir

"Hayatta en hakiki mürşit ilimdir fendir. İlim ve fenden başka yol gösterici aramak gaflettir, dalalettir, cehalettir." sözleriyle bundan 90 yıl önce bilime ışık tutan ve açtığı bu aydınlık yolda son nefesime kadar yürümeye söz verdiğim Ulu Önder M.K.ATATÜRK'e minnet ve şükranlarımı sunarım.

1. GİRİŞ

1.1 Kollajenler

Kollajenler, hayvanlarda doğal olarak sentezlenen, bağ dokunun dayanıklılığını ve esnekliğini sağlayan hücre dışı bir grup proteindir. Genel olarak bağ dokuda bulunmakta olup, hücre tutunması, göç, büyüme ve farklılaşma gibi önemli biyolojik olayların düzenlenmesinde büyük rol oynarlar [1, 2]. Kollajen, kanın pıhtılaşmasında etkilidir; kan pıhtısı ile etkileşerek yarayı kapatır, kan pıhtısı zamanla büzüldüğü halde kollajen lifleri, ağı zedelenen yüzey üzerinde yeni bir hücre tabakası gelişinceye kadar yarayı örter. Memelilerde en çok bulunan protein kollajendir ve tüm vücuttaki proteinin %25-%30 kadarını oluşturur. Kas dokusunun en önemli bileşenini oluşturur. Kollajen, kas dokusunun %1-%2'sini ve vücut ağırlığının %6'sı oluşturur. Cilt, kemik, tendon, kırkırdak, kan damarları ve dişin en önemli fibröz bileşenini oluştururlar. Kollajen organizasyonu; korneada ortogonal tabakalar halinde, akciğerlerde düzensiz bir şekilde, deri ve tendonlarda sıkı paralel demetler halinde, kırkırdakta gevşek ağ yapısında, kemik ve dişlerde kalsiyum fosfat kristalleri için matriks oluşturacak şekilde meydana gelmektedir.

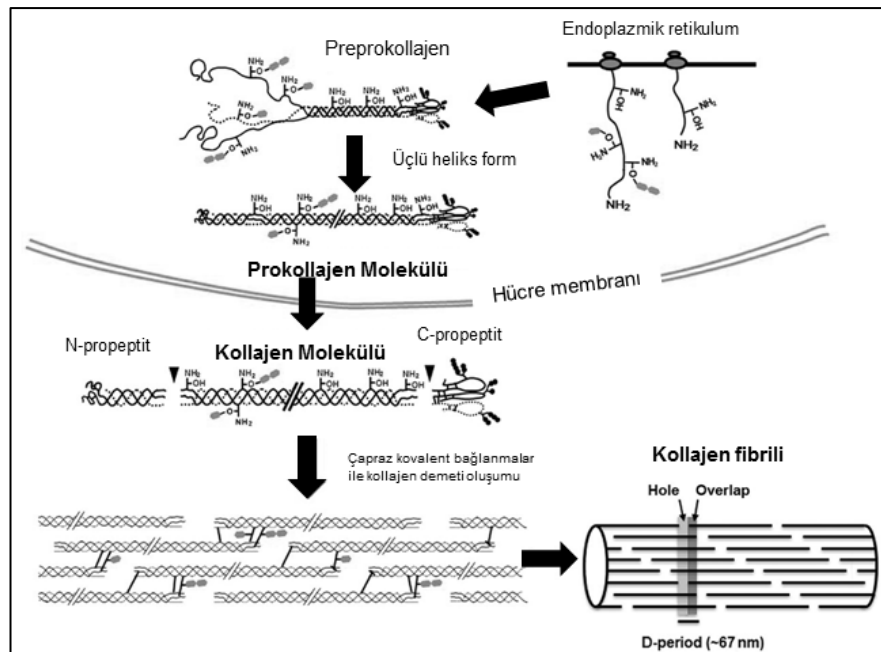
Yapısal rollerinin yanısıra kollajenler aynı zamanda doku oluşumunda da direk rol oynarlar [3]. Kollajenler ekstraselüler matriks (ECM)'in yapısını oluşturan temel proteinleri içerirler. Ekstraselüler matriks, protein ve karbohidratlardan oluşmuş, bağ doku hücrelerini saran ve desekleyen bir ağdır. Yapısal ve mekanik fonksiyonları dışında ECM molekülleri birçok hücre fonksiyonu düzenler, embriyonik gelişim, enflamasyon, yara iyileşmesi, tümör oluşumu ve metastaz gibi birçok fizyolojik ve patolojik süreçte kilit rol oynar. ECM ve hücreler arasındaki iletişim integrinlerin de dahil olduğu hücre matriks reseptörleri tarafından sağlanmaktadır. ECM durağan değildir, sürekli olarak yenilenmektedir. Bu dinamik yapıyı sağlayan da proteazlardır. Bu proteazlara matriks metalloproteazları denilmektedir [4].

Kollajen moleküllerinin bir diğer çarpıcı özelliği, amino asit dizisinin tekrarlayan tripeptit olmasıdır. Bu tekrarlayan tripeptit, (Glisin–X–Prolin) veya (Glisin–X–Hidroksiprolin) şeklinde gösterilebilir ki burada X, herhangi bir amino asit olabilir. Kollajenler, triptofan içermez. Kollajenin yapısındaki amino asitlerin yaklaşık %35'i glisin, %21'i prolin ve hidroksiprolin, %11'i alanindir.

Şimdiye kadar kollajen süper ailesine dahil olan 27 farklı kollajen tipi aydınlatılmıştır. Kollajenler polimerik yapılarına veya benzer fonksiyonlara sahip olmalarına göre gruplara ayrılırlar (Tablo 1.1): (a) fibriller formda olanlar (Kollajen I, II, III, V, XI, XXIV ve XXVII), (b) ağ benzeri yapı oluşturanlar (Kollajen IV, VIII ve X), (c) kollajen fibrillerinin yüzeyinde bulunan ve üçlü helikal formda fibriller oluşturanlar (FACIT tip: fibril-associated collagen with interrupted triple helices; kollajen IX, XII, XIV, XVI ve XIX), (d) boncuk şeklinde filamentler oluşturanlar (Kollajen VI), (e) basal membranın tabanına tutunarak fibriller oluşturanlar (Kollajen VII), (f) transmembran domainine sahip olanlar (Kollajen XIII, XVII, XXIII ve XXV), (g) basal membranlarda antianjiogenik kısımları oluşturanlar (Kollajen XV ve XVIII), (h) tip I kollajenle bağlantılı fibriller oluşturanlar (Kollajen XX ve XXIV), (i) henüz tümüyle aydınlatılmamış olanlar (Kollajen XXI, XXII ve XXVI) [5]. Kollajenlerin molekül tipleri ve hatta oluşturdıkları özgün supramoleküler agregatlar dahi dokuya özgündür ve özelleşmiş fonksiyonlara sahiptir (Tablo 1.1). Örneğin; kollajen I cildin temel kollajen yapısını oluşturur, dermiste gelişigüzel yığınlar halinde düzenlenmişken, tendonlarda paralel olarak düzenlenmişlerdir. Kıkırdak ECM'sine özgün kollajen II, proteoglikanların bağlandığı ve basınca karşı direnç gösteren geniş bir ağ örtüsü oluşturur. Omurgalılarda iskelet yapısı kıkırdak ve mineralize kemikten oluşmaktadır. Kıkırdak dokusunun temel yapısını tip II, tip XI ve tip XXVII kollajen oluştururken, mineralize kemik dokusu tip I, tip V ve tip XXIV kollajenden oluşur [6]. Her ne kadar tip XI ve tip XXVII kollajen ekspresyonu öncelikli olarak kıkırdak dokuda görülse de her iki tip kollajen, hasar ve çeşitli hastalıklar söz konusu olduğunda kemik dokuda ekspresyonları görülmektedir. Tip XI kollajen kemikte embriogenez ve kemik hasarlarının onarımı sırasında görülürken [7], tip XXVII kollajen ekspresyonu kemik oluşumu sırasında ve gözde meydana gelen anormal durumlarda ekspresyon olmaktadır [8, 9].

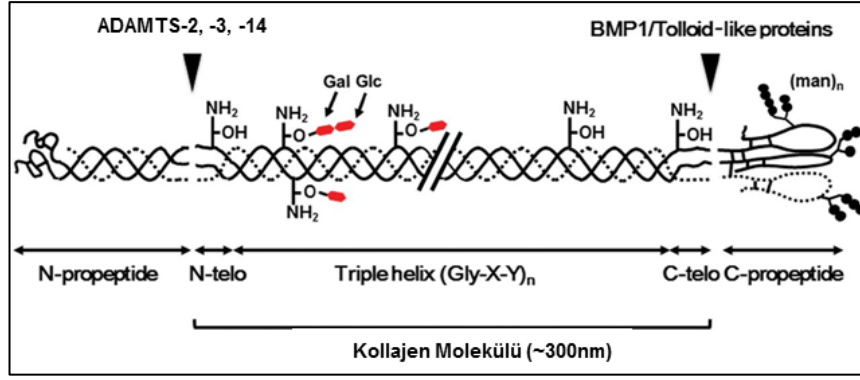
1.2 Fibriller Kollajenlerin Olgunlaşması

Kollajenlerin sentezi, salgılanması ve supramoleküller olarak bir araya gelmesi oldukça karmaşık ve çok basamaklı bir süreçtir. Fibriller kollajenler (I, II, III, V, XI, XXIV ve XXVII) amino ve karboksi uçlarında olgunlaştırılması sürecinde uzaklaştırılması gereken rezidüleri taşıyan prokollajen monomerleri olarak sentezlenirler. Daha sonra bu monomerler üçlü helikal yapılar olacak şekilde bir araya gelirler. Prokollajenler, N-terminalinde 20 bin molekül ağırlıklı ve C-terminalinde 30-35 bin molekül ağırlıklı iki peptit içerir. Prokollajen moleküllerinin iki ucunda bulunan peptitlerdeki sistein kalıntıları, N-terminalde zincir içi, C-terminalde ise hem zincir içi hem zincirler arası disülfid bağları oluştururlar ve prokollajen molekülleri üçlü sarmal halinde bir araya gelirler (Şekil 1.1). Bu propeptitler protein çözünürlüğünü muhafaza ederek, istenmeyen bölgelerdeki spontan fibril oluşumuna engel olurlar.



Şekil 1.1: Kollajen moleküllerinin olgunlaşma süreci. Bekhouche ve Colige'den uyarlanmıştır [10].

Prokollajen N-propeptidazlar (*ADAMTS-2*, -3, -14) ve prokollajen C-propeptidaz (*BMP-1*: kemik morfogenetik protein-1) ekstraselüler alanda görevli propeptitlerdir (Şekil 1.2). Bu propeptitler sırasıyla prokollajenin N-terminal ve C-terminal uçları kesip atarlar. Uçların kesip atılması sonrası kollajenler hızla fibrillere dönüşür.



Şekil 1.2: Kollajen molekülünün yapısı. Bekhouche ve Colige'den uyarlanmıştır[10].

Kollajen fibrillerinin oluşmasında küçük proteoglikanlar ve diğer bazı kollajenler de rol oynar [11]. Kollajen fibrilleri çeşitli doku ve organlardaki ekstraselüler matris yapılanması için önem taşıyan büyük protein bileşenleridir [12, 13]. Ekstraselüler matrisde görev alan ve kollajen moleküllerinin olgunlaşması sırasında N-terminal uçların uzaklaştırılmasını sağlayarak prokollajen N-propeptidaz aktivitesi gösteren enzimler, birer matris metalloproteinazdır ve ADAMTS gen ailesinin bir üyesi olarak *ADAMTS-2*, -3 ve -14 olarak isimlendirilirler.

1.2.1 Fibriller Kollajenlerin Olgunlaşmasında Görev Alan Peptidazlar

Kollajen fibrillerinin olgunlaşmasındaki en kritik nokta N-terminal ve C-terminal uçlarında bulunan peptitlerin prokollajen N- ve C- proteinazlar tarafından uzaklaştırılmasıdır [14]. C-terminal uçtaki peptitlerin uzaklaştırılması, fibril oluşumundaki kritik konsantrasyonun sağlanabilmesi ve kollajenlerin doğru düzenleme ile fibrillere dönüşümü açısından özellikle büyük önem taşımaktadır [15, 16]. Bu süreç *in vitro* koşullarda yeniden oluşturulduğunda üçlü helikal kollajen molekülleri spontan bir şekilde agregasyona uğrayarak fibrilleri meydana getirirler [17, 18]. C-proteaz aktivitesi çinko metalloproteinazların tolloid ailesine ait üyeler tarafından gerçekleştirilir [Kemik morfogenetik proteini 1 (BMP-1), memeli tolloidleri (mTLD) ve tolloid benzeri 1 (TLL-1)] [19-23].

N-proteinaz aktivitesi ise ADAMTS gen ailesi üyeleri *ADAMTS-2*, -3 ve -14 tarafından gerçekleştirilir [24-26]. N-propeptidazlar, prokollajen I, II, III, V ve XI için biyokimyasal olarak farklılık gösterir. İnsanda, tendon, kemik, cilt, kornea ve kan

damarlarının duvarında bulunan tip I prokollajen ve kemik ve kıkırdığın yapısında bulunan tip II prokollajen *ADAMTS-3* tarafından olgunlaştırılırken, ciltte ve damarlarda tip I kollajenle birlikte bulunan tip III prokollajen *ADAMTS-2* tarafından olgunlaştırılır. *ADAMTS-14*'ün tendonlarda tip I prokollajenin işlenmesinde *ADAMTS-3*'le birlikte görev aldığı düşünülmektedir. Tip V kollajen alışıldıktan farklı olarak işlenmektedir. Bu kollajen tipinde N-propeptitler tolloid ailesi üyeleri tarafından uzaklaştırılırken, C-propeptitler ya BMP-1-benzeri enzimler veya furin benzeri proprotein dönüştürücüleri tarafından uzaklaştırılırlar [27-30]. Tip XI kollajenin N-terminal ve C-terminal uçlarında N- ve C-propeptidazlar için tanıma residüleri tespit edilmemiştir. Fakat tip XI kollajenin tip II kollajenle olan benzerlikleri ve kıkırdakta tip II kollajenle birlikte heterotipik fibriller oluşturmaları sebebi ile tip XI kollajenin olgunlaşma sürecinin tip II kollajenle benzer şekilde gerçekleştiği düşünülmektedir [31]. Tip XXIV ve tip XXVII kollajenlerde N-propeptit ve C-propeptit bölgeleri için endopeptidaz kesim bölgelerine rastlanmamıştır. Bu bölgelerinde peptidaz aktivitesi olmadığı şimdiki kadar yapılan çalışmalar sonucunda ortaya konmuştur [32, 33].

Tablo 1.1: Kollajen tipleri, fonksiyonları, lokalize oldukları dokular ve olgunlaşma sürecinde görev alan enzimler.

Kollajen	Tipi	Genin Adı	Hangi Dokularda	N-terminal propeptidaz	C-terminal propeptidaz	Kaynak
I	Fibriller	COL1A1 COL1A2	Tendon, kemik, cilt, kornea ve kan damarlarının duvarında fibriller oluşturur.	ADAMTS-3 ve ADAMTS-14	BMP-1	[34, 35]
II	Fibriller	COL2A1	Bağ dokuda, kemik ve kıkırdakta fibriller oluşturur.	ADAMTS-3	BMP-1	[36]
III	Fibriller	COL3A1	Ciltte ve damarlarda tip I kollajenle birlikte heterotipik fibriller oluşturur.	ADAMTS-2	BMP-1	[37]
IV	Non-fibriller	COL4A1 COL4A2 COL4A3 COL4A4 COL4A5 COL4A6	Basal membranda ağlar oluşturur.	prokollajen N-propeptidaz	BMP-1 / Tolloid ailesi üyeleri	[38, 39]
V	Fibriller	COL5A1 COL5A2 COL5A3	Fetal membranda, ciltte ve kemikte heterotipik fibriller oluşturur.	Tolloid ailesi üyeleri	BMP-1	[40, 41]
VI	Non-fibriller	COL6A1 COL6A2 COL6A3	Damarlarda, ciltte ve omurlararası diskte ince mikrofibriller halinde geniş bir dağılım gösterir.	prokollajen N-propeptidaz	BMP-1 / Tolloid ailesi üyeleri	[42]
VII	Non-fibriller	COL7A1	Ciltte dermal ve epidermal bağlamayı sağlayan fibriller halinde bulunur.	prokollajen N-propeptidaz	BMP-1 / Tolloid ailesi üyeleri	[43]

Tablo 1.1 Devamı: Kollajen tipleri, fonksiyonları, lokalize oldukları dokular ve olgunlaşma sürecinde görev alan enzimler.

VIII	Non-fibriller	COL8A1 COL8A2	Gözün endotel hücrelerinde altıgen ağlar şeklinde bulunur.	prokollajen N-propeptidaz	BMP-1 / Tolloid ailesi üyeleri	[44-46]
IX	Non-fibriller	COL9A1 COL9A2	Hyalin kıkırdakta tip II kollajen fibrilleri ile birlikte camsı bir ağ oluşturur.	prokollajen N-propeptidaz	BMP-1 / Tolloid ailesi üyeleri	[47, 48]
X	Non-fibriller	COL10A1	Büyüyen, bölünen hücrelerin olduğu bölgede hasır benzeri altıgen ağ oluşturur.	prokollajen N-propeptidaz	BMP-1 / Tolloid ailesi üyeleri	[49]
XI	Fibriller	COL11A1 COL11A2	Hyalin kıkırdakta tip II kollajenle birlikte heterotipik fibriller oluşturur.	prokollajen N-propeptidaz	BMP-1	[50]
XII	Non-fibriller	COL12A1	Embriyonik tendonlarda, diş etlerinde ve ciltte tip I fibrillerle birlikte bulunur.	prokollajen N-propeptidaz	BMP-1 / Tolloid ailesi üyeleri	[51-53]
XIII	Non-fibriller	COL13A1	Endotel hücrelerinde transmembran ve hücre adezyonunda yer alır.	prokollajen N-propeptidaz	BMP-1 / Tolloid ailesi üyeleri	[54]
XIV	Non-fibriller	COL14A1	Fetal deride ve tendonlarda tip I fibrillerle birlikte bulunur.	prokollajen N-propeptidaz	BMP-1 / Tolloid ailesi üyeleri	[55, 56]
XV	Non-fibriller	COL15A1	Özelleşmiş basal membranlarda antianjiogenik parçalar oluşturmak için gelişmiştir.	prokollajen N-propeptidaz	BMP-1 / Tolloid ailesi üyeleri	[57, 58]
XVI	Non-fibriller	COL16A1	Ciltte mikrofibrillerin yapısında, kıkırdakta ise tip II kollajenin yapısında bulunur.	prokollajen N-propeptidaz	BMP-1 / Tolloid ailesi üyeleri	[59]
XVII	Non-fibriller	COL17A1	Hücreler arası iletişimi sağlayan ve ciltte epidermisin basal membrane tutunmasını sağlayan yapının bir elemanıdır.	prokollajen N-propeptidaz	BMP-1 / Tolloid ailesi üyeleri	[60]
XVIII	Non-fibriller	COL18A1	Antianjiogenik parçaların oluşumunu sağlar.	prokollajen N-propeptidaz	BMP-1 / Tolloid ailesi üyeleri	[61]
XIX	Non-fibriller	COL19A1	In vitro olarak tek uçta radyal olarak düzenlenmiş agregatlar oluşturur.	prokollajen N-propeptidaz	BMP-1 / Tolloid ailesi üyeleri	[62]
XX	Non-fibriller	COL20A1	Korneal epitelyumda, ciltte, kıkırdakta ve tendonlarda tip I kollajen fibrilleri ile birlikte bulunabilir.	prokollajen N-propeptidaz	BMP-1 / Tolloid ailesi üyeleri	[63]
XXI	Non-fibriller	COL21A1	Birçok dokuda fibriller olarak düzenlenmiş olabilirler.	prokollajen N-propeptidaz	BMP-1 / Tolloid ailesi üyeleri	[64]
XXII	Non-fibriller	COL22A1	Spesifik dokular arasındaki bağlantılarda mikrofibrillerle birlikte bulunabilir.	prokollajen N-propeptidaz	BMP-1 / Tolloid ailesi üyeleri	[65]
XXIII	Non-fibriller	COL23A1	Metastatik tümör hücrelerinde.	prokollajen N-propeptidaz	BMP-1 / Tolloid ailesi üyeleri	[66]
XXIV	Fibriller	COL24A1	Tip I kollajen içeren dokularda, kemik ve kornea oluşumunda.	-	-	[32]
XXV	Non-fibriller	COL25A1	Sinir dokularında	prokollajen N-propeptidaz	BMP-1 / Tolloid ailesi üyeleri	[67]
XXVI	Non-fibriller	COL26A1	Testis ve ovaryumda	prokollajen N-propeptidaz	BMP-1 / Tolloid ailesi üyeleri	[68, 69]
XXVII	Fibriller	COL27A1	Kıkırdak, göz, kulak ve akciğerde	-	-	[8, 70]

1.3 ADAMTS Gen Ailesi

Ekstraselüler matriksin (ECM) proteolitik sürecinde proteaz aktivitesine sahip çok sayıda molekül görev alır. Bu moleküller domain yapılarına göre çeşitli protein ailelerine gruplanabilirler. İlk grup; trombin, doku plazminojen aktivatörü, urokinaz ve plazmin gibi serin proteazları içerir. İkinci grup; çinko bağımlı endopeptidazların oluşturduğu, yaklaşık 23 üyeye sahip oldukça büyük bir grup olan matriks metalloproteazlardan oluşur. Bu ilk iki gruba ait proteazlar geniş bir yelpazeyi oluşturur. ECM parçalanmasında ve kanser metaztasında oldukça önemli görev üstlenirler. Üçüncü grup proteinler metalloproteazların kemik morfogenetik protein 1: tolloid ailesidir. Hücre farklılaşması ve TGF- β süper ailesine ait inaktif büyüme faktörlerinin aktivasyonunda dolaylı olarak rol alırlar ve son grup olan ADAM (bir disintegrin ve metalloproteaz) protein ailesi; hücre-hücre adezyonu ve proteolizizde çeşitli rolleri bulunan transmembran glikoproteinlerini içeren protein ailesidir.

Geçtiğimiz 10-15 yıllık süre içerisinde ADAM protein ailesi ile bağlantılı, ADAMTS olarak adlandırılan yeni bir protein ailesi aydınlatılmıştır. Bu proteinler ADAM benzeri domain yapısı gösterirler. ADAM'lardan farkları disintegrin benzeri bölge ile sistince zengin bölge arasında yer alan trombospondin tekrarları içeren kısımdır. Bu trombospondin tekrarları C terminal uçta da çeşitli sayılarda bulunmaktadır. ADAM'lardan en önemli farkları ise ADAMTS'lerin transmembran domaini içermeyip, ECM'e salgılanan proteinler olmalarıdır [71].

ADAMTS'lerin ilk üyesi olan *ADAMTS-1* Kuno ve arkadaşları tarafından 1997 yılında keşfedilmiştir [72]. Şuana kadar ise insana ait 19 ADAMTS geni aydınlatılmıştır. Bu üyeler memelilerde temel olarak %20 ile %40 oranında benzer domain yapısına sahiptir. İnaktif formda endoplazmik retikulumdan sentezleri yapıldıktan sonra sekrete edilir ve pro-domain yapılarının uzaklaştırılmasıyla aktif forma dönüşürler. Bu özelleşmiş proteinler içerdikleri farklı domain yapıları ile çok fonksiyonlu özellik kazanmaktadırlar. Diğer üyelere göre daha benzer domain yapılarına ve benzer görevlere sahip üyeler 4 alt gruba ayrılmıştır. Bunlar; (i) matriks proteoglikanı parçalanmasında hyalektanaz aktivitesine sahip olanlar: *ADAMTS-1, 4, 5, 8, 9, 15* ve *20*, (ii) anjiogenez inhibisyonunda görev alanlar: *ADAMT-1, 4* ve *8*, (iii) kan pıhtılaşması homeostasta von Willebrand faktörünü parçalayan proteazlar: *ADAMTS-13* ve son olarak (iv) prokollajenin N-ucundaki propeptitleri uzaklaştırarak

kollajene dönüşmesinde rol oynayan kollejen N-proteinazlar: *ADAMTS-2, 3 ve 14* [73].

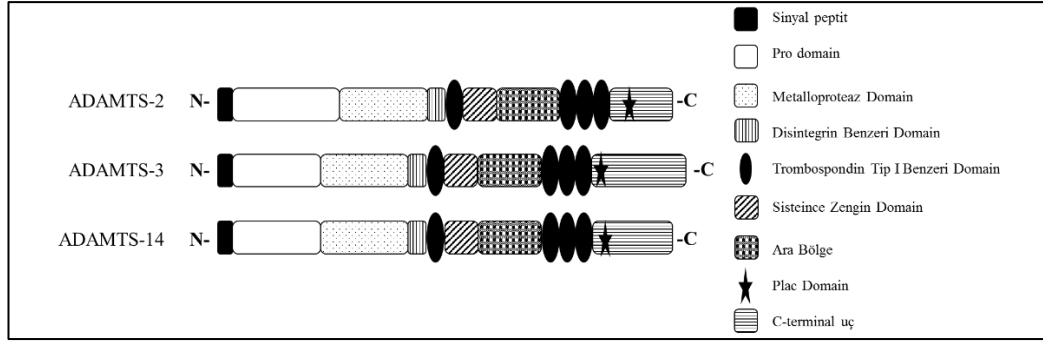
1.3.1 Prokollajen N-proteinazlar: *ADAMTS-2, -3 ve 14*

Prokollajen N-proteinazlar, ADAMTS grubu protein ailesine bağlı peptidazlardır. *ADAMTS-2, -3 ve -14* proteinlerinin oluşturduğu bir alt grup olup, prokollajenin kollajene dönüşümü esnasında N-terminal propeptidlerin uzaklaştırılmasında görev alırlar.

1.3.1.1 Prokollajen N-proteinazların Domain yapısı

ADAMTS-2, -3 ve -14'e ait amino asit dizi eşleştirmeleri ve domain yapıları, bu üç prokollajen N-propeptidazın gerçekten de ADAMTS gen ailesine üye olduğunu kanıtlamıştır. Spesifik enzim aktivitelerinin yanısıra, domain yapılarında sahip oldukları 4 adet trombospondin tip 1 bölgesi ve C-terminal prokollajen N-propeptidaz bölgelerindeki PLAC domaini ile de karakterize edilirler. PLAC domaini, embriyonik gelişimde epitel hücrelerin şekillenmesinde görev yapan ve ilk olarak böcekte "lacunin" denilen bir proteinde tespit edilmiş bir motiftir. PLAC domaininin bulunduğu konum da oldukça özgündür. ADAMTS üyelerinde genel olarak proteinlerin C-terminal uçlarından sonra konumlanmışken, *ADAMTS-2, -3 ve -14*'te C-terminal uzantısı içerisinde yer alır. *ADAMTS-2 ve -3*'ün PLAC domaini 6 adet sistein içerirken, *ADAMTS-14* PLAC domaininde 10 adet sistein rezidüsü içermektedir [10].

ADAMTS-2, -3 ve -14 polipeptit zincir uzunluğu, primer yapıları ve domain organizasyoları açısından oldukça yüksek homoloji gösterirler. *ADAMTS-14*, %63 oranında *ADAMTS-3* ile benzerlik gösterirken, *ADAMTS-2* ile %56 oranında benzerlik gösterir. En büyük benzerlik katalitik bölgelerinde ve en az benzerlik ise tahmin edileceği gibi pro-domain ve karboksili ucunda belirlenmiştir [26, 74, 75].



Şekil 1.3: Prokollajen N-proteinazlara ait domain yapısı. Fernandes vd.'den uyarlanmıştır [26].

Şekil 1.3'te gösterildiği gibi, N-terminal uçtan C-terminal uca doğru *ADAMTS*-2, -3 ve -14 proteazın domain yapıları şu şekildedir: sinyal peptit, pro-domain, katalitik domain, metalloproteaz domain, disintegrin-benzeri domain, trombospondin tip I (TS) tekrarları, sisteince zengin domain, ara bölge, TS tekrarları, PLAC domiani ve C-terminal ucu [26].

Prokollajen N-proteinazlara ait domainlerin fonksiyonları aşağıda sıralanmıştır;

- i) Sinyal peptit dizisi: 220 ile 300 aminoasitlik farklı uzunluklarda olabilir,
- ii) Pro-domein: proteinlerin inaktif halde tutulmasında rol oynadığı düşünülen bölgedir. Öncül enzimi korur. Aynı zamanda proteinin doğru katlanmaları yapmasını sağlayan bölgedir,
- iii) Metalloproteinaz katalitik domain: *ADAMTS* proteazların katalitik domainleri yüksek derecede benzerlik gösterir. Reprolizin tip çinko bağlanma motifi içerir (HEXXHXXG/N/SXXHD; X herhangi bir amino asit rezidüsünü temsil etmektedir. Kalın olarak yazılmış ve son derece iyi korunmuş olan aspartik asit rezidüsü *ADAM* ve *ADAMTS*'leri diğer metalloproteinazlardan ayırır.),
- iv) Disintegrin benzeri domain: Yılan zehri disintegrinleri ile dizilim benzerliği gösteren bir disintegrin benzeri domain. Yılan zehri disintegrinleri polipeptit ailesinin bazı üyeleri integrinlerin tanınmasını ve integrinlere bağlanmayı sağlayan arjinin/glisin/aspartik asit (RGD) dizilimine sahiptir. Ancak, *ADAMTS* ailesi üyelerinin hiç birisi disintegrin domeininde RGD dizilimine sahip değildir,

- v) Merkezi bir TS (trombospondin tip 1) motifi: Enzimin aktivitesi için oldukça önemli, substratın tanınması ve bağlanmanın gerçekleşmesinde görev alır,
- vi) Sisteince zengin bölge: Tüm ADAMTS ailesi üyelerinde son derece yüksek dizilim homolojisi gösterecek biçimde bulunur. *ADAMTS-2* ve *-3*'te 6 adet, *ADAMTS-14*'te 10 adet sistein rezidüsü içermektedir,
- vii) Ara bölge (spacer bölge): Uzunluğu değişkendir. Amino ve karboksi uçta birkaç hidrofobik rezidü içerir. Bu bölgenin ekstrasellüler matrikse bağlanmada görev aldığı gösterilmiştir. Enzimin yapısal karakterini etkilemez,
- viii) PLAC (Protease and Lacunin; Proteaz ve Lasunin) domaini; PLAC domaini ilk olarak böceklerde, hücrelerarası matriks proteini olan lasuninin karboksi ucunda bulunmuştur. Embriyonik gelişimde epitel hücrelerin şekillenmesinde görev yapar [76-82].

1.3.1.2 *ADAMTS-2* Geni

ADAMTS-2 ciltte oldukça yüksek oranda ekspre olmaktadır. Colige ve arkadaşları insan *ADAMTS-2* genini klonlayarak birçok EDS tip VIIC hastasında bu gende meydana gelen mutasyonla Ehlers-Danlos sendromu EDS hastalığının bağlantısı aydınlatmıştır [76, 83]. Ehlers-Danlos sendromu (EDS tip VIIC) olarak da bilinen bu hastalık derinin dayanıklılığının azalması, kolay yırtılması, eklemlerde aşırı oynaklık ve bozulmuş deri bütünlüğünün iyileşmesindeki gecikme ile karakterize kalıtsal bir hastalıktır. Bu kalıtsal hastalık aminopeptidaz aktivitesindeki yetersizlik nedeniyle N-terminal kısmın uzaklaştırılamaması şeklinde meydana gelir. Olgunlaşma işlemi tamamlanmamış prokollagen moleküllerinin ekstrasellüler matrikste birikmeleri, kollagen ipliklerinin bir araya gelmesinde bozukluklara yol açar [84]. Temel olarak kollajen izoformlarını kodlayan ya da kollajen olgunlaşma sürecinde görevli genlerde meydana gelen mutasyonlar sonucu ortaya çıkmaktadır. *ADAMTS-2*'de meydana gelen mutasyonlar insanlarda ve diğer tüm memelilerde dermatoparaksise neden olmaktadır [26].

Katalitik domainlerindeki benzerlik katalitik mekanizmalarında benzerliğe neden olsa da yardımcı domainlerindeki farklılıklar substrat tercihlerini, moleküller arası etkileşimlerini veya ECM'deki düzenlenmelerini etkileyebilir. Örneğin; *ADAMTS-2*'nin prokollajen I, II ve III'ün olgunlaşma sürecinde görevli olduğu düşünülmektedir fakat alternatif kesimle meydana gelmiş ve yardımcı domain içermeyen bir *ADAMTS-2* varyantı, prokollajen I'in işlenmesinde aktivite göstermez [10, 24, 26, 85, 86].

2002'de yapılan bir çalışmada Colige ve arkadaşları, *ADAMTS-14*'ün prokollajen I'in olgunlaşma sürecini gerçekleştirdiği [25] ve Wang ve arkadaşları ise 2003'te yapılan çalışmada *ADAMTS-2*'nin ise prokollajen III olgunlaşma sürecini gerçekleştirdiği ortaya koymuştur [86].

Fare embriyonik gelişimi aşamasında yapılan çalışmada *ADAMTS-2,-3* ve *-14*'ün ve prokollajen I, II ve III'ün mRNA seviyeleri incelendiğinde *ADAMTS-3*'ün prokollajen I'in olgunlaşma sürecinde görev aldığını, prokollajen I'ce zengin dokularda ve kıkırdakta *ADAMTS-2*'nin değil *ADAMTS-3*'ün temel prokollajen I ve II aminopeptidaz olabileceği sonucu ortaya çıkmıştır. *ADAMTS-2*'nin ise farelerde prokollajen III olgunlaşmasında rol oynadığı gözlenmiş ve muhtemelen insanda dermatoparaksis için de önemli olduğu sonucuna varılmıştır [25, 26, 87, 88].

2014 yılında kemik kanseri hücrelerinde yapılan çalışmada, IL-6'nın *ADAMTS2* genini transkripsiyonel düzeyde regüle ettiği belirlenmiştir. Buna göre IL-6'nın *ADAMTS-2* promotor aktivitesini indüklediği yine mRNA ve protein ekspresyon seviyelerininin de IL-6 varlığında arttırdığı tespit edilmiştir [89].

Yine osteosarkoma hücrelerinde 2015 yılında yapılan bir başka yolak çalışmasında ise *ADAMTS-2* ifadesinin IL-1 α sitokini ile arttığı ortaya konmuştur [90].

1.3.1.3 *ADAMTS-14* Geni

ADAMTS-3 birçok organda düşük seviyelerde ekspre olmaktadır. Bununla beraber, *ADAMTS-2*'nin susturulduğu farelere ait dokulardaki tip I kollajen oranı ile bağıl *ADAMTS-3* ekspresyon değerleri arasında bir bağlantı görülmemiştir. Bu

sonuçlar *ADAMTS-2* ve *ADAMTS-3*'ten başka bir enzimin aminoproteolitik peptidaz aktivitesi gösterdiğini ortaya koymuştur. Veri tabanları incelendiğinde *ADAMTS-2* cDNA'sı ile 10. kromozomun kısa kolundaki dizi arasında homoloji tespit edilmiştir ve 10.kromozomda bulunan bu dizinin yeni bir ADAMTS geninin ekzonlarını temsil ettiği ne sürülmüştür. mRNA seviyesinde ekspre olabilen bir gen olduğu ortaya konduktan sonra *ADAMTS-14*'e ait cDNA dizisi klonlanmıştır. *ADAMTS-14* aminoproteolitik peptidaz aktivitesini destekler şekilde kollajen açısından zengin dokularda ekspresyon göstermiştir. Bunun yanında beyin, karaciğer ve dalak gibi daha birçok dokuda oldukça yüksek ekspresyona sahip olduğu belirlenmiştir, muhtemelen *ADAMTS-14*'n kollajen olgunlaşma sürecinden farklı fonksiyonları olduğu tahmin edilmektedir. Benzer sonuçlar *ADAMTS-2* için de tespit edilmiştir [91].

Alternatif amino proteolitik peptidaz aktivitesi için sorumlu enzimin aydınlatılması amacı ile yapılan çalışmada, insan ve fare *ADAMTS-14* geninin cDNA'sı klonlanmış ve *ADAMTS-14*'n yapısı *ADAMTS-2* ve *ADAMTS-3* ile karşılaştırılmıştır. *ADAMTS-3*'n birçok organda çok düşük seviyelerde ekspre olduğu gözlenmiştir. Aynı aileye ait *ADAMTS-14* ile *ADAMTS-2*'nin tip I kollajeni işlediği farede ve onunla ilişkili *ADAMTS-3*'teki seviyesi arasında hiç bir benzer değere rastlanmamıştır. Bu sonuçlar, *ADAMTS-2* ve *-3*'ten farklı bir enzimin aminoproteolitik peptidaz aktivitesi gösterebileceğini önermiştir [25].

Dermatoparaktik ciltte ve tendonlardaki *ADAMTS-14* seviyelerinin tamamıyla olgunlaşmış tip I kollajen seviyelerinden farklı olması dokuya özgün olarak düzenlenmiş *ADAMTS-14* aktivasyonu olabileceği ile açıklanabilir. Bu hipoteze göre, *ADAMTS-14*'n fibroblastlarda gösterdiği aminoproteolitik peptidaz aktivitesi muhtemelen en düşük aktivite olarak tespit edilmişken, en yüksek enzim aktivitesini tendonlarda göstermiştir. Tendonların yapısını tip I kollajen oluşturduğundan, tip I kollajenin olgunlaşmasından *ADAMTS-14*'n sorumlu olduğu sonucu çıkarılmıştır. [25, 92]. Ayrıca *ADAMTS-3* ve *-14*'n ekspresyon seviyeleri insanda yaşla beraber değişmektedir, bu durum ciltte dermatoparaktik belirtilerin yaş ilerledikçe neden etkilendiğini de açıklamaktadır.

1.3.1.4 ADAMTS-3 Geni

ADAMTS-3 genine ait cDNA, ilk kez insan beyin hücrelerinde klonlanmış ve “KIAA0366 gen” olarak adlandırılmıştır. KIAA0366 geninin cDNA’sı 5’ ucunda tamamlanmamış ve translasyon başlangıç kodonu henüz aydınlatılmamıştır. 4. kromozomun uzun kolunda lokalize olan *ADAMTS-3* geninin, 22 ekzonlu büyük bir gen olduğu ve 5,8 kb’lik transkript uzunluğuna ve 288 kb’lik gen uzunluğuna sahip olduğu, 7 ortak *ADAMTS-3* varyantı bulunduğu tespit edilmiştir. *ADAMTS-3*’ün kıkırdakta, benzer domain yapısına sahip grup üyesi *ADAMTS-2*’ye göre daha fazla ekspre olduğu aydınlatılmış ve *ADAMTS-3*’ün önemli bir prokollajen II N-propeptidaz olduğu vurgulanmıştır [93].

ADAMTS-3’ün ekspresyon seviyelerine kalp, beyin, plasenta, akciğer, karaciğer, iskelet kası, böbrek ve pankreasta bakıldığında, *ADAMTS-3*’ün en yüksek ekspresyonu plasentada görülmüştür. En düşük ise, akciğer, beyin ve kalpte gözlenmiştir. Yapılan northern blot RNA analizlerine göre ise, *ADAMTS-3*’ün ciltte, cilt fibroblasta göre daha fazla ekspre olduğu belirlenmiştir [26].

Bevitt ve arkadaşlarının 2003 yılında yaptıkları çalışmada, oküler hücre tiplerinde (ARPE-19) *ADAMTS-3* geninin ekspresyonu çalışılmıştır. TNF α ile uyarılmış ve uyarılmamış ARPE-19 hücrelerinden elde edilen sonuçlara göre; *ADAMTS-3* ekspresyonu RT-PCR ile belirlenmiş olsa da, northern blot analizleri sonucunda hücrelerde *ADAMTS-3* ekspresyonu belirlenmemiştir [93].

2004 yılında yayınlanan bir diğer çalışmada, non-neoplastik meme dokusu, invaziv meme karsinom ve meme kanseri hücreleri ile yapılan çalışmada, *ADAMTS-3*’ün meme kanseri hücrelerinde sağlıklı hücrelerle kıyaslandığında ifadesinin baskılandığı gözlenmiştir. Miyoepitel hücrelerde *ADAMTS-3* ekspresyon seviyelerinin daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Ayrıca luminal epitel hücrelerdeki bütün *ADAMTS* genlerinin ekspresyon seviyelerinin ise oldukça zayıf olduğu gözlenmiştir. *ADAMTS-3*, -14 ile *ADAMTS-4*, -5 grupları kıyaslandığında, meme dokusundaki benzer ekspresyon seviyeleri ve dağılımı göstermelerinden yola çıkarak benzer fonksiyon ve substratlara sahip oldukları ve bu iki grubun aynı genel yönelim içinde oldukları sonucuna varılmıştır [94].

2006 yılında fare embriyolarında yapılan çalışmada, dermatoparaktik fibroblast hücrelerinde prokollajen I işlenmesi indükleyen *ADAMTS-3*'ün, iskelet kası oluşumundaki prokollajen I işlenmesinde de rolü olduğu öne sürülmüştür. *ADAMTS-3*'ün prokollajen I'ı işlediği ve prokollajen I'ce zengin dokular ve kıkırdakta *ADAMTS-2*'nin değil *ADAMTS-3*'ün asıl önemli prokollajen I ve II aminopeptidazı olabileceği bulunmuştur. Dermatosparaksis sığır fibroblastlarında gerçekleştirilen çalışmada embriyonik RNA analizleri sonucu en yüksek *ADAMTS-2* ve *ADAMTS-3* ekspresyonu 7 dpc'lik (days post coitum: döllenme sonrası) embriyolarda görülmüştür. In situ hibridizasyonlara göre embriyonun kendisinde ekspresyon görülmemiştir. Bununla birlikte anneye ait olan dokularda, rahim dokusu ve uterusun kas tabakasında birbiri ile örtüşür seviyede, kuvvetli tip I kollajen ve *ADAMTS-3* ekspresyonu gözlenmiştir [87].

2012 yılında yapılan bir çalışmada elde edilen sonuçlara göre, *ADAMTS-3*'ün akut miyokardiyal enfarktüs hücrelerinde stabil anjina hücrelerine göre daha fazla ekspre olduğu gözlenmiştir. Ayrıca endotel hücrelerinde ve makrofajlarda *ADAMTS-3*'ün daha fazla immunopozitif olduğu sonucu elde edilmiştir [95].

Asakawa ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, *ADAMTS-3*'ün dinamik olarak omurilikte ekspre olduğunu ve bu genin merkezi sinir sisteminde, sinir uçlarında meydana gelen dallanmalardaki kollajen işlenmesini kontrol ettiği tespit etmişlerdir [96].

ADAMTS-3, embriyonik lenfogenez ve plasenta damarlaşması için gerekli bir proteindir ve plasenta defektleri ve lenf ödemi gibi genetik hastalıkların oluşumuyla ilgili olarak aday bir gen olarak gösterilmiştir. İnsanda *ADAMTS-3*'ün yokluğu düşüğe neden oluyorken, genetik lenf ödemi sadece hipomorfik mutasyonlarda görülmüştür. Ayrıca *ADAMTS-3*'ün yetişkinlerde lenfotik dengenin sağlanması ve lenf gelişimindeki anormalliklerde rol aldığı kanser ve metastaz gibi çeşitli patolojik durumlarda ortaya çıkmıştır [97].

ADAMTS-3'ün beyindeki ekspresyonu ve VEGF-C/VEGF-R3 yolaklarının sinir kök hücrelerinin aktivasyonuna olan etkisi bir arada, *ADAMTS-3*'ün sinir gelişiminde potansiyel bir rolü olduğunu ortaya koymuştur [97].

RCS-LTC (sıçan kondrosarkoma) hücrelerinde *ADAMTS-3* transfeksiyonu sonucunda birçok pN-kollajen II'nin olgunlaşma sürecini tamamladığı bulunmuştur.

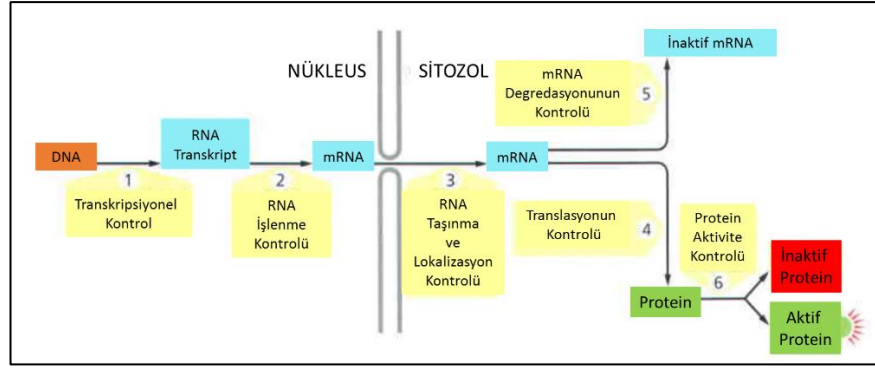
Ayrıca *ADAMTS-2* ve *ADAMTS-3* endojen mRNA seviyelerinin sağlıklı insan cilt hücrelerinde ve cilt fibroblastlarında kıkırdaktakine göre farklılık gösterdiği; *ADAMTS-3*'ün *ADAMTS-2*'ye göre kıkırdakta daha fazla ekspre olduğu, bu sonuçlarla *ADAMTS-2*'nin değil *ADAMTS-3*'ün temel prokollajen II N-propeptidaz olduğu ispatlanmıştır [26].

Alper ve Kockar tarafından 2014 yılında Saos-2 ve MG63 hücrelerinde yapılan çalışmada, *ADAMTS3* geninin IL-6 sitokin yolağı üzerinden düzenlendiği, mRNA ve protein ekspresyon seviyelerinde IL-6 varlığında arttırdığı tespit edilmiştir [89].

IL-1 α sitokini ile, 2015 yılında yapılan bir başka yolak çalışmasında ise *ADAMTS-3* ifadesinin IL-1 α sitokini ile arttığı Saos-2 ve MG63 hücrelerinde ortaya konmuştur [90].

1.4 Transkripsiyonel Regülasyon

Ökaryotik organizmalarda gen ekspresyonunun farklı şekillerde düzenlenmesi, hücrel farklılaşmanın ve her türlü hücrel işlevin odak noktasını oluşturmaktadır. Bu düzenlenmenin hücreler ve organlar bazında değişiklik göstermesi gen ekspresyonunun kontrolü ile mümkün olmaktadır. DNA'dan protein oluşumuna kadar geçen yolda birçok kritik basamak bulunmaktadır. Bu basamakların her biri ayrı ayrı düzenlenmektedir. Bir hücre bir proteini üretirken (i) ne zaman ve ne sıklıkla genin transkribe olacağını (transkripsiyonel kontrol), (ii) RNA transkriptlerinin seçmeli eşleştirme basamağını ve prosesini, (iii) hangi mRNA'nın sitozole iletileceği ve sitozolde nereye lokalize olacağına, (iv) hangi mRNA'ların ribozomda translasyona uğrayacağına, (v) hangi mRNA molekülünün degrade olacağına, ve (vi) hangi protein molekülünün aktive ya da inaktive edileceğini kontrol eder (Şekil 1.4). Bir hücreye ait genom, kendi DNA dizisinde binlerce farklı protein ve RNA molekülünü sentezleyebilecek tüm bilgiye sahiptir ve tipik olarak bir hücre sahip olduğu genlerin sadece bir kısmını ekspre eder. Çünkü çok hücreli organizmalarda her hücrenin farklı görevleri bulunmaktadır. Hücreler buldukları koşullar değiştiğinde ekspre ettikleri genleri de değiştirebilirler. Bunu sağlayan transkripsiyonel kontroldür ve işte bu nedenle tüm hücreler için en önemli kontrol noktası transkripsiyonel kontrol noktasıdır.



Şekil 1.4: Ökaryotik gen ekspresyonunun 6 adet kontrol noktası.

Bir genin ekspresyonunu düzenleyen, transkripsiyon başlangıç bölgesini ve düzenleyici bölgeleri içeren bu DNA bölgesi oldukça geniş bir bölgedir. Ökaryotlarda genin üst kısmında bulunan bu DNA dizilerine promotor denilmektedir. Ökaryotik promotor bölgeler transkripsiyonun başlaması için gerekli olan RNA polimerazın bağlandığı bölgelerdir. Genin yukarısında yaklaşık 100-110 bp'lik bir bölgede yer alır. Bunlar TATA kutusu, CAAT kutusu ve GC kutusu olarak bilinen bölgelerdir. TATA, CAAT ve GC kutusuna ilaveten ökaryot genlerin bazıları enhansır ve silensır dizilerini de içerirler. Ancak genin önünde, arkasında, içerisinde, uzağında, yakınında olabilirler. Yani işlevi değişmeden ters yönde de yerleşim gösterebilir. “Enhansır”lar promotor aktivitesini arttırıcı dizilerdir. “Silensır”lar ise “enhansır”a benzer tarzda işlev görürler fakat transkripsiyonu baskılayıcı dizilerdir. Ökaryotlarda yukarı promotor elemanlarının yerleşimi farklı genlerde farklılık gösterir.

Ökaryotlarda gen düzenleyici proteinler genin promotor bölgesine bağlanarak transkripsiyonu kontrol ederler. Gen ifadesinin başlangıç aşaması, genin düzenleyici dizisi olan promotor bölgesine özgün proteinlerin ve ardından RNA polimeraz II enziminin bağlanması ve transkripsiyonun başlaması şeklinde gerçekleşmektedir. Organizmaya ait genlerin baskılanmasını veya ifade olmasını sağlayan bu düzenleyici proteinlere transkripsiyon faktörleri denilmektedir. Binlerce farklı transkripsiyon faktörü bulunmaktadır. Kabaca insan genomundaki 25.000 genin %8'i düzenleyici proteinleri kodlamaktadır. Bu proteinler DNA dizisi üzerinde bulunan özgün DNA bağlanma motiflerini tanıyarak bağlanmaktadır [98].

1.4.1 SP1 Transkripsiyon Faktörü

SP1 (Specificity protein 1) ilk klonlanan ve işlevi aydınlatılan transkripsiyon faktörüdür. Birçok memeli ve viral geninin düzenlenmesini sağlayan özgün DNA bağlanma bölgesini tanıyan bir proteindir [99-103]. SP1 proteini GC/GT kutusunu tanır ve C-terminal domainindeki üç adet C₂H₂ tip çinko parmak yapısı ile DNA'ya bağlanır [104-106]. SP1'de bulunan her üç çinko parmak yapısı, dizideki üç bazı tanır ve GC-zengin bölgelere komplementer dizide bulunan konsensus SP1 bağlanma dizisi olan 5'-(G/T)GGGCGG(G/A)(G/A)(C/T)-3' diziyi tanır [107, 108]. Her ne kadar SP1 bağlanma afinitesi konsensus diziyeye oranla GC- zengin bölgelerde daha düşük olsa da fonksiyonel bağlanmanın genin ifadesinin düzenlenmesinde büyük etkisi vardır [109]. SP1 transkripsiyon faktörünün transkripsiyonu aktive etmesi ya da baskılaması fizyolojik ve patolojik birçok uyarana bağlıdır. GC-zengin motiflere yüksek afinite ile bağlanarak hücre büyümesi, apoptoz, hücre farklılaşması ve immün cevabı gibi birçok süreçte görev alan sayısız genin ifadesini düzenlemektedir [110]. Özellikle ekstraselüler matriks genleriyle bağlantılı birçok genin düzenlenmesine katılmaktadır [111, 112].

In vitro ve *in vivo* olarak gerçekleştirilen çeşitli çalışmalarda, SP1/SP3 transkripsiyon faktörünün, doğal bileşiklerin etkisiyle veya RNA susturulması ile baskılanması sonucu kanser hücrelerinde proliferasyonun inhibe edildiği, apoptozisin tetiklendiği ve ilaç direncinin baskılandığı gösterilmiştir [113-115].

2014 yılında gerçekleştirilen bir çalışmada östrojen varlığında, SP1'in susturulduğu durumda insan ADAMTS17 geninin ekspresyonunun baskılandığı görülmüştür [116].

Wang ve arkadaşları 2016 yılında yaptıkları çalışmada, SP1'in inflamasyon durumunda insan ADAMTS7 genine ait ekspresyonu düzenlediğini ortaya koymuşlardır [112].

2016 yılında yayınlanan bir başka çalışmada Türkoğlu ve arkadaşları, düşük ve normal oksijen koşullarında SP1'in ADAMTS1 geni üzerindeki etkilerini araştırmışlardır. Buna göre SP1'in düşük oksijen koşullarında ADAMTS1'in ekspresyonunu arttırdığı belirlenmiştir [117].

Ayrıca SP1'in kemik metabolizmasında meydana gelen tahribatlarla da bağlantılı olduğu yapılan çalışmalarda ortaya konmuştur. 2016 yılında gerçekleştirilen

SP1 polimorfizm çalışmasında, COL1A1 genine ait SP1 polimorfizmi 's' allelini taşıyan epilepsi hastası bireylerin kemiklerinde daha düşük mineral yoğunluğu olduğu tespit edilmiştir [118, 119].

SP1 ve p53 transkripsiyon faktörlerinin bir arada, kemik kanserinin düzenlenmesinde rol aldıkları düşünülmektedir [120, 121]. p53 ekspresyonunda meydana gelen artış, SP1'in ekspresyonunu düşürerek SP1'in hedef genin promotorundaki bağlanmalarını önlediği belirlenmiştir. Bu iki proteinin bir arada düzenlenerek kemik kanserinde hücre çoğalmasını baskıladıkları bilinmektedir [122].

Daha önce gerçekleştirilen çalışmalarda SP1 protein ailesi üyelerinden Sp1, Sp3 ve Sp7/Osterix'in kemikte ekspre olduğu tespit edilmiştir. Bu bilgi ışığında 2006 yılında, COL11A2'nin osteoblast hücrelerinde nasıl düzenlendiğinin anlaşılması amacıyla Saos-2 hücrelerinde ekspresyon çalışması yapılmıştır. Kıkırdak hücrelerinden ve Ewing sarkoma hücrelerinden farklı olarak Saos-2 hücrelerinde promotor bölgesinde üç fonksiyonel SP1 bağlanma bölgesinin varlığında mRNA düzeyinde COL11A2 ekspresyonu tespit edilmiştir [123].

1.4.2 C/EBP α Transkripsiyon Faktörü

C/EBP (CCAAT-enhancer bağlanma) proteinleri memelilerde bulunan bir grup transkripsiyon faktörüdür. C/EBP α , β , γ , δ , α ve ζ 'nin için bulunduğu 6 üyeden oluşmaktadır. DNA dizisinde bulunan CCAAT bağlanma motiflerine özgün olarak bağlanmaları ile karakterize edilirler. Hücrel farklılaşmanın düzenlenmesindeki önemli etkileri sebebi ile dikkati çekmektedirler. AP-1, CREB/ATP, PAR ve bitki G-box proteinlerinin de içinde bulunduğu lösün fermuar tipi transkripsiyon faktörlerinin bZIP grubunda yer alırlar. C/EBP ailesinin ilk prototipi CBP olarak adlandırılmıştır, daha sonra C/EBP ve son olarak sıçan karaciğerinin nükleusundan albumin genini düzenleyen C/EBP α izole edilmiştir. Bunun hemen ardından C/EBP α ile bağlantılı olarak C/EBP β , C/EBP γ , C/EBP δ ve C/EBP ϵ klonlanmıştır. C/EBP α 'nın ektopik ekspresyonu birçok fibroblast hücresinde adipogenezi düzenlemektedir [77, 96, 124]. C/EBP α proteini enflamasyon veya akut faz cevabında görevli bir çok genin regülasyonunda ve steril CoA desaturaz I, Glut4 gibi enerji metabolizmasında görevli genlerin regülasyonunda görev alır. C/EBP α ekspresyonunun en fazla görüldüğü

hücreler gelişimini tamamlamış, bölünmeyen hücrelerdir. En az ekspresyon ise gelişmekte ve farklılaşmakta olan hücrelerde görülmektedir [125-128].

Patolojik damarlaşmanın indükleyicisi *ADAMTS-1*'in, NFAT veya C/EBP tarafından düzenlenen özgün sinyal iletim yolları tarafından uyarıldığı yapılan çalışmada ortaya konmuştur. Bu yolların düzenlenmesi hedeflenerek dolaşım hastalıkları ile ilgili yeni gelişmeler elde edilebileceği düşünülmüştür [129].

2012 yılında yapılan bir çalışmada C/EBP β ' nın aşırı ifade edildiği durumda, MMP-3, MMP-13 ve *ADAMTS-5*'in mRNA düzeyindeki ifadesinin aşırı arttığı belirlenmiştir. C/EBP β ' nın MMP-3 ifadesini düzenlediği ve yapay kıkırdak dokusunda matriks degradasyonunu arttırdığı görülmüştür. Bu sonuçlar C/EBP β 'nın MMP-3 ve *ADAMTS-5* ekspresyonunu indüklediğini eklem sıvısında ve kıkırdak dokusunda belirlemiştir [130].

C/EBP α ' nın kemik yıkımında görevli yolda önemli bir reseptör aktivatörü olarak rol aldığı 2016 yılında gerçekleştirilen bir çalışmada gösterilmiştir [131].

1.4.3 USF Transkripsiyon Faktörü

USF, evrimsel açıdan korunmuş heliks-loop-heliks- lösin fermuar (bHLH-zip) transkripsiyon faktörleri [132-135] arasında yer alan ve DNA'ya simetrik E-kutusu motiflerinden, konsensus 5'-GGTCACGTGACC3' dizisini tanıyarak bağlanan bir transkripsiyon faktörüdür [136]. USF'nin aynı zamanda TATA içermeyen promotorlarda, başlangıç dizisine yakın bölgede bulunan primidine zengin başlatıcı elementlere bağlandığı da tespit edilmiştir [137]. Memelilerde USF1 ve USF2 olmak üzere iki adet USF geni ekspre olmaktadır. Bu genler embriyonik gelişimde oldukça önemli rol oynarken, yetişkin memelilerde birden fazla etki gösterirler [26, 138-141]. USF1 birbirinden bağımsız, birden fazla genin transkripsiyonel regülasyonunda birçok önemli role sahiptir. Diğer transkripsiyon faktörleri ile etkileşerek birçok genin transkripsiyonel aktivasyonunu sağlar [142, 143]. USF1'in bir tümör baskılayıcı protein olabileceğine dair de birçok kanıt bulunmaktadır. Bu kanıtlardan ilki; USF1, p53, APC, BRCA2, PTEN, SSeCKS gibi birçok tümör baskılayıcı genin transkripsiyonel aktivasyonunu sağlar [144, 145] ve insan telomeraz ters transkriptaz

(TERT) ekspresyonunu baskılar [146]. İkinci olarak; USF1, hücre döngüsünün kontrolünde yer alır [147]. USF1'in aşırı ifadesi tiroositlerde ve tiroid karsinom hücrelerde G2/M evresinin yavaşlamasını sağlar [148]. Üçüncü olarak; Ha-Ras/c-Myc transforme edilmiş fibroblast hücrelerinde USF1 aşırı ifadesi hücre çoğalmasını baskılar [149]. Dördüncü olarak; transforme edilen altı meme hücre hattından üçünde USF1 transaktivasyonunun aktivitesi kaybolmuştur [150]. Son olarak; USF1, bir onkoprotein olan c-Myc'in aktivitesini DNA'daki aynı bağlanma motifine bağlanmak için yarışarak engellemektedir. USF1'in susturulması sonucunda hücre çoğalması ve tümör oluşumunda meydana gelen artış da USF1'in tümör baskılayıcı bir protein olabileceğinin kesin bir kanıtıdır [151].

2013 yılında sığır granüloza hücrelerinde yapılan bir çalışmada, USF'nin aşırı ifade edildiği durumda *ADAMTS-1* promotor aktivitesini düzenleyerek basal ve forskolin bağımlı *ADAMTS-1* transkript ifadesini arttırdığı görülmüştür [152].

Rippe ve arkadaşları, tip I kollajen geninde yaptıkları çalışmada, genin 3'bölgesinin gen promotorunu düzenlediği ve bu düzenlenmeyi USF-1 ve USF-2 transkripsiyon faktörlerinin kontrol ettiği sonucuna varılmıştır [153].

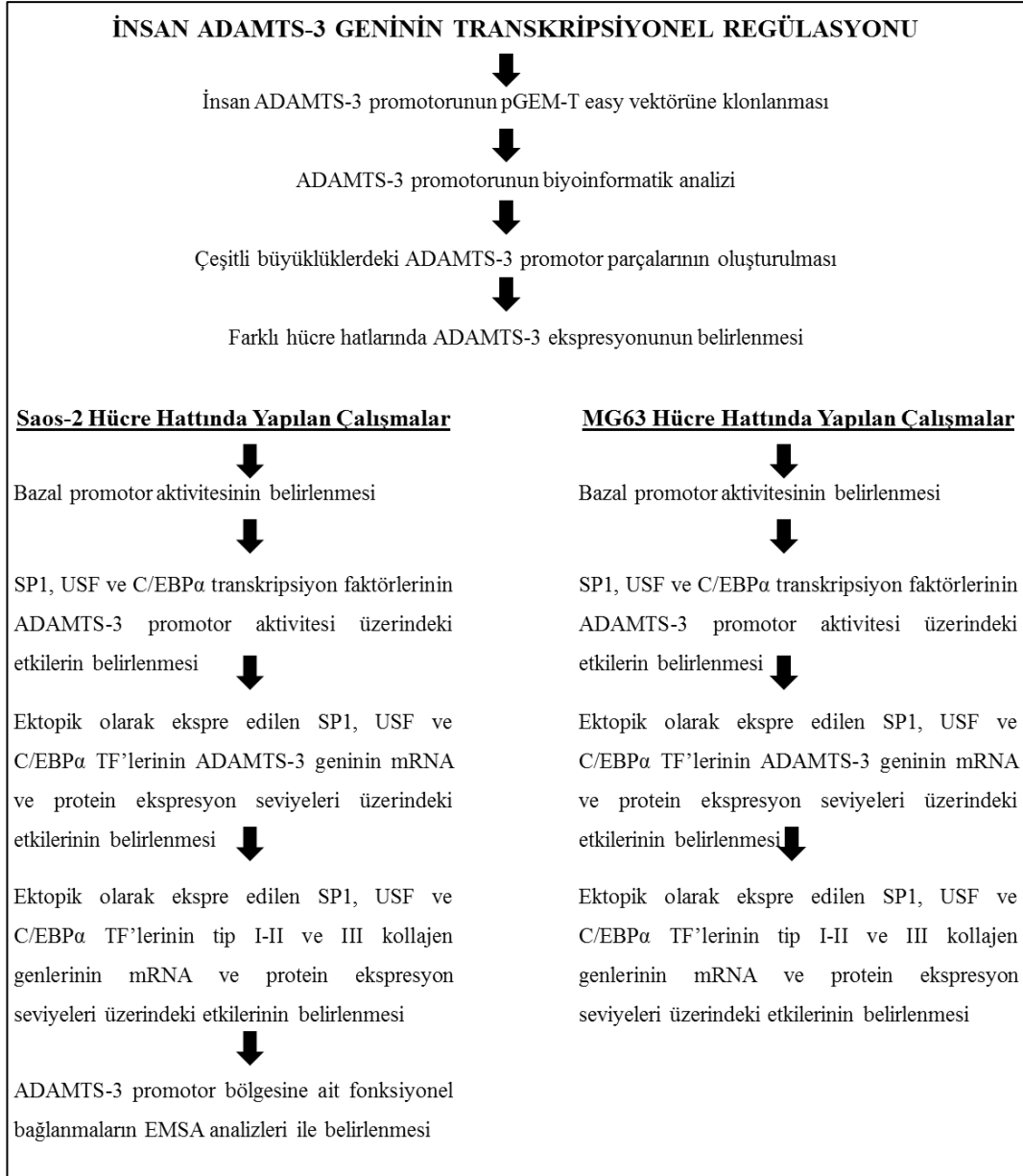
2. TEZİN AMACI

ADAMTS-3 geni temel olarak prokollajenlerin kollajene olgunlaşması sürecinde görev alan ve özellikle tip II kollajenin olgunlaşma sürecinde görev alan bir proteindir. İlk olarak beyin hücrelerinde cDNA'sı klonlanmış ve ekspresyon seviyesi en fazla plasentada gözlenen *ADAMTS-3* geni 4.kromozomun kısa kolunda yer almaktadır. Prokollajen II'nin yanında prokollojen I'in olgunlaşmasında da rol oynadığı bilinmektedir. Literatüre bakıldığında *ADAMTS-3* ekspresyonu ile ilgili birçok çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmalar sonucunda; plasentada, ciltte, omurilikte, lenfte, sinir hücrelerinde, iskelet kası hücrelerinde, kalpte, kıkırdak ve kemikte *ADAMTS-3* ekspresyonu olduğu belirlenmiştir. Diğer bazı çalışmalarda ise *ADAMTS-3*'ün sinir uçlarının dallanmasındaki ve embriyonik lenfogenezdaki önemine değinilmiştir. Sitokin yollarıyla ilgili de literatürde çalışmaların bulunduğu *ADAMTS-3* genine ait gen ekspresyonunun düzenlenmesine ait çalışma bulunmamaktadır. Dolayısıyla promotor bölgesi de henüz aydınlatılmamıştır.

Bu tez çalışmasında *ADAMTS-3* genine ait promotor bölgesinin aydınlatılması amaçlanmıştır. Bu doğrultuda ilk olarak ortaya konulan tez planı Şekil 2.1'de verilmiştir. Bu plana göre;

- (i) *ADAMTS-3* genine ait promotor bölgesi bioinformatik analizler sonucu belirlenerek pGem-T easy vektörüne PCR stratejisi ile klonlaması yapıldı. Dizi analizi ile klonlama teyit edildi.
- (ii) Fonksiyonel *ADAMTS-3* promotor bölgesine ait promotor parçaları kesim yöntemi ve PCR yöntemi kullanılarak kısaltılarak oluşturuldu ve lusiferaz haberci vektörüne klonlamaları yapıldı. Dizi analizi ile teyit edildi.
- (iii) Klonlanan promotor bölgesine ait gen bankası dizisi ve dizi analizi sonuçlarının kıyaslanmasıyla son dizi oluşturuldu. Bu dizi kullanılarak promotorun CpG adalarının analizi, TATA kutusu ve transkripsiyon başlangıç bölgesinin belirlenmesi, potansiyel transkripsiyon faktörü bağlanma analizleri gerçekleştirildi.
- (iv) Farklı kanserli hücre hatlarındaki mRNA ve protein ekspresyon analizleri gerçekleştirildi. Tez modeli olarak osteosarkoma hücre modeli olan Saos-2 ve MG63 hücre hatları seçildi.

- (v) *ADAMTS-3* promotoruna ait bazal aktivitenin belirlenmesi amacıyla osteosarkoma hücrelerine kısaltılarak elde edilmiş promotor parçalarının transfeksiyonları gerçekleştirildi.
- (vi) SP1, USF ve C/EBP α transkripsiyon faktörlerinin *ADAMTS-3* promotor aktivitesi üzerindeki etkilerin belirlenmesi amacıyla seçilmiş olan transkripsiyon faktörlerinin osteosarkoma hücrelerine transfeksiyonu gerçekleştirildi.
- (vii) Ektopik olarak ekspre edilen SP1, USF ve C/EBP α transkripsiyon faktörlerinin *ADAMTS-3* geninin mRNA ve protein ekspresyon seviyeleri üzerindeki etkilerinin belirlenmesi amacıyla osteosarkoma hücrelerinde gerçek zamanlı PCR ve western blot analizleri gerçekleştirildi.
- (viii) Ektopik olarak ekspre edilen SP1, USF ve C/EBP α transkripsiyon faktörlerinin tip I-II ve III kollajen genlerinin mRNA ve protein ekspresyon seviyeleri üzerindeki etkilerinin belirlenmesi amacıyla osteosarkoma hücrelerinde gerçek zamanlı PCR ve western blot analizleri gerçekleştirildi.
- (ix) *ADAMTS-3* promotor bölgesine ait fonksiyonel bağlanma analizleri EMSA tekniği kullanılarak Saos-2 hücrelerinde gerçekleştirildi.



Şekil 2.1: Tez çalışmasını özetleyen akış diyagramı.

3. MATERYAL VE METOT

3.1 Materyal

3.1.1 Çalışmada Kullanılan Kimyasallar

Çalışmada kullanılan kimyasallar moleküler biyoloji için uygun saflıktadır. DNA, RNA, protein, DNA-protein etkileşimi için kullanılan kimyasal ve enzimler Biochrom, Sigma, Merck, Thermo Scientific, Qiagene, Roche ve Clontech firmalarından temin edilmiştir. Çalışmalarda kullanılan malzemelerin listesi Tablo 3.1’de verilmiştir.

Tablo 3.1: Çalışmada kullanılan kimyasalların listesi

Bakteri Çalışmalarında Kullanılan Malzemeler	
Luria Broth(LB), LB agar	Sigma
Amfisilin, Kanamisin	Sigma, Merck
Büyük Ölçekli Plazmit İzolasyon Kit	Thermo Scientific
Küçük Ölçekli Plazmit İzolasyon Kit	Thermo Scientific
Gliserol, CaCl ₂	Sigma
DNA Çalışmalarında Kullanılan Malzemeler	
Restriksiyon endonükleaz enzimleri	Thermo Scientific, NEB
T4 DNA ligaz, Proteinaz K, Alkalen fosfataz	Thermo Scientific
Amonyum asetat, SDS	Sigma
pMetLuc vektör sistemi	Clontech
pGEM-T Easy vektör sistemi	Promega
<i>Taq</i> DNA polimeraz, dNTP karışımı	Thermo Scientific
Agaroz, Et-Br	Sigma
Hücre Kültürü Çalışmalarında Kullanılan Malzemeler	
Dulbecco’s Modified Eagle’s Medyum (DMEM)	Gibco

Tablo 3.1 (devamı): Çalışmada kullanılan kimyasalların listesi

Fetal Sığır Serumumu (FCS)	Gibco
Fosfat tampon tabletleri (PBS)	Sigma
Dimetilsülfoksit (DMSO)	Merck
Tripan mavi solüsyonu	Sigma
Sığır Serum Albumini (BSA)	Sigma
L-glutamin, Tripsin-EDTA	Sigma
Transkripsiyonel Aktivite Çalışmalarında Kullanılan Malzemeler	
Ready-To-Glow Secreted Luciferase Rep. Assay	Clontech
Lusiferaz ve Seap Substratları	Clontech
4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES)	Sigma
Fugene	Roche
RNA Çalışmalarında Kullanılan Malzemeler	
GeneJET™ RNA Purification Kit	Thermo Scientific
Diethylpyrocarbonate (DEPC)	Sigma
3-(N-morpholino) propansülfonik asit (MOPS)	Merck
Formaldehit, β-Merkaptoetanol	Sigma
SYBR® Green PCR Master Karışımı	Sigma
Reverse Transkriptaz	Thermo Scientific
Protein Çalışmalarında Kullanılan Malzemeler	
Tris, Borik Asit, EDTA	Sigma
Tetrametiletildiamid (TEMED)	Sigma
Amonyum persülfat	Merck
PVDF Membran	Millipore
ADAMTS-3 antikor	Abcam
Kollajen 2 Antikor (Col2A1)	Santa Cruz
β-Aktin Antikor	Sigma, Abcam
Sekonder antikor (keçi, tavşana karşı)	Santa Cruz
Sekonder antikor (keçi, fareye karşı)	Santa Cruz
Alexa Fluor 488 sekonder antikor,tavşana karşı	Invitrogen
Proteaz inhibitör tabletleri	Roche

Tablo 3.1 (devamı): Çalışmada kullanılan kimyasalların listesi

Protein büyüklük belirteci (26616)	Thermo Scientific
ECL (Electrochemiluminescence) Kit	Pierce
X-Ray Film	Kodak
DNA-Protein Etkileşimi (EMSA) Çalışmalarında Kullanılan Malzemeler	
Biotin 3' End DNA Labeling Kit	Pierce
LightShift® Chemiluminescent EMSA Kit	Pierce
Nylon Membran	Pierce

3.1.2 Çalışmada Kullanılan Cihazlar

Çalışmada kullanılan tüm cihazlar, cihazlara ait marka ve modelleri Tablo 3.2.'de listelenmiştir.

Tablo 3.2: Çalışmada kullanılan cihazların listesi.

Kullanılan Gereç	Modeli
CO ² 'li inkübatör	Nuair
Laminar Air Flow	Telstar BIOII, İspanya
İnverted Mikroskop	Nikon
-80 °C derin dondurucu	Thermo
Buz Makinası	Fiocchetti Frigoriferi Scientifici, İtalya
Buzdolabı	Arçelik, Türkiye
Çalkalamalı İnkübatör	Shel-Lab, USA
Etüv	WTB, Germany, Nüve, Türkiye
Isıtmalı Manyetik Karıştırıcı	Velp Scientifica, İspanya
Otoklav	Hirayama, Japonya
Sıcak su banyosu	Consort, İngiltere
Vorteks	Elektromag, Türkiye
Otomatik pipetler	Finnpipette
DNA elektroforezi	Minicell Primo
UVP Gel Görüntüleme	UVP
PZR	Thermo

Tablo 3.2 (devamı): Çalışmada kullanılan cihazların listesi.

Mikro santrifüj	Thermo
RNA Elektroforezi	Apelex, İngiltere
Elektronik Tartı	Sartorius, Almanya
Light Cyler 485	Roche Diagnostics
Otoklav	Hirayama, Japonya
Thermocycler PCR	Techne Progene, İngiltere
pH Metre	WTW, Almanya
Qubit Florimetre	Invitrogen
Jel görüntüleme sistemi	Bioimaging Systems
Saf su cihazı	Destilasyon 3.1 (Comecta Sa.)
Santrifüj	Hettich Zentrifugen, Germany
Soğutmalı Santrifüj	Sigma
SDS PAGE Aparatları	BioRad
Horizantal Çalkalayıcı	GFL, Almanya
Elektroforez için Güç Kaynağı	Consort, İngiltere
Isı kontrollü çalkalamalı etüv	GFL, Almanya
Isıtıcı blok	FALC, İtalya
UV visible Spektrofotometreler	Thermo
Luminometre	Thermo

3.2 Metot

3.2.1 Çalışma Ortamının ve Çalışma Ortamında Kullanılan Malzemenin Temizliği ve Sterilizasyonu

Isıya dayanıklı bütün cam malzemeler, pipet uçları, ependorflar, santrifüj tüpleri, bakteri kültür ortamları 121 °C' de 20 dakika (1.02 atm basınçta) otoklavda steril edildi. Otoklavlanan malzemeler 80 °C'ye ısıtılmış etüvde kurutulup kullanıma hazır hale getirildi.

Hücre kültürü laboratuvarı her hafta periyodik olarak çamaşır suyu, virkon ve % 70'lik alkol ile temizlendi. Oda kullanılmadığı zamanlarda UV lamba kullanılarak odanın havasının sterilizasyonu sağlandı. Çalışmaya başlamadan en az yarım saat önce laminar flow açılarak çalışma ortamının sterilizasyonu sağlandı. Çalışma boyunca odada bulunan hava sterilizasyon cihazı aktif konumda bırakılarak hücre kültürü odasının havasının da sürekli steril kalması sağlandı.

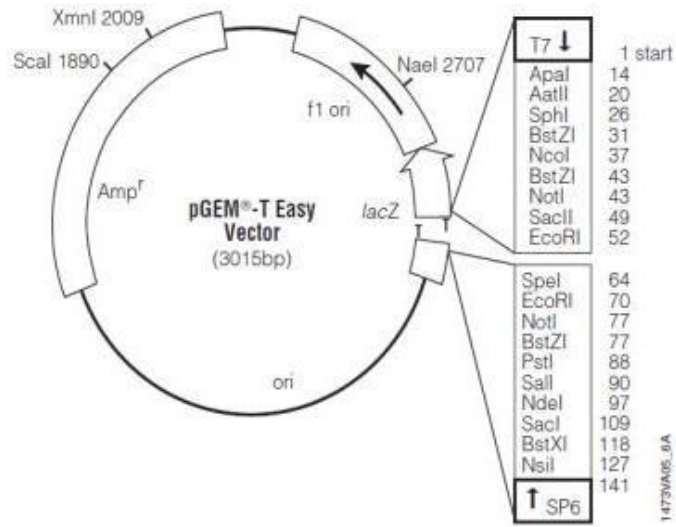
3.2.2 Bakteri Tabanlı Teknikler

3.2.2.1 Bakteriyal Hücre Soyları ve Kültür Ortamları

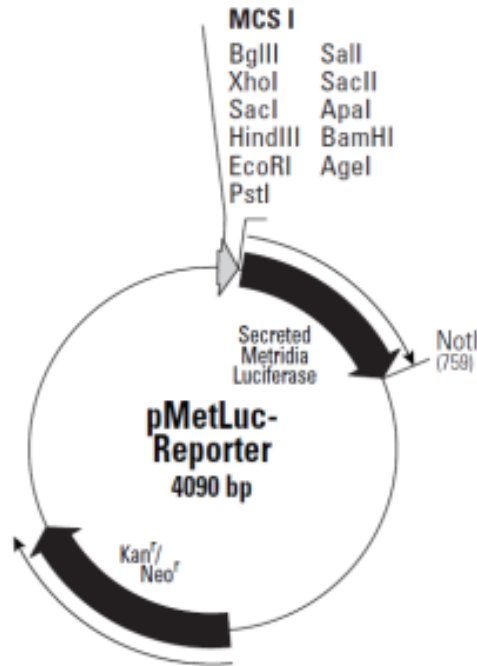
Klonlama ve stok amaçlı *E.coli DH5α* (SupE44Δ lacU169 (Φ80 LacZ ΔM15) hsdR17recA1 endA1 gyrA96 thr-1 rI A1) ve *XL-1Blue* süper kompetent (recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacIqZΔM15 Tn10 (Tetr)]) soyu kullanıldı. *E.coli* için gerekli kültür ortamı olarak LB ve LB-agar kullanılmıştır. Toz halinde temin edilen bakteriyel medyumlar üretici firmanın belirttiği şekilde hazırlanarak dH₂O ile hazırlanarak otoklavlanarak steril edildi. Kültürlerde kullanılan Ampicillin stokları 100 mg/ml olacak tarzda steril dH₂O ile hazırlandı. 0.22 mikronluk filtreler kullanılarak steril edildi.

3.2.2.2 Çalışmada Kullanılan Plazmitler

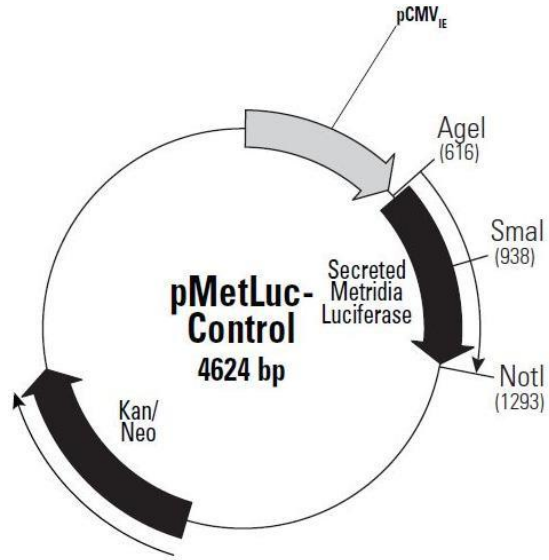
ADAMTS-3 promotorunun belli büyüklükteki parçalarının klonlaması amacıyla pGEM-T Easy (Promega) vektör sistemi kullanıldı (Şekil 3.1). Promotor parçalarının bazal aktivitelerinin belirlenmesi amacıyla bu promotor parçaları alt klonlamayla haberci gen vektörü olarak pMetLuc Reporter'a klonlandı (Şekil 3.2). Transfeksiyon etkinliğini gözlemlemek için pozitif kontrol olarak pMetLuc Kontrol vektörü kullanıldı (Şekil 3.3). Transfeksiyon çalışmalarının normalizasyonu amacıyla pSEAP2 kontrol vektörü kullanıldı (Şekil 3.4). Bu vektör tüm transfekte edilen kuyucuklara 0.5 µg olacak şekilde transfekte edildi.



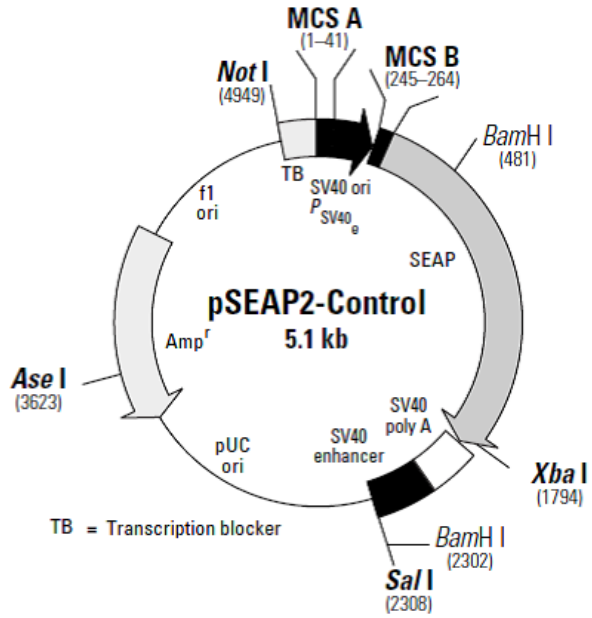
Şekil 3.1: pGEM-T Easy (Promega) vektör haritası ve klonlama bölgeleri.



Şekil 3.2: pMetLuc-Reporter (Clontech) vektör haritası ve klonlama bölgeleri.



Şekil 3.3: pMetLuc Kontrol vektörü (Clontech) haritası.



Şekil 3.4: pSEAP2-Kontrol (Clontech) vektörü haritası.

3.2.2.3 Katı ve Sıvı Besiyerinin Hazırlanması

Sıvı besiyeri olarak Luria Broth (LB) üretici firma tarafından belirtilen miktarda dH₂O'da çözüldü. 121 °C'de 20 dk otoklavlanarak steril edildi. Soğuması beklenerek kullanıldı.

Katı besiyeri olarak kullanılan LB agar firma tarafından belirtilen miktarda dH₂O'da çözüldü. 121 °C'de 20 dk otoklavlanarak steril edildikten sonra 50 °C'ye kadar soğuması beklendi. Amfisilin, son konsantrasyonu 100 µg/ml veya Kanamisin, son konsantrasyonu 30 µg/ml olacak şekilde eklenerek karıştırıldıktan sonra bek alevi yanında petri kaplarına dökülerek katılaşması beklendi. Petriler ters çevrilerek ağızları hava almayacak şekilde parafilmlemeden sonra +4 °C'de buzdolabında ışık almayacak şekilde stoklandı.

3.2.2.4 *E.coli* Hücrelerinin Kompetant Hale Getirilmesi

Kompetant hale getirilecek *E.coli* hücreleri (*DH5α* veya *XL-1Blue* hücre soyları) LB agar içeren petrilerde tek koloni düşecek şekilde ekim yapıldı ve 37 °C'de bir gece inkübe edildi. 10 ml LB sıvı besiyerine tek koloni ekim yapıldı ve 37 °C'de çalkalamalı etüvde bir gece inkübe edildi. 250 ml steril erlene 100 ml taze LB besiyeri konularak ve bu besiyerine önkültürden 5 ml inoküle edildi. 37°C'de çalkalamalı etüvde inkübasyona bırakıldı ve OD₆₀₀'de 0.5 ile 0.6 arasına ulaşınca kadar belirli zaman aralıklarında absorbans alınarak takibi yapıldı. Bakteri süspansiyonu 3000 rpm de 5 dakika 4°C'de santrifüj yapıldı. Süpernatant pipetle alınarak başlangıç hacminin yarısı kadar 0.1 M CaCl₂ solusyonundan eklenerek, nazıkçe pipetaj yapılarak pelletin çözülmesi sağlandı. 25 dakika buz üzerinde inkübe edildi. Buzda bekleme süresi tamamlandıktan sonra 3000 rpm'de 4 °C'de 5 dakika santrifüj yapıldı. Süpernatant uzaklaştırılarak başlangıç hacminin 1/10'u olacak şekilde 0.1 M CaCl₂ eklenerek pellet çözüldü. 1-4 saat arasında buz üzerinde bekletildi. Daha sonra eşit hacimde % 40'lık steril gliserol ilave edilerek karıştırıldı. Buz üzerinde bekletilen ependorflara 200 µl olacak şekilde alikot yapıldı ve etiketlenerek -80 °C dondurucuda stoklandı.

3.2.2.5 Transformasyon

-80 °C’de stoklanan kompetant hücreler çıkarılarak buza konuldu. Hücreler çözüldükten sonra 50 µl kompetant hücre ependorfa alındı. Üzerine 5 µl ligasyon reaksiyonu eklendi. Buzda 40 dk inkübasyona bırakılan hücrelere daha sonra 42 °C su banyosunda 90 saniye ısı şoku uygulandı. Hemen ardından 2 dk buzda bekletildi. Buzda bekletilen hücrelere, önceden 37 °C’ye ılıtılmış LB medyumdan 950 µl eklendi ve 1.5 saat 37 °C’de çalkalamalı inkübatörde bekletildi. Transformasyon kültürünün 50 µl’si petrilere yayıldı. Artan transformasyon kültürü 3000 rpm’de 5 dk santrifüjlenip, 100 µl LB medyumda çözümlenerek diğer bir petriye yayıldı. Daha sonra petrilere ters çevrilerek 37 °C’deki inkübatörde hücrelerin büyümesi için 16-24 saat inkübasyona bırakıldı. Oluşan kolonilerin rekombinant olup olmadığı bu kolonilerden izole edilen plazmitin restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesimi sonrasında belirlendi.

3.2.2.6 Küçük Ölçekli (Mini Prep) Plazmit DNA İzolasyonu

İzole edilecek plazmiti içeren bakteri stoklarından 10 ml’lik önkültür hazırlandı. Gliserol stokların taze kalması sebebi ile hazırlanan kültürden 4 ml ayrılarak gliserol stok yapıldı. Kalan 6 ml’lik kültür 8000 rpm’de 5 dk süresince santrifüjlendi. Üst kısımda kalan besiyeri dikkatlice alınarak atıldı. Tüpte kalan bakteri pelletinden “GeneJET Plasmid Miniprep Kit” (Thermo Scientific) protokolünde belirtilen işlem basamaklarına göre plazmit DNA izole edildi. Florimetrik ya da spektrofotometrik miktar ve saflık tayini yapılarak agaroz jel elektroforezinde görüntülendi.

3.2.2.7 Büyük Ölçekli (Maxi Prep) Plazmit DNA İzolasyonu

Büyük miktarda ve transfekte edilebilecek saflıkta plazmit DNA izolasyonu için endotoksin içermeyen GeneJET Plasmid Maxiprep Kit (Thermo Scientific) kullanıldı. Kit protokolüne göre uygun konsantrasyonda seçici antibiyotik içeren 1-5 ml LB besiyeri içerisine tek koloni ekim yapıldı. 37 °C’de 8 saat 250 rpm’de

çalkalamalı etüvde inkübe edildi. Süre sonunda başlangıç kültürü 1:1000-1:10.000 arasında seçici antibiyotik içeren 250 ml LB medyumda dilue edildi. 37 °C’de 12-16 saat 250 rpm’de inkübe edilerek bakterilerin büyümesi beklendi. OD₆₀₀’de 2 ile 3 arasına ulaşınca kadar belirli zaman aralıklarında absorbans alınarak takibi yapıldı. Bakteriler yeterli yoğunluğa ulaştıktan sonra 4 °C’de 6000 rpm’de 15 dakika santrifüj yapılarak protokolün diğer basamakları uygun şekilde gerçekleştirildi. Sonuçta yüksek saflıkta ve yoğunlukta DNA elde edildi. Florimetrik ya da spektrofotometrik miktar ve saflık tayini yapılarak agaroz jel elektroforezinde görüntülendi.

3.2.3 DNA Tabanlı Teknikler

3.2.3.1 Osteosarkoma Hücrelerinden Genomik DNA İzolasyonu

Hücre kültüründe, standart 75 cm²’lik flasklarda büyütilen osteosarkoma (Saos-2) hücreleri tripsinizasyon ile flask yüzeyinden alınarak 5 dk süresince 3500 rpm’de santrifüjlendi. Üstteki medyum dikkatlice pipetle çekilerek atıldı. Çökelti üzerine 250 µl nüklei lizis tamponu, 20 µl % 10’luk SDS ve 20 µl proteinaz K eklendi ve tüp alt-üst edilerek çalkalandı. Ependorf tüp 72 °C’deki su banyosunda 10 dakika bekletildi. Ependorf tüpe 175 µl doymuş amonyum asetat eklendi (Tablo 3.3) ve 30 saniye çalkalandı. Oda ısısında 15 dakika bekletilen örnekler 4500 rpm’de 20 dakika santrifüj edildi. Üstteki sıvı temiz bir ependorf tüpüne aktarıldıktan sonra ve üzerine 2 katı oranında mutlak etanol eklendi. Ependorf tüpü yavaşça alt-üst edildi ve DNA’nın belirmesi gözlemlendi. 13000 rpm’de 10 dakika santrifüj edildikten sonra üstteki sıvının tümü pipetle atıldı ve çökelti üzerine 250 µl % 75’lik etanol ilave edildi. 13.000 rpm’de 10 dakika santrifüj edildikten sonra üstteki sıvının tümü pipetle atıldı. DNA havada kurutuldu ve üzerine 100 µl distile su eklenerek DNA çözüldü.

Tablo 3.3: Genomik DNA izolasyonunda kullanılan solüsyonlar.

Proteinaz K (10 mg/ml)	0.01 g Proteinaz K, 1 ml dH ₂ O’da çözüldü. -20 °C’de stoklandı.
Amonyum Asetat (NH ₄ Ac)	74 g NH ₄ Ac, dH ₂ O ile 100 ml’ye tamamlandı. 40 °C’de çözülüp filtrasyon ile steril edildi. +4 °C’de stoklandı.
Nüklei Lizis Buffer	10 mM Tris Base, 400 mM NaCl, 2 mM EDTA dH ₂ O’da çözülüp (pH: 8.2). 121 °C’de 20 dk otoklavlandı. +4 °C’de stoklandı.

3.2.3.2 DNA Miktarının Spektrofotometrik Olarak Belirlenmesi

İzole edilen DNA 1:40 oranında steril dH₂O ile sulandırıldı. Kuvartz 96 well plate kullanılarak A₂₆₀ ve A₂₈₀ dalga boylarında absorbands alındı. A₂₆₀/A₂₈₀ oranı hesaplanarak DNA 'nın saflığı belirlendi. DNA konsantrasyonu aşağıdaki formüle göre hesaplandı.

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

3.2.3.3 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR, PCR)

ADAMTS-3 promotor bölgesini klonlamak amacıyla bu bölgeye spesifik olarak tasarlanmış primerler kullanılarak PCR yapıldı. PCR reaksiyonu için Tablo 3.4'de son konsantrasyonları verilmiş olan kimyasallar son hacim 50 µl olacak şekilde eklenerek PCR kuruldu. Ayrıca GC oranı yüksek bölgelerin çoğlatılması için reaksiyona DMSO ve 7-deaze GTP kuvvetlendiricileri eklendi. PCR koşulları Tablo 3.5'te verilmiştir.

Tablo 3.4: PCR reaksiyon kimyasalları.

PCR bileşenleri	Son konsantrasyon
gDNA	1 µg
MgCl ² (25 mM)	3 mM
10X taq polimeraz tamponu	1 X
dNTP (10 mM)	0,2 mM
Forward primer (100 ng/µl)	2 ng/µl
Reverse primer (100 ng/µl)	2 ng/µl
Taq DNA polimeraz (5 U/ µl)	0.05 U/ µl
DMSO	% 5
7-deaze GTP (2,5 mM)	0,05 mM
dH ₂ O	50'ye tamamlanacak
Son hacim	50 µl

Tablo 3.5: PCR koşulları.

Sıcaklık	Süre	Döngü Sayısı
94 °C	3 dakika	1
94 °C	1 dakika	x 40
58 °C	45 saniye	
72 °C	1 dakika	
72 °C	10 dakika	1

3.2.3.4 Agaroz Jel Elektroforezi

DNA'nın jelde görüntülenmesi amacıyla % 0.8 'lik agaroz jel hazırlandı. Jel elektroforez kasetinin hacmine göre uygun miktarda Agaroz tartılarak 0.5 X TBE tamponunda çözüldükten sonra kaynatıldı. 45-50 °C'ye kadar soğutulduktan sonra son konsantrasyon 0.5 µg/mL olacak şekilde Et-Br eklendi. Et-Br'ün iyice karışması sağlandı. Tarakların önceden yerleştirilmiş olduğu agaroz jel elektroforezi kasetine jel döküldü. Jel polimerleştikten sonra taraklar çıkarılıp kaset elektroforez tankına yerleştirildi. 0.5 X TBE tamponu ile elektroforez tankı dolduruldu (Tablo 3.6). Örnekler yükleme boyası ile karıştırılarak jele yüklendi. 90 Voltta yürütülerek jel görüntüleme sisteminde görüntülendi ve değerlendirildi.

Tablo 3.6: DNA agaroz jel elektroforezinde kullanılan çözeltiler.

5 X Tris-Borik Asit-EDTA (TBE) tamponu pH: 8.00	54 g Tris Base, 27.5 g Borik Asit, 20 ml 0.5 M EDTA (pH: 8.00) tartıldı. Üzeri dH ₂ O ile 1 L'ye tamamlandı.
0.5 X TBE Tamponu pH: 8.00	5 X TBE tamponu 10 kat sulandırılarak pH'sı ayarlanıp otoklavlandı
DNA Büyüklük Belirteci	100 µl DNA büyüklük belirteci, 200 µl yükleme boyası ve 200 µl steril dH ₂ O'da çözümlenerek hazırlandı.
Etidyum Bromür Stok Solüsyonu	10 mg/ml olacak şekilde steril dH ₂ O ile hazırlandı Koyu renkli ışık geçirmeyen bir şişede muhafaza edildi.

3.2.3.5 DNA Örneklerinin Agaroz Jelden Saflaştırılması

Agaroz jel elektroforezinde yürütülen PCR ürünlerinin oluşturduğu bantlar bisturi yardımıyla kesilerek ependorflara alındı. Kesilen jel ağırlığı tartılarak belirlendi. GeneJET Gel Extraction Kit (Thermo Scientific) jel ekstraksiyon kitinde belirtildiği şekilde örnekler jelden geri saflaştırıldı.

3.2.3.6 Ligasyon

Taq polimeraz kullanılarak elde edilen PCR ürünleri jelden geri kazanılarak pGEM-T vektörüne protokolda belirtildiği şekilde T:A klonlaması yapıldı (Promega). pGEM-T Easy vektör sistemi T:A klonlama sistemiyle çalışan bir plazmit vektördür. 20 µl'lik son hacimde reaksiyon ortamına klonlanacak DNA parçası ve vektör (minimum 1:3 oranında), 1 X ligasyon tamponu, 0.3 U/µl T4 DNA ligaz enzimi eklenerek +4 °C'de bir gece inkübasyona bırakıldı. Ligasyon sonuçları *E.coli XL1blue* ve DH5a kompetent hücrelerine transforme edildi. Transformantların seçimi mavi-beyaz koloni yöntemine göre yapıldı. Bunun için Ampisilin içeren LB agar besiyerlerine 100 µl IPTG (100 mM stok) ve 20 µl X-Gal (stok 50 mg/ml) yayıldı. Beyaz koloniler seçilerek araştırıldı. Promotor fragmentlerinin haberci gen vektörüne alt klonlanması restriksiyon endonükleaz kesimine dayalı yöntem ile yapıldı.

3.2.3.7 Restriksiyon endonükleaz enzim kesimleri

Restriksiyon endonükleaz enzim kesimleri; 1 µg DNA'nın kesimi için 1U enzim ve 1 X konsantrasyonda tampon kullanıldı. Son hacim kesimden kesime değişse de hacmi tamamlamak için dH₂O eklenerek, kesimler 37 °C'de 1 gece inkübasyona bırakılarak gerçekleştirildi (Tablo 3.7).

Tablo 3.7: Kesim koşulları.

Reaksiyon İçeriği	Miktar
Vektör	1 µg
Buffer B	Son hacmin % 10'u kadar
Enzim	1U
dH ₂ O	X µl

3.2.3.8 Defosforilasyon

Fosfataz, fosforik asit monoesterlerini fosfat iyonu ve serbest hidroksil gruplarına parçalayan enzimdir. Bu olaya defosforilasyon denilmektedir. Ligasyonda, DNA ligazın birbirine yakın nükleotidler arasında fosfodiester bağı oluşumunu katalizleyebilmesi için bir nükleotidin 5' ucunda fosfat grubu, diğer nükleotidin 3' ucunda ise -OH (hidroksil) grubunun bulunması gerekir. Özellikle tek enzim kesimi yapılarak lineer hale getirilen plazmit DNA' nın ligasyon sırasında kendi üzerine bağlanmasını engellemek amacıyla her iki 5' ucunda bulunan fosfatların defosforilasyonla uzaklaştırılması faydalı olmaktadır. Bu amaçla tek enzim kesimi ile gerçekleşen klonlamalarda vektöre defosforilasyon uygulanır. Defosforilasyon koşulları Tablo 3.8'de verilmiştir.

Tablo 3.8: Defosforilasyon koşulları.

Bileşenler	Son konsantrasyon	
Doğrusal DNA plazmit	1 µg	37 °C 2 saat 65 °C 15dk.
10 X CIAP tampon	1 X	
CIAP	1 U	
dH ₂ O	20 µl'ye tamamlandı	

3.2.4 Hücre Kültürü Teknikleri

3.2.4.1 Hücre Kültürü Tekniklerine Kullanılan Solüsyonlar

3.2.4.1.1 PBS Tamponunun Hazırlanması

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

3.2.4.1.2 Tripsin-EDTA (TE) Tamponunun Hazırlanması

% 0.05 Tripsin ve 0.5 mM EDTA 1 X PBS içerisinde çözülerek hazırlandı. 121 °C'de 20 dakika otoklavlanarak steril edildi. +4 °C' de muhafaza edildi.

3.2.4.1.3 FCS (Fetal Sığır Serumu)'un Hazırlanması

FCS ticari olarak temin edildi (Gibco). -20 °C'de saklandı ve taşınması soğuk zincirle yapıldı. Stok serum ilk kullanımdan önce 4 °C'de çözülmesi beklendi. Çözüldükten sonra 56 °C 1 saat ısı ile inaktive edildi. 0.22 µm filtre ile steril edildi ve tekrar -20 °C de saklandı.

3.2.4.1.4 Hücre kültürü medyumunun Hazırlanması

DMEM (Dulbecco's Modified Eagles Medium) içine L-Glutamin son konsantrasyonu 0.2 mM ve fetal sığır serum (FCS) son konsantrasyonu %10 olacak şekilde ilave edildi. Tüm bileşenler 0.22 µm steril filtreden süzülerek steril edildi.

3.2.4.2 Hücre Kültüründe Kullanılan Hücre Hatları

Çalışmada kullanılan Saos-2 hücreleri Cardiff Üniversitesi (İngiltere) öğretim üyesi Dr. Kenneth Wann ve Dr. Deborah Mason'dan, MG63 (İnsan Osteosarkoma) hücreleri Dokuz Eylül Üniversitesi Biyofizik Anabilim Dalı öğretim Üyesi Dr. Berivan Erik'ten, PC-3 ve DU-145 (İnsan Prostat Kanseri) hücreleri, Ege Üniversitesi Biyomühendislik Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Kemal S. Korkmaz'dan, Panc hücreleri Balıkesir Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı öğretim üyesi Yrd. Doç. Dr Hatice Yıldırım'dan, HUVEC hücreleri Bilkent Üniversitesi öğretim üyesi Dr. Ayşe Begüm Tekinay'dan, HT-29 (İnsan Kolon Kanseri) hücreleri Ege Üniversitesi Biyomühendislik Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. İsmet D. GÜRHAN' dan, İnsan Karaciğer kanserli hücre hattı (Hep3B) ATTC'den temin edildi.

3.2.4.3 Hücre Soyunun Başlatılması

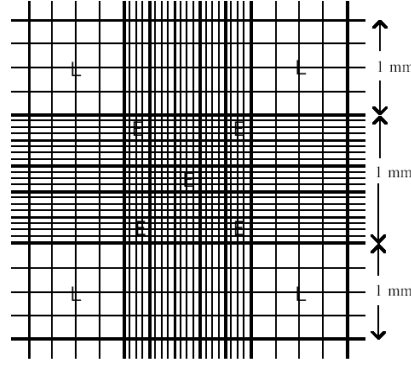
Hücre soyu ile çalışmaya başlamadan en az yarım saat önce steril kabin çalıştırıldı ve % 70'lik alkol ile steril kabinin iç yüzeyi temizlendi. 37 °C'ye ılıtılan FCS ve medyumun dış yüzeyleri % 70'lik alkol ile temizlenerek kurulandı ve steril kabin içine alındı. Uzun dönemde -80 °C'de saklanan hücre hatlarının büyütülmesi için -80 °C'den çıkarılan hücreler 37 °C sıcaklığındaki su banyosuna alındı ve hızlıca çözümleri sağlandı. Çözünen hücreler %10 FCS içeren medyuma alındı, alt üst edildi ve 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı, oluşan pellet 75 cm²'lik flasklar için 15 ml medyum ile çözüldü ve flasklara ekim yapıldı. Flasklar etiketlendi ve 37 °C, %5 CO₂ içeren inkübatöre konuldu.

3.2.4.4 Hücrelerin Pasajlanması

Hücreler sıkışık duruma gelince yani buldukları yüzeyi %80-90 oranında kaplayınca, içerisindeki medyum uzaklaştırıldı. Hücreler 2 kez steril PBS tampon ile yıkandı Tripsinizasyon ile hücrelerin flask yüzeyinden kalkması sağlandı. Hücreler yüzeyden ayrılınca FCS içeren medyum eklenerek Tripsin-EDTA'nın inaktive olması sağlandı. Yüzeyden alınan hücreler 1000 rpm 'de 5 dakika santrifüj ile çöktürüldü. Süpernatant uzaklaştırıldı. Pellet medyum ile çözüldü ve flasklara ekim yapıldı. Flasklar etiketlendi ve 37 °C, %5 CO₂ içeren inkübatöre konuldu.

3.2.4.5 Canlı Hücrelerin Belirlenmesi (Tripan Mavis Canlılık Testi) ve Hücre Sayımı

Toplam hücre süspansiyonun mililitresindeki hücre sayısı hesaplamak için, üzeri 25 küçük kareye ayrılmış, 1 mm² alan, 0.1 mm derinliği olan ve böylelikle toplam hacmin hesaplanabildiği Thoma lamı (hemositometre) (Şekil 3.5) kullanıldı. Canlı ve ölü hücreleri ayırt etmek için 10 µl hücre süspansiyonu eşit hacimde Tripan Mavis (1:1 dilüsyon oranında) ile 3-5 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Ölü hücreler mavi boyanırken canlı olanlar boyanmazlar. Alanda bulunan canlı hücreler sayıldı.



Şekil 3.5: Hemositometre

Süspansiyonun mililitresindeki toplam hücre sayısı aşağıdaki formülle bulunur.

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

3.2.4.6 Hücrelerin Dondurulması

Hücreler sıkışık duruma gelince içerisindeki medyum uzaklaştırıldı. Hücreler 2 kez steril PBS ile yıkandı. Tripsinizasyon ile hücrelerin yüzeyden ayrılmaları sağlandı. FCS içeren medium eklenerek Tripsin-EDTA' nın inactive olması sağlandı. Yüzeyden ayrılan hücreler 1000 rpm 'de 5 dakika santrifüj ile çöktürüldü. Süpernatant uzaklaştırıldı. Hücre pelleti % 10 DMSO içeren FCS ile dikkatlice çözüldü. Cryovial tüplerine konuldu ve etiketlenerek -80 °C'lik dolapta stoklandı.

3.2.5 Transkripsiyonel Aktivitenin Belirlenmesi ile İlgili Teknikler

3.2.5.1 Kalsiyum Fosfat Presipitasyonu ile Geçici Transfeksiyon

Transfeksiyon için hücreler bir gün önceden 12 kuyucuklu plakalara her bir kuyu için 25×10^4 hücre olacak şekilde paylaştırıldı. 45 µl son hacimde; 2 mM CaCl_2 solüsyonu hücrelere transfekte edilecek DNA ile karıştırıldı. Karışımın üzerine 45 µl 2 X HEPES pastör pipeti yardımıyla damla damla eklendi ve presipitasyonun oluşması için yarım saat beklendi. Sürenin sonunda presipitasyon oluşumu kontrol edildi. Ependorf içerisinde tortu oluşumu gözlendikten sonra karışım plakalardaki her bir

kuyucuğa damla damla eklendi. Plakalar hafifçe sallanarak karışımın yayılması sağlandı. Hücreler CO₂'li inkübatörde 6 saat bekletildi. Sürenin sonunda kuyucuklardan medyum uzaklaştırıldı. Hücreler iki kez PBS ile yıkandı ve taze medyum eklendi. 24, 48 ve 72 saat inkübasyon sürelerinin sonunda lusiferaz ve salınan alkalin fosfat aktivitesi luminometre ile ölçüldü.

25cm² flaklarda transfeksiyondan bir gün önce hücreler yaklaşık 2.000.000 olacak şekilde yayıldı. Transfekte edilecek DNA ve 2mM CaCl₂ ayrı bir tüp içinde hazırlandı (Tablo 3.9). Üzerine 2 X HEPES pastör pipeti yardımıyla damla damla eklenerek yarım saat presipitasyon için oda sıcaklığında bekletildi. DNA/Kalsiyum fosfat presipitasyonu oluştuktan sonra karışım damla damla kuyucuklara eklendi. Flak hafifçe sallanarak karışımın dağılması sağlandı. 6 saat sonra transfeksiyon solusyonu değiştirilerek, PBS ile kuyular yıkandı ve taze medyum eklendi. 24, 48 ve 72 saat sonra hücreler tripsin-EDTA ile kaldırıldı ve pellet haline getirilerek RNA izolasyonları ve protein çalışmaları için -80 °C dondurucuda saklandı.

Tablo 3.9: Kalsiyum fosfat presipitasyonu ile geçici transfeksiyon çalışmalarında kullanılan solüsyonlar.

2 mM CaCl₂	14.7 g CaCl ₂ , 50 ml'ye dH ₂ O ile tamamlandı. Otoklavlandıktan sonra filtrelenip +4 °C' de muhafaza edildi
2X HEPES	1.6 g NaCl, 0.04 g Na ₂ HPO ₄ , 1.3 g HEPES dH ₂ O ile 100 ml'ye tamamlandı. pH: 7.05–7.12 aralığında olmalıdır. Otoklav yapılarak filtre edildi ve -20 °C' de muhafaza edildi.

3.2.5.2 Salınan Sistem Lusiferaz Aktivitesinin Ölçülmesi

12 kuyucuklu plakalarda yapılan transfeksiyon sonrasında 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon süreleri sonrasında hücre kültürü medyumundan 50 µl alınarak 96 kuyucuklu plakalara eklendi. 10 X Substrat solusyonu hazırlandı ve daha sonra ölçümlerde kullanılmak üzere 1 X'e Reaksiyon tampon ile seyreltildi (Tablo 3.10). Her bir örnek için taze hazırlanmış 1 X Substrat/Reaksiyon tamponundan 5 µl medyumun üzerine eklendi ve hızlıca luminometrede sonuçlar okundu.

Tablo 3.10: Lusiferaz ve SEAP aktivitesinin ölçümünde kullanılan solüsyonlar.

10 X Substrat Solusyonu	Liyofilize durumdaki substrat, substrat tamponu ile çözüldü
1 X Substrat/Reaksiyon Tamponu	10 X substrat solusyonu, reaksiyon tampon ile 10 kat sulandırılıp her ölçüm için 5 µl kullanıldı.
1 X Dilüsyon Tamponu	5 X dilüsyon tamponu dH ₂ O ile 5 kat sulandırılarak her bir örnek için 75 µl kullanıldı.

3.2.5.3 SEAP (Salınan Alkalın Fosfataz) Aktivitesinin Ölçümü

24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon süreleri sonunda ayrılan 25 µl hücre kültürü medyumunu 96 kuyucuklu plakalara konuldu. 5 X dilüsyon tamponu 1 X'e dH₂O ile dilüe edildi (Tablo 3.10). 1 X dilüsyon tamponundan 75 µl medyumların üzerine eklendi. Plaka alüminyum folyo ile sarılarak 65 °C' de 30 dakika bekletildi. Daha sonra 2-3 dk buzda bekletilerek soğutulduktan sonra oda sıcaklığına gelmesi beklendi. Oda sıcaklığındaki SEAP substrat solusyonundan her bir örneğe 100 µl eklendi ve örnekler oda sıcaklığında 10-60 dakika bekletildi. İşlem sonunda sonuçlar luminometrede okutuldu.

3.2.6 RNA Tabanlı Teknikler

RNA çalışmalarında kullanılacak olan tamponların tamamı RNAaz içermeyen su ile hazırlandı. Kullanılan suyun Rnaz'dan arındırılması için 1 ml Dietilpirokarbonat (DEPC), 1000 ml dH₂O'da çözülüp 37 °C'de 12 saat bekletildikten sonra 121 °C'de 20 dakika otoklavlandı.

3.2.6.1 Hücre Pelletlerinden RNA İzolasyonunun Yapılması

Pellet haline getirilerek RNA izolasyonları için -80 °C dondurucuda saklanan örnekler buz üzerinde dikkatlice çözüldü. GeneJET RNA Purification Kit (Thermo Scientific) protokolünde önerildiği şekilde RNA izolasyonları yapıldı. RNA örnekleri uzun dönemde kullanılmak üzere -80 °C dondurucuya kaldırıldı.

3.2.6.2 RNA Miktar Tayini

İzole edilen RNA'ların miktarları ve saflıklarının tayini için 260 nm ve 280 nm'de absorbansları alındı. Bu amaçla kuvarz küvetlere kör değer için 270 µl dH₂O, RNA ölçümleri için 264 µl dH₂O ve 6µl RNA örneği konuldu. Elde edilen absorbans değerleri ve saflıklarının değerlendirilmesi için aşağıdaki formüller kullanıldı.

$$\text{RNA miktarı} = A_{260} \times \text{sulandırma değeri} \times 40 \text{ ng}/\mu\text{l}, \text{ Saflık} = A_{260} / A_{280}$$

3.2.6.3 RNA Jel Elektroforezi (Formaldehit Agaroz Jel Elektroforezi)

Elektroforez tankı ve aparatları jel dökülmeden önce % 0.5'lik SDS ile yıkandıktan sonra DEPC'li sudan geçirildi. Daha sonra etonal ile yıkandıktan sonra peçete üzerinde etüve yerleştirilerek kurumaya bırakıldı. 0.5 gr agaroz, 5 ml 10 X FA jel tampon (Tablo 3.11) ve 50 ml DEPC'li su mikrodalgada kaynatıldı ve buharlaşma bitene kadar soğumaya bırakıldı. 900 µl formaldehit ve 1 µl etidyum bromür eklenerek kasete döküldü. Jel donduktan sonra kaset 1 X FA jel tampon (Tablo 3.12) ile doldurulan tanka yerleştirilir. RNA örnekleri jele yüklenmeden önce 70 °C'de 10 dk ısı ile denatüre edilip daha sonra 10 dk buzda bekletildi. Örnekler jele yüklenerek 90 Voltta yürütüldü. Elektroforez sonucu dijital jel görüntüleme sistemi kullanılarak değerlendirildi.

Tablo 3.11: Formaldehit agaroz jel elektroforezi jel tamponu.

10X FA jel 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 ile hazırlanıp pH: 7.0'ye ayarlandı. Otoklavlanarak steril edildi.		

Tablo 3.12: 1 X FA jel elektroforezi tank tamponu.

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.

3.2.6.4 cDNA Eldesi ve RT-PCR

RT-PCR iki ayrı basamak olarak yapıldı. Öncelikle miktarları belirlenen RNA örneklerinden 1µg olacak şekilde RNA kalıbı eklenerek Reverse-Transkriptaz (RT) enzimi kullanılarak cDNA sentezlenmesi gerçekleştirildi. Reaksiyon koşulları Tablo 3.13'de gösterildiği şekildedir. Elde edilen cDNA'lar kullanılarak ikinci basamakta 1 µl'si kullanılarak Bölüm 3.2.3.3'de anlatıldığı şekilde PCR reaksiyonu gerçekleştirildi.

Tablo 3.13: cDNA eldesi için uygun RT-PCR bileşenleri.

Reaksiyon Bileşenleri	Son konsantrasyon
RNA kalıp	1 µg
Oligo dT	200 pmol
dH ₂ O	X µl
Son hacim	12.5 µl
65 °C'de 5 dk	
5X Reaction tamponu	1 X
Ribolock Rnase inhibitor	20 U/µl
dNTP mix	1 mM
M-MuLV Reverse Transcriptase	10 U/µl
Son hacim	20 µL
42 °C'de 60 dk	
70 °C'de 10 dk	

3.2.6.5 Real-Time PCR

Real time PCR çalışmaları Light Cycler 485 (Roche Diagnostic) kullanılarak yapıldı. Reaksiyon 10 µl son hacimde 5 µl SYBR® Green PCR Master Mix, 1 µl cDNA, 100 ng/µl'lik forward ve reverse primerleri stoğundan 0.5'er µl ve 3 µl dH₂O kullanılarak yapıldı. Buna göre her bir cDNA en az üç tekrarlı olarak SP1, C/EBPα, USF, Tip I Kollajen, Tip II Kollajen, Tip III Kollajen, *ADAMTS-3* ve İnsan β-2 Mikroglobulin genleri için çalışıldı. İnsan β-2 Mikroglobulin geni sonuçların normalizasyonu amacıyla kullanıldı. Döngü koşulları Tablo 3.14'de belirtilmektedir.

Tablo 3.14: Real Time PCR döngü koşulları.

Segment	Döngü	Sıcaklık	Süre
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

3.2.6.6 Sonuçların Değerlendirilmesi

Real Time PCR sonuçları Livak metoduna göre değerlendirildi [154]. SP1, C/EBPα, USF, Tip I Kollajen, Tip II Kollajen, Tip III Kollajen, *ADAMTS-3* için elde edilen Ct değerleri, internal kontrol genin (İnsan β-2 Mikroglobulin) Ct ortalamasından çıkarıldı. Elde edilen değer 2 tabanındaki kuvveti alındı. Kontrol grupları kendisine bölünerek '1' birim olarak kabul edildi. Deney grupları kontrol değerine bölündü ve 1'in katı şeklinde sonuçlar elde edildi. İstatistiksel analizler MiniTab (One Way ANOVA) ile gerçekleştirildi. $p \leq 0.05$ olduğu durumlar istatistiksel olarak anlamlı olarak kabul edildi.

3.2.7 Protein Tabanlı Teknikler

3.2.7.1 Western Blot

3.2.7.1.1 Western Blot Çalışmalarında Kullanılan Çözeltiler

Western blot çalışmalarında kullanılan tamponların konsantrasyonları ve hazırlanma şekilleri Tablo 3.15’te verilmiştir.

Tablo 3.15: Western blot çalışmalarında kullanılan tampon ve çözeltiler.

RIPA Tamponu	10 mM Tris-HCl (pH:8), %1(v/v) Triton X100, %0,1 (v/v) SDS, %0,1 (v/v) sodyum deoxycholate, 1mM EDTA, 1mM EGTA, 140 mM NaCl, proteaz inhibitörü.
Bromfenol Mavisi Solüsyonu	%0.05 (w/v) bromfenol mavisi distile su içinde çözülerek hazırlandı.
Yükleme Boyası	1.4 gr Tris, 4 gr SDS, 20 gr Sükroz, 4 mg bromfenol mavisi, pH:6.8’e ayarlanarak 100 ml’ye tamamlandı.
SDS PAGE Ayırma Jeli Tamponu	1.5 M Tris-HCl (pH:8.8), %10 (w/v) SDS
SDS PAGE Yığılma Jeli Tamponu	1 M Tris-HCl (pH:6.8), %10 (w/v) SDS
SDS PAGE Yürütme Tamponu	25 mM Tris, 250 mM Glisin, %0,1 (w/v) SDS
Boyama Çözeltisi	0.25 g Coomassie Brilliant Blue 250, 100 ml % 95’lik Etanol, % 10 Asetik Asit
Arıtma Çözeltisi	Hacimce %7.5 Asetik Asit, %5 Metanol ve %87.5 distile su
Western Blot Transfer Tamponu	25 mM Tris, 192 mM Glisin, %20 (v/v) Metanol
10X Tris Buffered Saline (10X TBS)	10 mM Tris-HCl, 20 mM NaCl, pH: 7.4
Stripping Tamponu	1 M Glycine, %1 SDS, pH: 2.5
Film Yıkama Tamponu	3.5 L su içerisine 1.25 L A solüsyonu 125 ml B solüsyonu, 125 ml C solüsyonu eklenerek hazırlandı.
Fiksator Tamponu	1.4 L su içerisine 500 ml A solüsyonu ve 50 ml B solüsyonu eklenerek hazırlandı.
Ponceau Boyası	10 ml saf su içerisine 300 µl glasiyel asetik asit, 0.033 g Ponceau boyası koyuldu. Saf su ile 30 ml’ye tamamlandı.

3.2.7.1.2 RIPA Tamponu ile Protein Örneklerinin Hazırlanması

Belirlenen inkübasyon sürelerinin sonunda kontrol ve deney grubuna ait hücreler 2 kez soğuk PBS ile yıkandı. Buz üzerinde kuyulara RIPA solüsyonu (Tablo 3.15) eklenerek hücre kazıyıcısı ile hücreler kazındı. Soğutulmuş ependorf tüplerine alınan hücreler 45 dakika buz üzerinde bekletildi. Bu süre içinde bir kaç sefer örneklere pipetaj yapıldı. 45 dakika sürenin sonunda örnekler +4 °C'de 12.000 g'de 10 dk santrifüj yapıldı. Üst kısımdaki sıvının konsantrasyonu belirlenerek proteinler -80 °C dolaba kaldırıldı.

3.2.7.1.3 SDS-PAGE

SDS-PAGE jelinin hazırlanması amacıyla elektroforez aparatları ve cam levhalar dH₂O, %70'lik etanol ve son olarak isopropanol çözeltisi ile temizlendi. Ayırma ve yığma jelleri Tablo 3.16'da belirtildiği şekilde hazırlandı. Protein örnekleri 30 µg olacak şekilde yükleme boyası ile karıştırıldı ve 95 °C'de 5 dk denatüre edildi. Jelin bir kuyusuna 5 µl Prestained Page Ruler Plus (Thermo 26616) büyüklük belirteci olarak yüklendi. SDS-PAGE tankı % 0.1 SDS içeren 1 X yürütme tamponu ile doldurularak 120 volt akımda örnekler yürütüldü.

Tablo 3.16: SDS-PAGE ayırma ve yığma jeli içerikleri.

Jel İçeriği	%10 Ayırma Jeli	%5 Yığma Jeli
Yığma Jeli Tamponu	-	2.5 ml
Ayırma Jeli Tamponu	2.5 ml	-
Akrilamid: Bisakrilamid (37.5:1)	2.5 ml	1.25 ml
ddH ₂ O	5 ml	6.25 ml
% 10 (w/v)Amonyum PerSülfat	100 µl	100 µl
TEMED	10 µl	10 µl

3.2.7.1.4 SDS Jelinin PVDF Membrana Transferi

Proteinlerin elektroforetik transferi için Bio-Rad Laboratories, Bio-Rad Trans Blot sistemi kullanıldı. Proteinlerin transferi için PVDF (Millipore) membranlar kullanıldı. Jeller cam levhalar arasından çıkarıldı, yığma jeli kesilerek uzaklaştırıldı ve jel soğuk transfer tamponu (Tablo 3.15) içine alınarak dengelenmesi için oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edildi. 1 dakika süreyle metanolde bekletilerek aktive edilen PVDF membranlar ve kurutma kâğıtları jel ile aynı boyutlarda kesilerek hazırlandı. Bu sırada sünger pedler ve transfer aparatları da transfer tamponu içine alındı. Daha sonra sandviç hazırlamaya başlandı. Bunun için transfer kaseti arasına sırasıyla sünger, kurutma kâğıdı, jel, membran, kurutma kâğıdı, sünger olacak şekilde sandviç hazırlandı. Bu sırada hava kabarcığı kalmamasına dikkat edildi. Daha sonra kaset, transfer tamponu ile dolu olan blotlama tankına yerleştirildi ve 15 volt akımda +4 °C’de 1 gece transfere bırakıldı.

3.2.7.1.5 Proteinlerin Belirlenmesi

Proteinlerin transfer olduğu PVDF membranlar ilk olarak 20 ml bloklama çözeltisinde (% 5 yağsız süt tozu ve % 0.1 Tween20 içeren 1 X TBS) 1 saat horizontal çalkalayıcıda oda sıcaklığında bloklamaya bırakıldı. Süre sonunda bloklama çözeltisi uzaklaştırılarak 5 dakikalık sürelerle 3 kez membran yıkandı, bunun için % 0.1 Tween20 içeren 1 X TBS kullanıldı (Tablo 3.15). Membran primer antikor ile 1 gece +4 °C’de inkübe edildi. Daha sonra sekonder antikor ile bir saat oda sıcaklığında inkübasyon yapıldı. Sekonder antikor uzaklaştırıldı, membran 5 dakikalık sürelerle 3 kez yıkandı ve görüntülemeye geçildi.

Bantlar ECL Western Blotting Substrat’ı (Pierce) kullanılarak görüntülendi ve karanlık odada X-Ray filme basıldı. Film sırasıyla 2’şer dakika banyo solüsyonu ve sabitleyici solüsyonlarında (developer ve fixer solüsyonlarında) ve 1 dakika suda bekletilerek tab edildi.

3.2.7.1.6 Western Blot Analizi

Sonuçlar Image J programı kullanılarak densitometrik olarak değerlendirildi. β -Aktin proteini tüm deney ve kontrol gruplarında çalışılarak normalizasyon amacıyla kullanıldı.

3.2.7.2 İmmüno Floresans Deneyleri

Sterilizasyonu yapılan özel yuvarlak lameller 24 kuyucuklu plakalara yerleştirildi. Hücrelerin ekimi 125.000 hücre/kuyu olacak şekilde yapıldı. Bir gece inkübasyona bırakılan hücrelerin, ertesi gün medyumları uzaklaştırılarak PBS ile iki kez yıkandı. Hücreler %4'lük paraformaldehit çözeltisinde 15 dk oda sıcaklığında bekletilerek fikse edildi. Fiksatif uzaklaştırıldı, hücreler üç kez PBS ile yıkandı. Yıkama sonrası hücreler %0.3 (v/v) Triton X-100 içeren PBS'de 5 dk bekletildi. Hücreler PBS ile yıkandı. Spesifik olmayan bağlanmaları engellemek için %10 BSA içeren PBS ile yarım saat oda sıcaklığında blokladı. PBS ile 5 dk yıkanarak bloklama solüsyonu uzaklaştırıldı ve dilüye edilmiş primer antikor eklendi (Primer antikor 1/50 veya 1/100 oranında %1 BSA içeren PBS ile sulandırıldı). Hücreler gece boyunca +4 °C'de ışık geçirmeyen nemlendirilmiş kapaklı bir kaptan ya da "humid chamber"da primer antikor ile inkübasyona bırakıldı. Ertesi gün primer antikor uzaklaştırılarak hücreler PBS ile üç kez 5'er dakika yıkandı. Sekonder antikor uygulama işlemleri karanlık ortamda yapıldı. Sekonder antikor 1/100 konsantrasyonda olacak şekilde %1 BSA içeren PBS ile sulandırıldıktan sonra nemlendirilmiş ve ışık geçirmeyen kapaklı bir kaba yerleştirilerek oda sıcaklığında 1 saat inkübasyona bırakıldı. Sekonder antikor süresinin sonunda hücreler üç kez 5'er dakika PBS ile yıkandı. Çekirdek boyaması yapılacak olanlar hücrelere 1 μ g/mL DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) boyası eklendi ve 5 dk inkübasyona bırakıldı. Daha sonra PBS ile yıkama yapıldı.

Preperatların mikroskop incelemesine hazırlanması amacıyla lamaların üzerine floresans sinyalin zamanla solmasını engelleyecek ticari antifade tampon (İnvitrogen) damlatıldı. Kuyucukların tabanında bulunan yuvarlak lameller çıkartılıp ters çevrilerek lam üzerine yerleştirildi. Floresans görüntülemeleri Balıkesir Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı bünyesinde bulunan ED200 floresans

ataçmanlı Olympus BX51 marka mikroskopla yapıldı. Fotoğraflar, aynı mikroskoba takılı Olympus DP72 marka dijital fotoğraf makinesi ile çekildi.

3.2.7.2.1 İmmun Floresans Analizi

Floresans mikroskobu kullanılarak elde edilen görüntüler Image J programında densitometrik olarak değerlendirildi. Image J programında hücrelerin çevresi işaretlenerek elde edilen değerler kullanılarak total hücre floresans ışınması aşağıda gösterildiği gibi hesaplandı.

$$\text{Total hücre floresans ışınması} = \text{Tüm yoğunluk} - (\text{Hücre alanı} \times \text{arka plan değeri})$$

3.2.8 DNA-Protein Etkileşimine Dayalı Teknikler

3.2.8.1 EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay) Tekniği

EMSA, DNA-protein etkileşimlerini belirlemek için kullanılan bir tekniktir. DNA-protein kompleksinin oluşması durumunda, bu kompleks denatüre olmayan jelde serbest DNA molekülüne göre daha yavaş hareket etmektedir. İlgili proteinin DNA'ya bağlanması durumunda jeldeki hareketi değişerek daha arkada kalmaktadır. DNA'nın hareketindeki bu değişimler değerlendirilerek düşünülen protein ile etkileşime girip girmediği belirlenebilmektedir.

3.2.8.1.1 Osteosarkoma Hücrelerinden Nükleer Ekstraktların Hazırlanması

Herhangi bir uygulama yapılmış veya yapılmamış 75 cm²'lik flask yüzeyindeki hücreler buzda soğutulmuş 10 ml PBS ile iki kez yıkandıktan sonra 3 ml TEN tamponu eklendi ve buz üzerinde 5 dk bekletildi. Hücreler flask yüzeyinden hücre kazıyıcısı

yardımı ile kazınarak 2 ml'lik tüplere alındı. +4 °C'de, 14.000 rpm'de 20 sn santrifüjlendi. Pellet 1,5 ml soğuk PBS ile yıkandı. 4 °C'de, 14.000 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Üst kısım atıldı. Pellet 50 µl A tamponunda süspanse edildi. Süspanse haldeki örnekler 15 dk buzda bekletildi ve hamilton enjektöründen 5 kez geçirilerek lizis edildi. Lizat +4 °C'de, 14.000 rpm'de 20 sn santrifüj edildi. Oluşan pellet 60 µl C tamponunda süspanse edildi. Örnekler buzda 30 dk bekletildikten sonra +4 °C'de, 14.000 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Süpernatanttan protein miktarı belirlendikten sonra 10 µl'lik hacimlere ayrılarak -80 °C dondurucuda muhafaza edildi.

3.2.8.1.2 Oligonükleotitlerin İşaretlenmesi

Reaksiyon eğer ki primerler biotinsiz ise biotinleme ve onu takip eden bağlanma reaksiyonu olmak üzere 2 basamaklıdır. Biotinleme ve bağlanma reaksiyonu Tablo 2.18 ve Tablo 2.19'da gösterilmektedir. Biotinleme için kullanılan TdT enzimi sulandırılarak kullanıldı. Sulandırılan enzim daha sonra biotinleme reaksiyonunda kullanıldı. Bu amaçla öncelikle Tablo 3.17'de gösterilen sulandırma işlemi ardından Tablo 3.18'de gösterilen biotinleme reaksiyonu kuruldu. Bileşenler biotinlenmek istenen oligo ile birlikte tüpe konuldu, 37°C'de yarım saat inkübasyona bırakıldı. Tamamlanan süre sonunda reaksiyonu durdurmak için ortama 2.5 µl 0.2 M EDTA (pH:8) eklendi. Sonrasında TdT enzimini uzaklaştırmak için ortama 50 µl kloroform:izoamil alkol (24:1) eklenerek, kısa süreli vorteks ve 1-2 dakikalık yüksek devirli santrifüj ile 2 ayrı faz oluşması sağlandı. Enzimsiz ve biotinlenmiş oligoların bulunduğu üst faz temiz bir ependorfa alınarak, EMSA'da kullanılmak üzere -20°C'de saklandı.

Tablo 3.17: Enzim sulandırma reaksiyon bileşenleri.

Bileşen	Hacim (µl)
5 X TdT Reaksiyon Tamponu	1 X
dH ₂ O	X µl
TDT (20 U/µl)	2 U/µl
Toplam	10 µl

Tablo 3.18: Biotinleme reaksiyonu bileşenleri.

Bileşen	Hacim (µl)	Son konsantrasyon
Saf su	25 µl	-
5 X TdT reaksiyon tamponu	10 µl	1 X
Kontrol oligo (1 µM)	5 µl	100 nM
Biotin-11-UTP (5 µM)	5 µl	0.5 µM
Sulandırılmış TdT(2 U/µl)	5 µl	0.2 U/µl
Son hacim	50 µl	-

3.2.8.1.3 Oligonükleotitlerin Bağlanması

Oligonükleotitlerin bağlanması için her bir oligonükleotitten 500 fmol/µl olacak şekilde alınarak, 50 µl son hacimde dH₂O içerisinde sulandırıldı. Reaksiyon PCR tüpünde gerçekleştirildi. Çift zincirli hale gelmeleri için 95 °C’de 5 dk inkübasyona bırakıldıktan sonra oda ısısında yavaşça soğumaları için bekletildi.

3.2.8.1.4 Bağlanma Reaksiyonu ve Örneklerin EMSA Jelinde Yürütülmesi

Bağlanma reaksiyonu için Tablo 3.19’deki bileşenlerden oluşan reaksiyon kurulmaktadır. Tüpler reaksiyon kurulduktan sonra oda ısısında 20-60 dakika inkübasyona bırakıldı.

Tablo 3.19: Bağlanma reaksiyon bileşenleri.

Bileşenler	Son Konsantrasyon	Reaksiyonlar	
		Serbest R.	Yarışma R.
Ultra saf dH ₂ O	-	X µl	X µl
10 X Bağlanma Solüsyonu	1 X	2 µl	2 µl

Tablo 3.19 (devamı): Bağlanma reaksiyon bileşenleri.

1 µg/µL PolydIdC	50 ng/µl	1 µl	1 µl
Opsiyonel: 1M KCl	40 mM	-	-
Opsiyonel: 200 mM EDTA	0.1 mM	-	-
Etiketsiz DNA	100.000 fmol/µl	-	2
Nükleer Ekstrakt	Sisteme bağlı	X µl	X µl
Etiketli DNA	20 fmol/µl	1	1
TOPLAM	-	20 µl	20 µl

Tablo 3.20'deki bileşenleri içeren EMSA jeli hazırlandıktan sonra 1 gece +4°C'de bekletildi. Ertesi gün hazırlanan %6'lık jel, jel ısısını sabitlemek ve aynı zamanda jeldeki iyon dengesini sağlamak amacıyla 30 dakika 100 V'da ön yürütmeye tabi tutuldu. Ön yürütmenin sonunda bağlanma reaksiyonları yükleme boyası ile karıştırılarak jele yüklendi ve 100 V akımda yürütüldü.

Tablo 3.20: EMSA jeli bileşenleri.

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

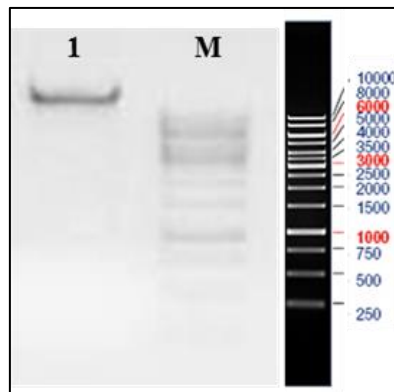
3.2.8.1.5 Proteinlerin Membrana Transferi

Jelde yürütülen örneklerin transferi için naylon membran kullanıldı. Naylon membran, Whatman 3 MM kağıt, sünger pedler soğuk transfer tamponu (0.5 X TBE) içinde alınarak en az 10 dk bekletildi. Daha sonra transfer kaseti arasına eksi yüklü kutuptan başlamak üzere sırasıyla sünger, Whatman kağıdı, jel, membran, Whatman kağıdı, sünger hava kabarcığı kalmayacak şekilde yerleştirildi. Kaset, soğuk transfer tamponu ile dolu olan blotlama tankına yerleştirildi. Transfer 90 mA akımda 1.5 saat boyunca gerçekleştirildi. Transfer sonrasında DNA'nın membrane bağlanmasını sağlayan kross-link reaksiyonu için membran streç film ile sarılarak UV transilimünatörde 15 dk bekletildi. Kross-link sonrasında membran oda sıcaklığında 15 dk süresince bloklama tamponu içerisinde çalkalandı. Bu sürenin sonunda Streptavidin-Horseradish Peroxidase Conjugate bloklama tamponuna eklenerek 15 dk oda sıcaklığında çalkalandı. Membran kitte bulunan 1 X yıkama tamponu ile dört kez yıkandıktan sonra 30 ml substrat dengeleme tamponu eklenerek 5 dk çalkalandı. Biotin işaretli DNA-protein kompleksi, ECL substratı kullanılarak görüntülendi ve görüntüleme Fusion FX Vilber Lourmat kullanılarak yapıldı.

4. BULGULAR

4.1 İnsan *ADAMTS-3* Promotorunun pGEM-T easy vektörüne Klonlanması

İnsan *ADAMTS-3* promotorunun klonlanması amacıyla öncelikle Bölüm 3.2.3.1’de belirttiği gibi osteosarkoma hücrelerinden genomik DNA izolasyonu yapıldı. Genomik DNA’nın saflığının ve kalitesinin belirlenmesi amacıyla agaroz jel elektroforezinde Bölüm 3.2.3.4’de belirtildiği şekilde örnekler yürütülerek görüntüledi (Şekil 4.1). Bununla birlikte spektrofotometrik olarak DNA miktarı ölçülerek konsantrasyonu belirlendi. Promotor bölgesinin PCR ile çoğaltılabilmesi için öncelikle gen bankasında kayıtlı olan *ADAMTS-3* (NM_014243) geninden yararlanılarak muhtemel promotor bölgesi belirlendi. Biyoinformatik olarak belirlenen translasyon başlangıç noktasından yaklaşık 1380 bp üst bölgede bulunan dizinin analiz edilmesi kararlaştırıldı. *ADAMTS-3* muhtemel promotor bölgesine ait, kesim bölgesi içermeyen forward ve reverse primerler dizayn edildi. Primerlere ait saç tokası ve %GC analizi ve NCBI blast analizi yapıldı (Şekil 4.2 ve Şekil 4.3). Ayrıca pozitif kontrol olarak GAPDH ve β -aktin primerleri kullanıldı (Tablo 4.1).

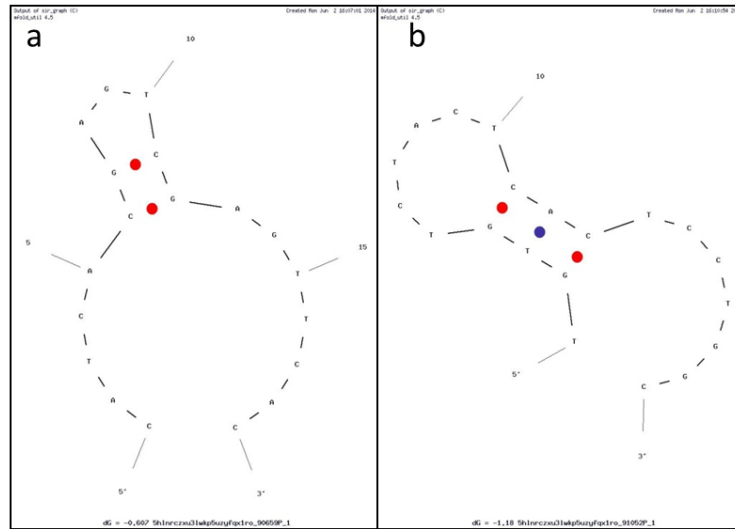


Şekil 4.1: Genomik DNA jel görüntüsü.

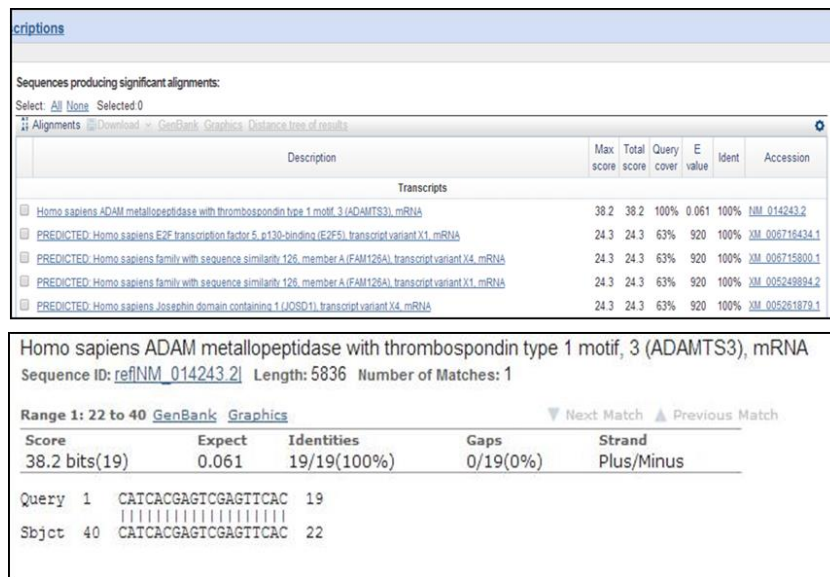
1: Osteosarkoma hücrelerinden izole edilen genomik DNA, **M:** DNA Büyüklük Belirteci

Tablo 4.1: ADAMTS-3 promotor primerleri

Primer	Primer dizisi	Tm	İşlev
ADAMTS-3 Forward	CATCACGAGTCGAGTTCAC	58°C	Promotor primeri
ADAMTS-3 Reverse	TGTGTCTACTCACTCCTGGC	62°C	Promotor primeri
GAPDH Forward	CCCTTCATTGACCTCAACTACATGG	55°C	Pozitif kontrol
GAPDH Reverse	AGTCTTCTGGGTGGCAGTGATGG	55°C	Pozitif kontrol
β-aktin Forward	TCCCTGGAGAAGAGCTACGA	50°C	Pozitif kontrol
β-aktin Reverse	AAGAAAGGGTGTAACGCAAC	50°C	Pozitif kontrol



Şekil 4.2: ADAMTS-3 primerlerine ait saç tokası analizi
a: ADAMTS-3 forward primer, **b:** ADAMTS-3 reverse primer



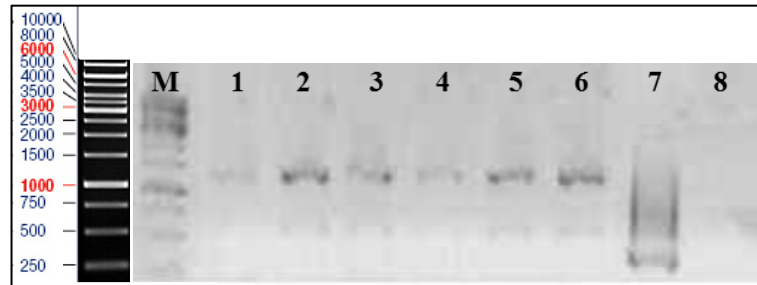
Şekil 4.3: ADAMTS-3 forward primeri NCBI blast sonucu.

ADAMTS-3 promotor bölgesini klonlamak amacıyla bu bölgeye spesifik olarak tasarlanmış primerler (Tablo 4.1) kullanılarak PCR yapıldı. PCR reaksiyonu Bölüm 3.2.3.3’de anlatıldığı şekilde kuruldu. GC oranı yüksek bölgelerin çoğaltılması için reaksiyona DMSO ve 7-deaza GTP kuvvetlendiricisi eklendi. PCR koşulları Tablo 4.2’de verilmiştir.

Tablo 4.2: *ADAMTS-3* promotor bölgesini için yapılan PCR reaksiyon koşulları.

Sıcaklık	Süre	Döngü Sayısı
94 °C	3 dakika	1
94 °C	1 dakika	x 40
58 °C	45 saniye	
72 °C	1 dakika	
72 °C	10 dakika	1

PCR sonucunda çoğaltılan *ADAMTS-3* muhtemel promotor bölgesi % 0,8’lik agaroz jelde yürütülerek bantlar belirlendi (Şekil 4.4).



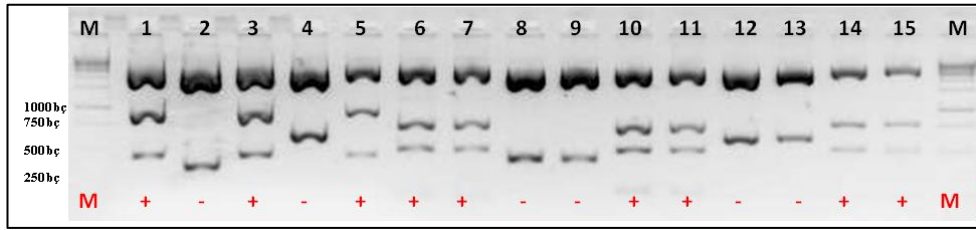
Şekil 4.4: *ADAMTS-3* promotorunun PCR amplifikasyonu agaroz jel elektroforez görüntüsü.

M: 1kb Büyüklük Belirteci, **1-6:** gDNA’nın kalıp olarak kullanıldığı ve PCR kuvvetlendiricisi kullanılarak çalışılan reaksiyonlar, **7:** GAPDH (+) Kontrol, **8:** (-) Kontrol

Jelde elde edilen bantlar Bölüm 3.2.3.5’te anlatıldığı şekilde jelden geri saflaştırıldı. PCR ile çoğaltılan *ADAMTS-3* promotor bölgesi jelden kazanıldı ve pGEM-T Easy vektörüne klonlanmak üzere ligasyonu yapıldı. pGEM-T Easy vektörüne klonlamanın amacı PCR sırasında Taq. polimerazın ürünlerin sonuna T

kuyruklarını eklemesi ve pGEM-T Easy vektörünün Poli A kuyruklarına sahip olması sebebi ile klonlamanın daha kolay gerçekleşmesidir. Bu nedenle Bölüm 3.2.3.6’da gösterildiği şekilde ligasyon +4 °C’de 1 gece inkübasyona bırakılarak gerçekleştirildi.

Ligasyon ürünleri *E.coli* DH5a hücrelerine transforme edildi ve oluşan kolonilerden rekombinant seçimi için beyaz koloniler seçildi. Seçilen kolonilerin sıvı kültür ekimi yapılarak ertesi gün plazmit izolasyonları yapıldı. Elde edilen plazmitler 2 farklı kesim planı ile Bölüm 3.2.3.7’de anlatıldığı şekilde EcoRI ve ApaI/PstI restriksiyon enzimleri ile kesilerek istenilen bölgeyi içerip içermedikleri kontrol edildi. Kesimler 37 °C’de 1 gece inkübasyona bırakılarak gerçekleştirildi. Kesim süresi sonunda örnekler agaroz jelde yürütülerek kesim sonucu görüntülendi. Elde edilen sonuçlara göre kesimi yapılan 10 farklı koloniden 1, 3 ve 5 nolu kolonilerin rekombinant olduğu yani 1380bp’lik promotor parçasını içerdiği belirlendi (Şekil 4.5).



Şekil 4.5: Promotor bölgesinin pGEM-T Easy vektörüne klonlanmasının kontrol kesimleri jel görüntüsü.

M: Büyüklük belirteci (1kb), **1:** Koloni 1 EcorRI kesimi, **2:** Koloni 2 EcorRI kesimi, **3:** Koloni 3 EcorRI kesimi, **4:** Koloni 4 EcorRI kesimi, **5:** Koloni 5 EcorRI kesimi, **6:** Koloni 1 ApaI-PstI kesimi, **7:** Koloni 2 ApaI-PstI kesimi, **8:** Koloni 3 ApaI-PstI kesimi, **9:** Koloni 4 ApaI-PstI kesimi, **10:** Koloni 5 ApaI-PstI kesimi.

4.1.1 Dizi Analizi

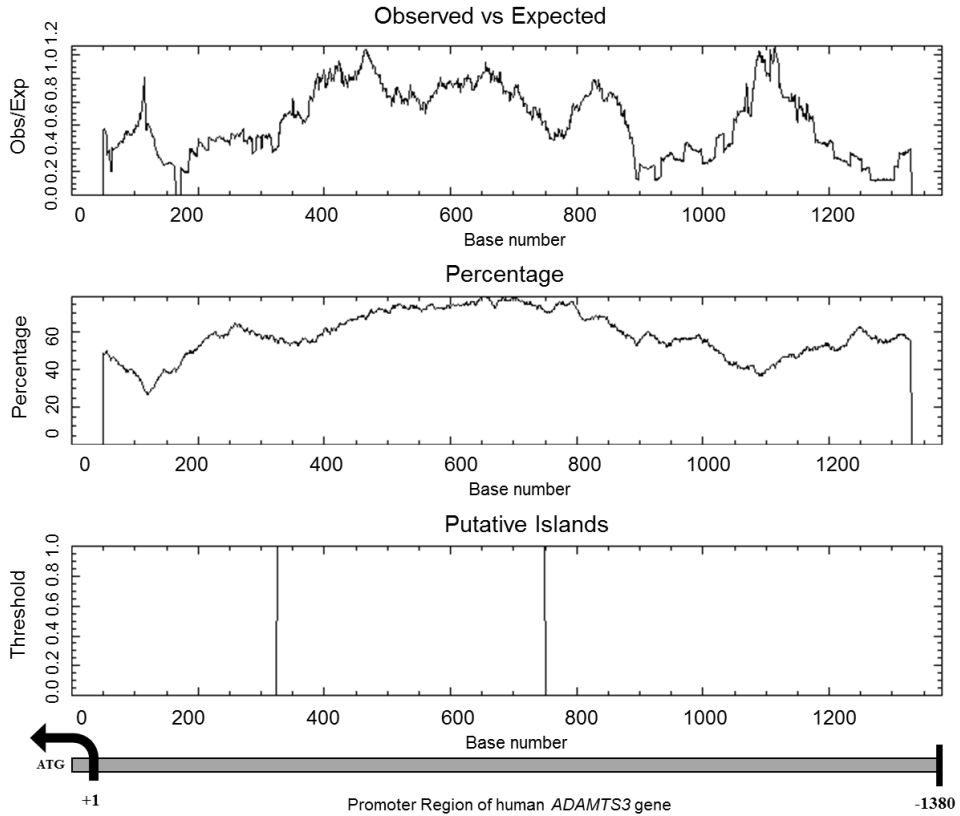
ADAMTS-3 promotor bölgesine ait 1380 bp’lik bölgeyi içeren plazmitin kontrol kesiminin ardından klonlamanın doğru şekilde gerçekleştiğinden emin olmak için REFGEN Biyoteknoloji’ye dizilemeye gönderildi. Dizileme sonuçları gen bankasında bulunan ve biyoinformatik olarak belirlenen muhtemel *ADAMTS-3* promotor bölgesi olan dizi ile karşılaştırıldı (Şekil 4.6). Bio-edit programı kullanılarak düzenlenen *ADAMTS-3* promotoruna ait son dizi Gen bankasına yüklendi (Geçici Erişim No: KX454214).

Sequences producing significant alignments:							
Select: All None Selected: 0							
Alignments Download GenBank Graphics Distance tool of results							
	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Genomic sequences							
<input type="checkbox"/>	Homo sapiens chromosome 4, alternate assembly HuRef	1916	1916	98%	0.0	97%	AC_000136.1
<input type="checkbox"/>	Homo sapiens chromosome 4, GRCh38 Primary Assembly	1916	1916	98%	0.0	97%	NC_000004.12
<input type="checkbox"/>	Homo sapiens chromosome 4, alternate assembly CHM1_1.1	1914	1914	98%	0.0	97%	NC_018915.2
Query	14 AATG-CCAGAGC-AACCCACCCCGCCCAAAATAAGTTTCTTTRAGAAAAAATGGA						71
Sbjct	69241514 AATGCCAGRGCARCCACCCCGCCCAAAATAAGTTTCTTTRAGAAAAA-GGA						69241572
Query	72 AAAGGAAAAAATGCGAAATAGAAAAAATGATCTTCTGTGCTTTGCTTCAATGAAAATG						131
Sbjct	69241573 AAAGGAAAAAATGCGAAATAGAAAAAATGATCTTCTGTGCTTTGCTTCAATGAAAATG						69241632
Query	132 AAATTTGAGCTCTGAGACTGGCCCCCTCTGCTCTGCAGTTTTTTTCCACTTCACCTTCTCA						191
Sbjct	69241633 AAATTTGAGCTCTGAGACTGGCCCCCTCTGCTCTGCAGTTTTTTTCCACTTCACCTTCTCA						69241692
Query	192 CCCCCTCCTCCCAACACAGAGTGTGCAGGAGCGAGAGGTGCTGTAAACGGGACAGGGCT						251
Sbjct	69241693 CCCCCTCCTCCCAACACAGAGTGTGCAGGAGCGAGAGGTGCTGTAAACGGGACAGGGCT						69241752
Query	252 AAGCTGGGAGAGGGGGAAGGACGAGGGGCTTTCCAATATCTCTGCCAAGCAGCTT						311
Sbjct	69241753 AAGCTGGGAGAGGGGGAAGGACGAGGGGCTTTCCAATATCTCTGCCAAGCAGCTT						69241812
Query	312 TTTCGAGGCTTTTCGAGCACCATTGGTCCCTAAGGTAGCGCGGAGATGCTTGGGTTC						371
Sbjct	69241813 TTTCGAGGCTTTTCGAGCACCATTGGTCCCTAAGGTAGCGCGGAGATGCTTGGGTTC						69241872
Query	372 CCGGAGCACAGCAGGGGAGTATTAGCGAGAGAGCAGCGAGCGGAGCGGGAGAGAAAG						431
Sbjct	69241873 CCGGAGCACAGCAGGGGAGTATTAGCGAGAGAGCAGCGAGCGGAGCGGGAGAGAAAG						69241932
Query	432 AGGAGGAGAGGGGCGACTCCCGCCACACGCAAGGTGGGGCGGGAGGAGCGAAGGGG						491
Sbjct	69241933 AGGAGGAGAGGGGCGACTCCCGCCACACGCAAGGTGGGGCGGGAGGAGCGAAGGGG						69241992
Query	492 AGGAGGAGAGGGGCGAGGAGGTGGGAGGAGTGGGCGCTCGCCGGCTCCTGTTGCT						551
Sbjct	69241993 AGGAGGAGAGGGGCGAGGAGGTGGGAGGAGTGGGCGCTCGCCGGCTCCTGTTGCT						69242052
Query	552 CGCAGCGCGGAGTCTGCTGGTCTGGCGACC CGCGGGGCGCTAATAAGGGGCGTCCG						611
Sbjct	69242053 CGCAGCGCGGAGTCTGCTGGTCTGGCGACC CGCGGGG-CGCTAATAA--GGCGTCCG						69242109
Query	612 GAGCTCCCCGACTGCCCTCCCCCGTGGCGCCACGTCATGCGGGGCGCGAACC						671
Sbjct	69242110 GAGCT-CCCCGACTGCCCT-CCCCCGTGGCGCCACGTCATGCGGGG-CCCGAR-CC						69242165
Query	672 CGCGCCCCCGCACCGTGTGAGATTGGAGACC GCTCGGGGGCGGGTGTGGCCCCGGG						731
Sbjct	69242166 CGCGCCCCCGCACCGTGTGAGATTGGAGACC GCTC-GGGGGCTGGTGTGG-CCCGGG						69242223
Query	732 TCGACTCCACCTGGAGCCTCTCTTCTCCGCTAGGGGCGAGAGAGGGGAGGGTCT						791
Sbjct	69242224 TCGACTCCACCTGGAGCCTCTCTTCTCCGCTA-GGGGAGAGAGGGGR-GGGTCT						69242281
Query	792 CAGGGGGCGCCACCGGTCCCGACTGGGCGGACGCGCGGTGAGTTAATTATAGGGAAG						851
Sbjct	69242282 CAGGGG-CG-CCACCGGTCCCGACTGG-CGGGACGCG-CGTTGAGTTAATTATA-GGAAG						69242336
Query	852 GGGGAGGGTCCGAAGGGCTGGTCTGGGGTGTAGGAAATTCACCTCTCCACCTCCAC						911
Sbjct	69242337 GGGGAGGGTCCG-AGGGCTGGTCT-GGGCTGTAGGAAATTCACCTCTCCACCTCCAC						69242394
Query	912 TGGTTCGCCAGCCAGAAATCTCCCGAAGAGAACCTTGAACCTCCAGATCTTAAC						971
Sbjct	69242395 T-GTTCTCCAGCCAGAAATCTCCCGAAGAGAACCTTGAACCTCCAGATCTTAAC						69242453
Query	972 CAGCGGTGATCTCCCTTCCAGGCACAGTCCCTCCACGTTTTGGCAGGGGGTGTCT						1031
Sbjct	69242454 CAGCGGTGATCTCCCTTCCAGGCACAGTCCCTCCACGTTTTGGCAGGGGGTGTCT						69242513
Query	1032 TCCTTGAAGCTCTTGGTAAAGTTTATCCGTTATATTAGTTTTAAAGATACCACGTC						1091
Sbjct	69242514 TCCTTGAAGCTCTTGGTAAAGTTTATCCGTTATATTAGTTTTAAAGATACCACGTC						69242573
Query	1092 CTTTCCTTGACTCACCAGGATGCTTCGGTTTATCCCTAAGTAC-CAGGGCTCAGCGACT						1150
Sbjct	69242574 CTTTCCTTGACTCACCAGGATGCTTCGGTTTATCACTAGAGTACACAGGCTCAGCGACT						69242633
Query	1151 CTTCCTCA-ACCCAGAT 1166						
Sbjct	69242634 CTTCCTCACCCAGAT 69242650						

Şekil 4.6: pGEM-T Easy vektörüne ligasyonu yapılan 1380 bç'lik *ADAMTS-3* promotor bölgesinin dizileme sonuçlarının gen bankasındaki dizi ile karşılaştırılması.

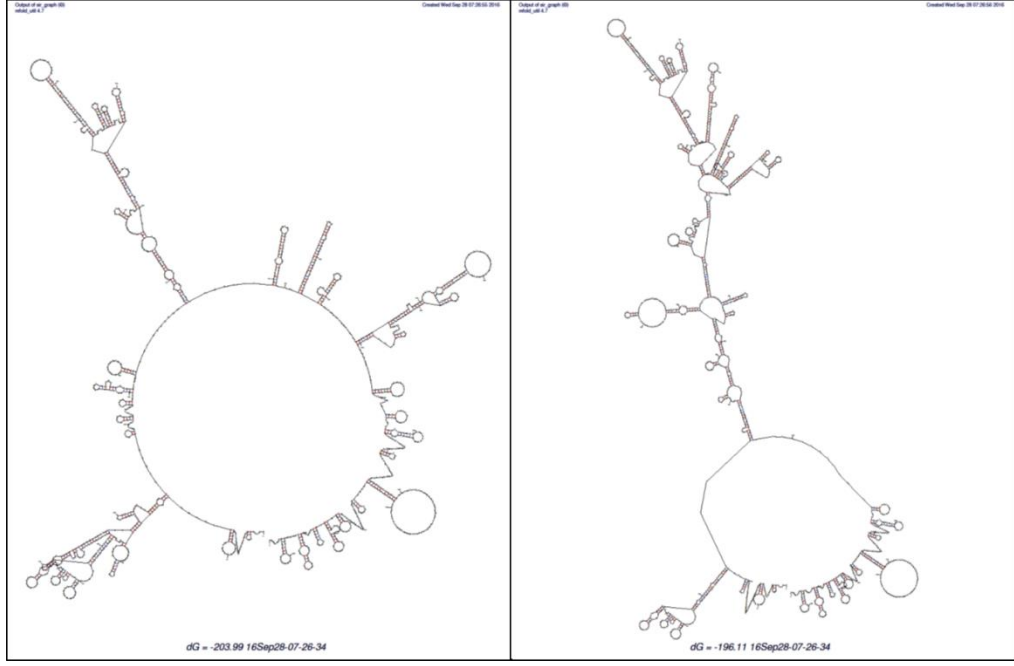
4.2 ADAMTS-3 Promotorunun Biyoinformatik Analizi

Bölgenin GC baz içeriği web tabanlı programlar (Emboss) kullanılarak analiz edildiğinde translasyon başlangıç kodonundan itibaren (-326)-(-750)'inci bazlar arası CpG adası oluşması muhtemeldir. Klonlanması planlanan dizinin ortalama %GC içeriği % 50'dir (Şekil 4.7).



Şekil 4.7: ADAMTS-3 promotoru CpG adası ve % GC analizi.

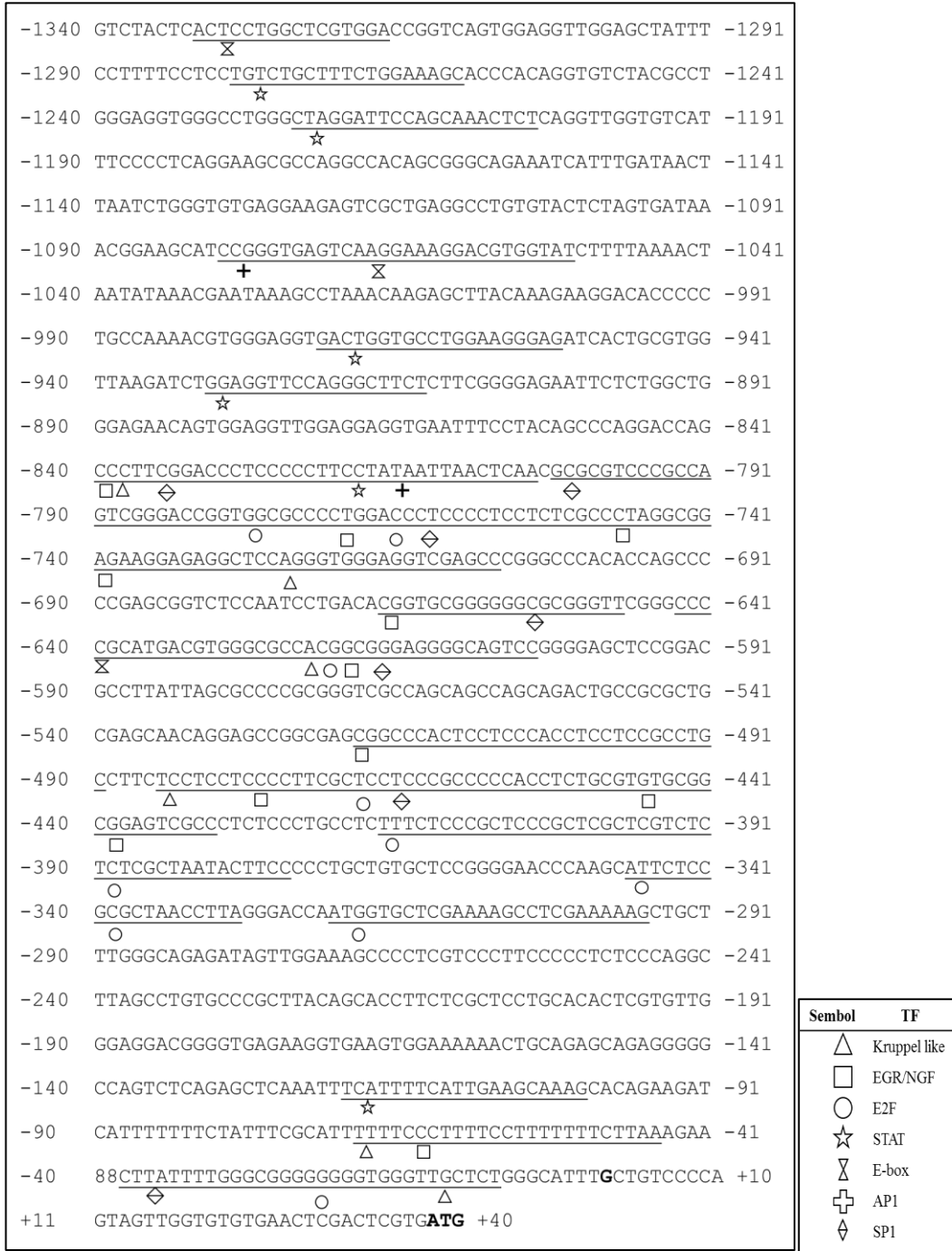
Promotor bölgesine ait sekonder yapı oluşumları web tabanlı program mFold (<http://unafold.rna.albany.edu/?q=mfold/DNA-Folding-Form>) kullanılarak belirlendi. Programda elde edilen sonuçlara göre 14 adet sekonder yapı oluşumu belirlendi. Bu sekonder yapılarla dair maksimum ve minimum ΔG değerleri -203.99 kcal/mol ve -196.11 kcal/mol. Şekil 4.8'de gösterildi.



Şekil 4.8: *ADAMTS-3* promotor bölgesi sekonder yapı oluşumları maksimum ve minimum ΔG değerleri belirtilmiştir.

4.2.1 1380 bç *ADAMTS-3* promotoru transkripsiyon bölgeleri bağlanma analizi

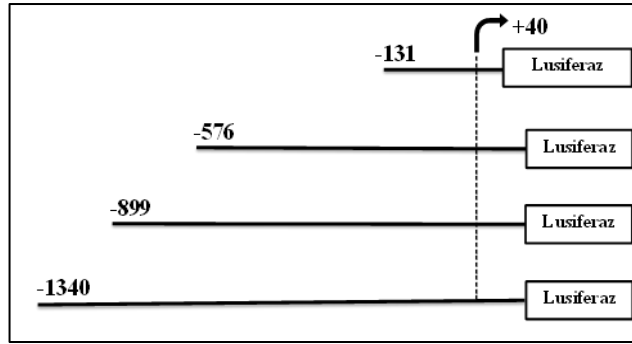
Klonlanan *ADAMTS-3* promotor dizisi, ATG bölgesi ve transkripsiyonun başlangıç bölgesi (+1) Şekil 4.9’da gösterildi. Yapılan biyoinformatik analizler sonucu *ADAMTS-3* promotorunun TATA kutusu içermediği belirlendi. Ayrıca promotor üzerinde olası transkripsiyon faktörü bağlanma bölgeleri Mathinspector programı ile belirlendi. İnsan *ADAMTS-3* promotor bölgesinde birçok transkripsiyon faktörü bağlanma motifinin oldukça yoğun olarak bulunduğu gözlemlendi (Şekil 4.9).



Şekil 4.9: ADAMTS-3 promotör bölgesi üzerindeki muhtemel transkripsiyon faktörü bağlanma bölgelerinin dizi üzerinde gösterimi.

4.3 Çeşitli Büyüklüklerdeki *ADAMTS-3* Promotor Parçalarının Oluşturulması

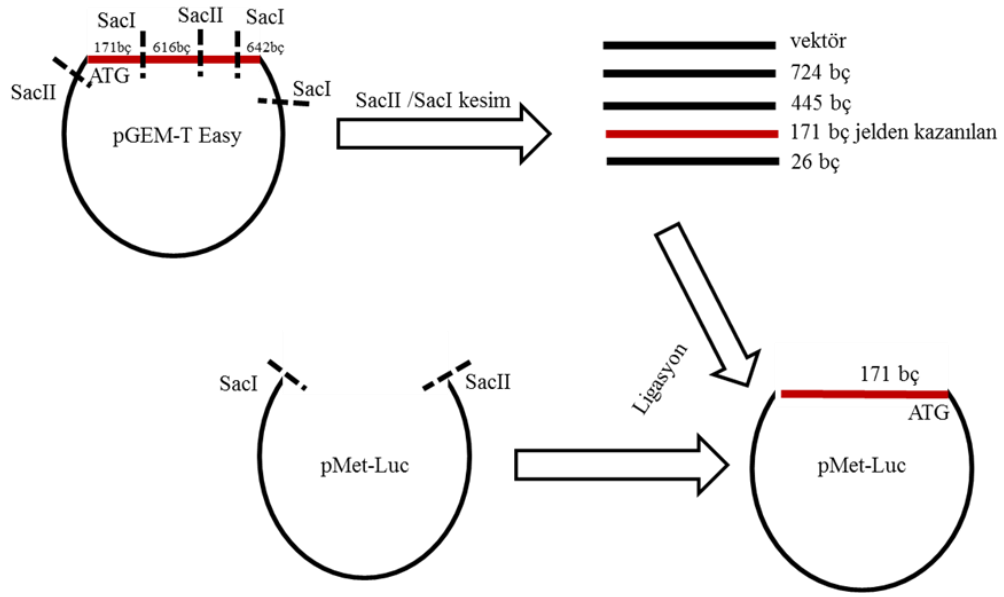
Transfeksiyon analizlerinde bazal aktivitenin belirlenmesi amacıyla kullanılacak 4 adet promotor parçası oluşturulması planlandı. Bu promotor parçaları klonlandıktan sonra büyük ölçekli plazmit izolasyonları yapıldı. Transfeksiyonlarda kullanılmadan önce restriksiyon enzimleri kullanılarak kontrolleri yeniden yapıldı. Promotor parçalarının şematize edilmiş hali Şekil 4.10'da gösterildi.



Şekil 4.10: Oluşturulması planlanan *ADAMTS-3* promotor parçalarının şematik görüntüsü.

4.3.1 TS3[-131/+40] Konstrakt İçin Alt Klonlama Çalışmaları

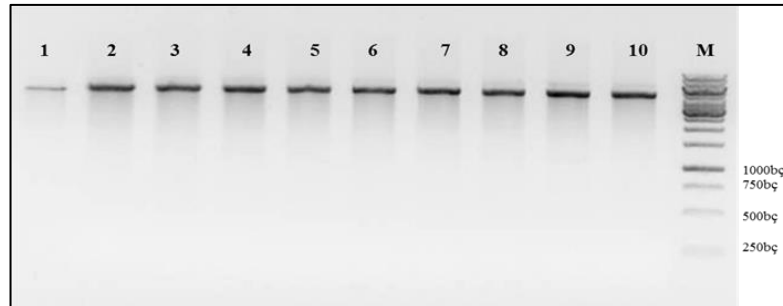
171 bç'lik konstraktın oluşturulması için öncelikle uygun kesim bölgeleri belirlendi, kesim ve ligasyon planları oluşturuldu. Şekil 4.11'de klonlama planı şematik olarak özetlenmiştir.



Şekil 4.11: TS3[-131/+40] konstrakt klonlama planı

4.3.1.1 TS3[-131/+40] Konstrakt için pMet Luc vektörünün hazırlanması

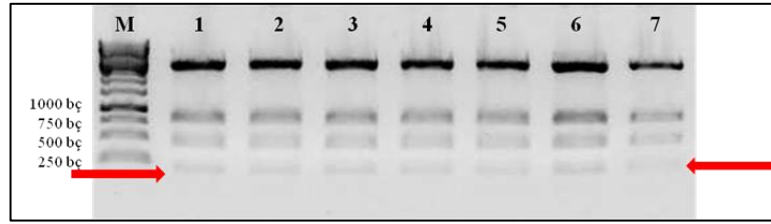
Alt klonlama çalışmaları için pMet Luc vektörünün gliserol stoktan sıvı besiyerine ekimi yapıldı. 1 gece 37 °C’de kültür büyütüldükten sonra Bölüm 3.2.2.6’da anlatıldığı gibi plazmit mini prep izolasyonu yapıldı. İzolasyon sonucu pMet Luc konsantrasyonu belirlendi. pMet Luc vektörü Bölüm 3.2.3.7’de anlatıldığı gibi SacI ve SacII enzimleriyle kesildi. Kesim süresi sonunda örnekler agaroz jelde yürütüldü (Şekil 4.12) Kesim sonrası oluşan bantlar jelden geri kazanıldı.



Şekil 4.12: Alt klonlama için kullanılan ve linearize olmuş pMet-Luc vektör kesimi agaroz jel görüntüsü. **1-10:** pMet luc vektörü, **M:** Büyüklük Belirteci

4.3.1.2 TS3[-131/+40] Konstrakt için insert hazırlanması

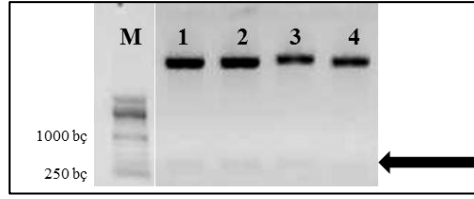
pMet Luc vektörüne klonlanabilmesi için aynı kesim bölgelerine sahip insert oluşturulması amacıyla 1366 bç'lik promotor parçasını içeren pGEM-T Easy vektörü SacI ve SacII enzimleri ile kesildi (Bölüm 3.2.3.7). Kesimler 37°C'de 1 gece inkübasyona bırakıldı. Kesimler jelde yürütüldükten sonra (Şekil 4.13) jelden geri kazanılarak ligasyon için hazırlandı.



Şekil 4.13: pGEM-T Easy vektörü SacI ve SacII kesimi agaroz jel görüntüsü.
M: Büyüklük Belirteci, **1-7:** pGEM-T Easy vektörü

4.3.1.3 TS3 [-131/+40] Konstrakt İçin Ligasyon

Oluşturulan 171 bç'lik promotor parçası ve SacI-SacII enzimleri ile kesilerek oluşturulan pMet-Luc vektörü Bölüm 3.2.3.6'da anlatıldığı şekilde +4 °C'de 1 gece ligasyona bırakıldı. Ligasyon sonrası Bölüm 3.2.2.5'de anlatıldığı şekilde transformasyon gerçekleştirildi. Transformasyonda oluşan koloniler sıvı kulture ekildi. 1 gece 37°C'de inkübasyondan sonra mini plazmit izolasyonu yapıldı. Plazmit konsantrasyonları belirlendikten sonra klonlamanın gerçekleşip gerçekleşmediğinin belirlenmesi için SacI ve SacII enzimleri kullanılarak Bölüm 3.2.3.7'de anlatıldığı şekilde kontrol kesimleri kuruldu. Kontrol kesimleri sonucunda Koloni 1 ve Koloni 2 için 171bç'lik bölgede bantlar gözlemlendi (Şekil 4.14). Klonlanan 171 bç'lik promotor bölgesini içeren Koloni 1 ve 2'nin gliserol stokları daha sonra maxi prep yapılmak üzere -80°C dolaba kaldırdı.

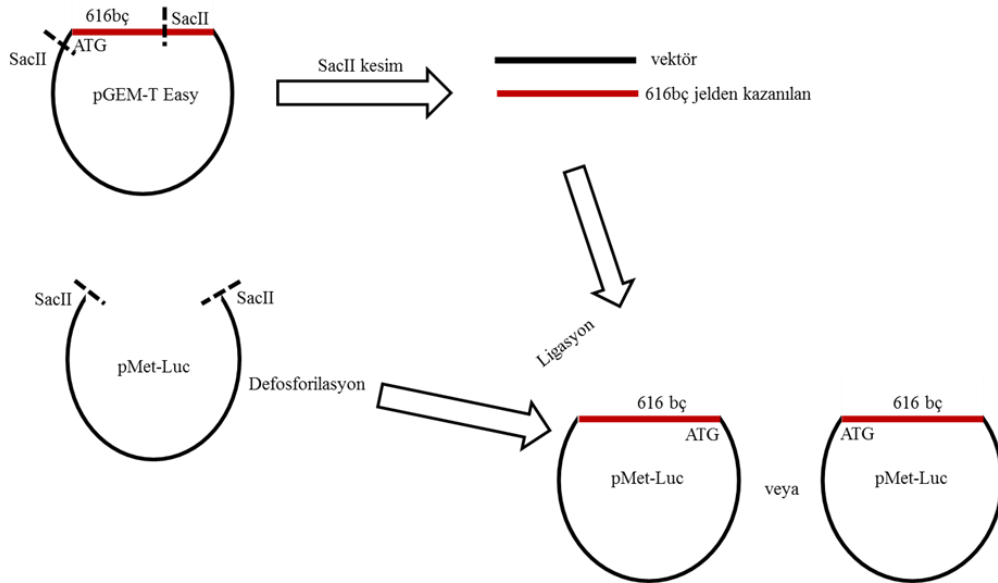


Şekil 4.14: TS3[-131/+40] konstrakt kontrol kesimi agaroz jel görüntüsü.

M: Büyüklük Belirteci, **1-2:** 171 bç+pMet Luc vektörü koloni 1, **3-4:** 171 bç+pMet Luc vektörü koloni 2.

4.3.2 TS3 [-576/+40] Konstrakt İçin Alt Klonlama Çalışmaları

616 bç'lik konstraktın oluşturulması için öncelikle uygun kesim bölgeleri belirlendi, kesim ve ligasyon planları oluşturuldu. Şekil 4.15'de klonlama planı şematik olarak özetlenmiştir.

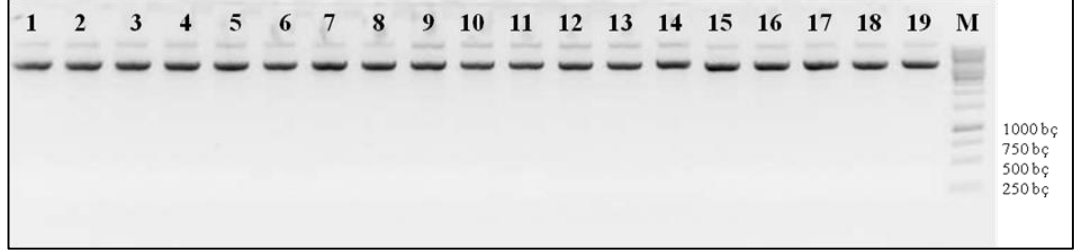


Şekil 4.15: TS3[-576/+40] konstrakt klonlama planı

4.3.2.1 TS3 [-576/+40] Konstrakt için pMet Luc vektörünün hazırlanması

Alt klonlama çalışmaları için pMet Luc vektörü gliserol stoktan sıvı besiyerine ekimi yapıldı. 1 gece 37°C'de kültür büyütüldükten sonra Bölüm 3.2.2.6'da anlatıldığı gibi plazmit mini prep izolasyonu yapıldı. İzolasyon sonucu pMet Luc konsantrasyonu

belirlendi. pMet Luc vektörü SacII enzimiyle Bölüm 3.2.3.7’de anlatıldığı şekilde kesildi. Kesimler 37°C’de 1 gece inkübasyon ile gerçekleşti. Kesimler agaroz jelde yürütüldü (Şekil 4.16).

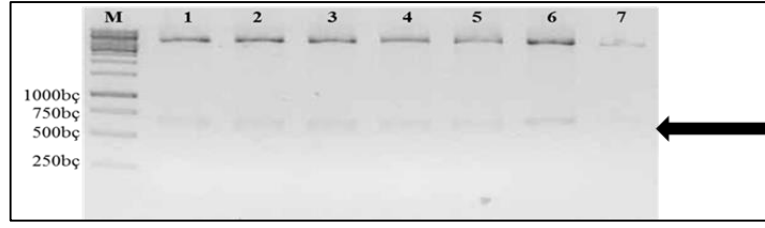


Şekil 4.16: Alt klonlama için kullanılan ve linearize olmuş pMet-Luc vektör kesimi agaroz jel görüntüsü. **1-19:** pMet luc vektörü, **M:** Büyüklük Belirteci

Jelden geri kazanılan pMet Luc SacII kesim ürünleri Bölüm 3.2.3.8’de anlatıldığı gibi defosforilizasyona tabi tutuldu. Tek enzim kesimi yapılarak lineer hale getirilen plazmit DNA’nın ligasyon sırasında kendi üzerine bağlanmasını engellemek amacıyla her iki 5’ ucunda bulunan fosfatların defosforilizasyonla uzaklaştırılması gerekmektedir. Defosforilizasyon sonrası agaroz jel elektroforezinde yürütüldü. Defosforilasyon sonrası jelde yürütülen vektör jelden geri kazanıldı.

4.3.2.2 TS3 [-576/+40] Konstrakt için insert hazırlanması

pMet Luc vektörüne klonlanabilmesi için aynı kesim bölgelerine sahip 616 bç’lik parça oluşturuldu. 616 bç’lik promotor parçasının oluşturulması için 1366 bç’lik promotor parçasını içeren pGEM-T Easy vektörü Sac II enzimi ile Bölüm 3.2.3.7’de anlatılan kesim stratejisine göre kesildi. Kesimler 37°C’de 1 gece inkübasyona bırakıldı. Kesimler Şekil 4.17’de gösterildiği gibi jelde yürütüldükten sonra jelden geri kazanılarak ligasyon için hazırlandı.



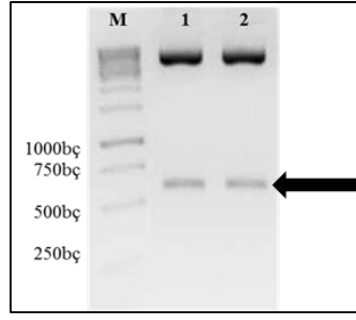
Şekil 4.17: pGEM-T Easy vektörü SacII kesimi agaroz jel görüntüsü.

M: Büyüklük Belirteci, **1-7:** pGEM-T Easy vektörü

4.3.2.3 TS3 [-576/+40] Konstrakt İçin Ligasyon

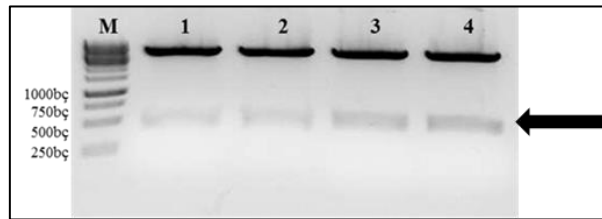
Oluşturulan 616 bç'lik promotor parçası ve SacII enzimi ile kesilerek defosforilasyon uygulanan pMet Luc vektörleri ligasyona bırakıldı. Aynı zamanda ligasyon kontrol amaçlı olarak sadece pMet Luc vektörü kullanılarak da ayrı bir tüpte gerçekleştirildi. Burada amaç defosforilasyonun gerçekleşip gerçekleşmediğini kontrol etmektir. Defosforilasyon gerçekleşmediyse 616 bç'lik parçayı içermeyen yalancı koloniler oluşacaktır. Ligasyon koşulları Bölüm 3.2.3.6'da anlatıldığı +4 °C'de 1 gece inkübasyona bırakılarak gerçekleştirildi.

Ligasyon sonrası Bölüm 3.2.2.5'de anlatıldığı şekilde transformasyon gerçekleştirildi. Transformasyonda oluşan koloniler sıvı kültüre ekildi. 1 gece 37°C'de inkübasyondan sonra mini plazmit izolasyonu yapıldı. Plazmit konsantrasyonları belirlendikten sonra klonlamanın gerçekleşip gerçekleşmediğinin belirlenmesi için SacII enzimi ile Bölüm 3.2.3.7'de anlatıldığı gibi kontrol kesimleri kuruldu. Kesimler agaroz jelde yürütüldü (Şekil 4.18).



Şekil 4.18: TS3[-576/+40] konstrakt kontrol kesimi agaroz jel görüntüsü. **M:** Büyüklük Belirteci, **1-2:** 616 bç + pMet Luc vektörü

TS3 [-576/+40] konstraktın klonlandığı görüldükten sonra doğru oryantasyonda olup olmadığının kontrolü için kesim yapıldı. PstI ve SacI ile gerçekleştirilen kesimler sonucunda sırasıyla 419 bç ve 430 bç hizasında bant gözlemlendiği takdirde oryantasyonun doğru yönde olduğu sonucuna varılması beklendi. Bu amaçla kesimler hazırlanarak 37°C’de 2 saat inkübasyona bırakıldı. Kesim koşulları Bölüm 3.2.3.7’de anlatıldığı şekilde yapıldı. Kesimler inkübasyon sonrası agaroz jel elektroforezinde yürütüldü (Şekil 4.19). Her iki kesim için 400 bç civarında bant gözlemlendi. Bu kesim 616 bç’lik konstrakt klonlamasının doğru oryantasyonda gerçekleştiğini göstermiştir.



Şekil 4.19: TS3 [-576/+40] klonlama için oryantasyon kontrol kesimi agaroz jel görüntüsü

M: Büyüklük Belirteci, **1-2:** PstI kesimi, **3-4:** SacI kesimi.

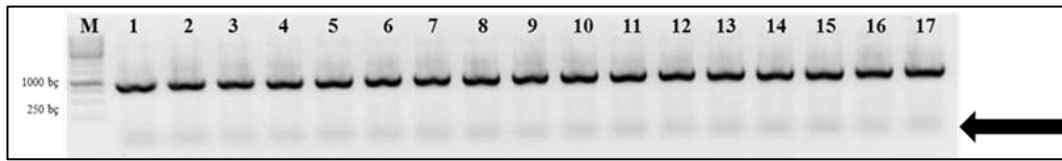
4.3.3 TS3[-899/+40] Konstrakt İçin Alt Klonlama Çalışmaları

TS3 [-899/+40] konstraktın oluşturulması için öncelikle uygun kesim bölgeleri belirlenmesi amacıyla *ADAMTS-3* genine ait kesim haritası oluşturuldu (bkz Ek-D). Geni kesmeyen, vektörü kesen enzimler belirlenerek kesim bölgeleri içeren primerler dizayn edildi. Belirlenen HindIII (AAGCTT) ve XhoI (CTCGAG) enzim tanıma dizileri primerlerin uçlarına eklenerek dizayn edildi (Tablo 4.3).

Tablo 4.3: TS3 [-899/+40] konstraktın klonlanması için dizayn edilen kesim bölgesi içeren primerler.

Primer	Primer dizisi	Tm
<i>ADAMTS-3</i> _pro_F	<u>AAGCTT</u> CAATCACGAGTCGAGTTCAC	70 °C
<i>ADAMTS-3</i> _pro_939_R	<u>CTCGAG</u> CTCTGGCTGGGAGAACAG	78 °C

Dizayn edilen bu primerler kullanılarak 1366 bç'lik muhtemel diziyi içeren pGEM T Easy plazmiti kalıp kullanılarak Bölüm 3.2.3.3'de anlatıldığı şekilde PCR reaksiyonu gerçekleştirildi. PCR sonucu Bölüm 3.2.3.4'de anlatıldığı gibi agaroz jelde yürütüldü (Şekil 4.20) ve oluşan bantlar Bölüm 3.2.3.5'de anlatıldığı gibi jelden geri kazanıldı.

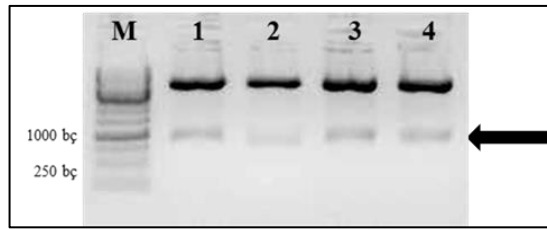


Şekil 4.20: 939 bç'lik PCR ürününe ait agaroz jel görüntüsü.

M: Büyüklük Belirteci, **1-21:** *ADAMTS-3* muhtemel promotor bölgesini içeren pGEM-T Easy vektörü, **22:** (+) kontrol, **23:** (-) kontrol.

Jelden kazandığımız 939 bç'lik promotor parçaları, Bölüm 3.2.3.6'da anlatıldığı şekilde pGEM-T Easy vektörü ile ligasyona bırakıldı. Ligasyonlar 1 gece sonra Bölüm 3.2.2.5'de anlatıldığı şekilde transforme edildi ve transformasyondan sonra petride oluşan kolonilerin sıvı besiyerine ekimi yapılarak ertesi gün plazmit izolasyonu yapıldı.

Bölüm 3.2.3.2’de anlatıldığı şekilde spektrofotometrik olarak konsantrasyonları belirlenen plazmitlerin *HindIII* ve *XhoI* enzimleri ile kesimleri yapılarak içerdikleri 939 bp’lik gen parçasının elde edilmesi sağlandı ve bu parça yine *HindIII* ve *XhoI* enzimleri ile kesilmiş olan pMet Luc vektörüne ligasyonu gerçekleştirildi. Ligasyonlar ertesi gün *XL-1 blue* kompetant hücrelerine transforme edildi. Transformasyon sonucu oluşan kolonilerin sıvı besiyerine ekimi yapıldı. 1 gece 37°C’de inkübasyona bırakılan kültürlerin plazmit izolasyonu yapıldıktan sonra kontrol kesimleri gerçekleştirildi. Kesimler jelde yürütülerek (Şekil 4.21) klonlamamın gerçekleştiği belirlendi.



Şekil 4.21: TS3 [-899/+40] konstrakt için kontrol kesim sonucu.

M: Büyüklük Belirteci, **1:** 1. Koloni, **2:** 2.Koloni, **3:** 3. Koloni, **4:** 4. Koloni.

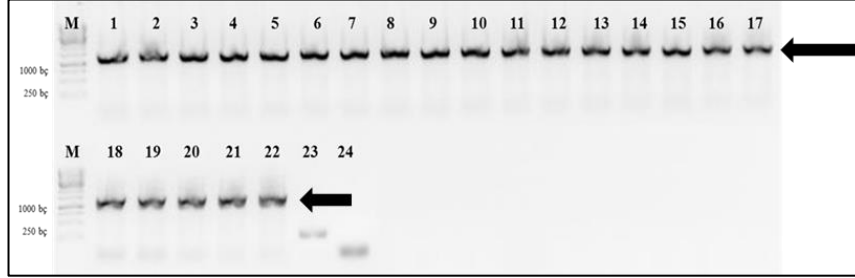
4.3.4 TS3 [-1340/+40] Konstrakt İçin Alt Klonlama Çalışmaları

TS3[-1340/+40] konstraktın oluşturulması için öncelikle uygun kesim bölgeleri belirlenmesi amacıyla *ADAMTS-3* genine ait kesim haritası oluşturuldu (bkz Ek-D). Geni kesmeyen, vektörü kesen enzimler belirlenerek kesim bölgeleri içeren primerler dizayn edildi. Belirlenen *HindIII* (AAGCTT) ve *XhoI* (CTCGAG) enzim tanıma dizileri primerlerin uçlarına eklenerek dizayn edildi (Tablo 4.4).

Tablo 4.4: TS3 [-1340/+40] konstraktın klonlanması için dizayn edilen kesim bölgesi içeren primerler.

Primer	Primer dizisi	Tm
<i>ADAMTS-3_pro_Forward</i>	<u>AAGCTT</u> CAATCACGAGTCGAGTTCAC	70 °C
<i>ADAMTS-3_pro_1380_Reverse</i>	CTCGAG <u>GTCTACTCACTCCTGGC</u>	68.2 °C

Dizayn edilen bu primerler kullanılarak ve 1366 bç'lik muhtemel diziyi içeren pGem T Easy plazmiti kalıp kullanılarak Bölüm 3.2.3.3'de anlatıldığı şekilde PCR reaksiyonu gerçekleştirildi. PCR sonucu Bölüm 3.2.3.4'de anlatıldığı gibi agaroz jelde yürütüldü (Şekil 4.22) ve oluşan bantlar Bölüm 3.2.3.5'de anlatıldığı gibi jelden geri kazanıldı.

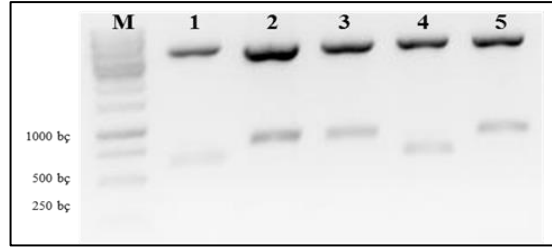


Şekil 4.22: TS3 [-1340/+40] PCR sonucu agaroz jel görüntüsü.

M: Büyüklük Belirteci, **1-22:** *ADAMTS-3* muhtemel promotor bölgesini içeren pGEM-T Easy vektörü, **23:** (+) kontrol, **24:** (-) kontrol.

Jelden kazandığımız TS3 [-1340/+40] promotor parçaları, Bölüm 3.2.3.6'da anlatıldığı şekilde pGEM-T Easy vektörü ile ligasyona bırakıldı. Ligasyonlar +4°C'de 1 gece inkübasyona bırakıldıktan sonra Bölüm 3.2.2.5'de anlatıldığı şekilde kompetant hücrelere transforme edildi ve transformasyondan sonra petride oluşan kolonilerin sıvı besiyerine ekimi yapılarak ertesi gün plazmit izolasyonu yapıldı.

Bölüm 3.2.3.2'de anlatıldığı şekilde spektrofotometrik olarak konsantrasyonları belirlenen plazmitlerin, *HindIII* ve *XhoI* enzimleri ile kesimleri yapılarak içerdikleri 1380 bç gen parçasının elde edilmesi sağlandı ve bu parçanın yine *HindIII* ve *XhoI* enzimleri ile kesilmiş olan pMet Luc haberci vektörüne ligasyonu gerçekleştirildi. Ligasyonlar ertesi gün *XL-1 blue* kompetant hücrelerine tranforme edildi. Transformasyon sonucu oluşan kolonilerin sıvı besiyerine ekimi yapıldı. 1 gece 37°C'de inkübasyonu yapılan kültürün küçük ölçekli plazmit izolasyonu sonrası kontrol kesimleri gerçekleştirildi. *SacII* enzimi ile gerçekleştirilen kontrol kesimleri neticesinde yaklaşık 616 bç'lik bant gözlenmesi bekleniyordu. Kesimler jelde yürütülerek (Şekil 4.23) 1. ve 4. kolonilerde klonlamanın gerçekleştiği tespit edildi.



Şekil 4.23: TS3[-1340/+40] konstrakt için *SacII* kontrol kesim sonucu.

M: Büyüklük Belirteci, **1:** 1. Koloni, **2:** 2.Koloni, **3:** 3. Koloni, **4:** 4. Koloni, **5:** 5. Koloni

4.4 Farklı Hücre Hatlarında *ADAMTS-3* Ekspresyon Çalışmaları

4.4.1 Farklı Hücre Hatlarında mRNA Düzeyinde *ADAMTS-3* Ekspresyon Çalışmaları

ADAMTS-3 geninin farklı hücre hatlarında mRNA düzeyinde ekspresyonunun belirlenmesi amacıyla Bölüm 3.2.4.4' de anlatıldığı şekilde hücreler büyütülerek, Bölüm 3.2.6.1' de anlatıldığı şekilde kit prosedürü uygulanarak hücrelerden RNA izolasyonu yapıldı. Her hücre hattı için 1 µg RNA olacak şekilde cDNA sentezi Bölüm 3.2.6.4' de anlatıldığı şekilde yapıldı. Sentezlenen cDNA'lar kullanılarak Bölüm 3.2.3.3' de anlatıldığı şekilde RT-PCR uygulamaları yapıldı. RT-PCR'da kullanılan *ADAMTS-3* ekspresyon primerleri ve insan beta 2 primerleri Tablo 4.5' de verilmiştir. Sonuçlar Bölüm 3.2.3.4' de anlatıldığı şekilde agaroz jelde yürütülerek (Şekil 4.24) densitometrik analizleri yapıldı.

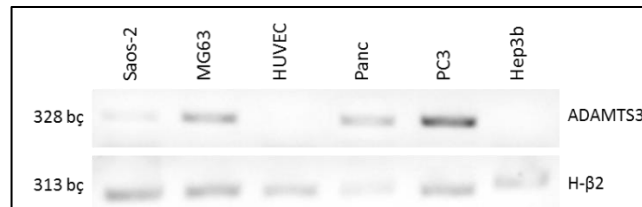
Tablo 4.5: Ekspresyon çalışmalarında kullanılan primerler.

Primer	Dizisi	Sıcaklık
<i>ADAMTS-3_Exp_F</i>	GGAACACTGCACCAAAACCT	56°C
<i>ADAMTS-3_Exp_R</i>	TGTCTCCCAAACATGGTTCA	54.1°C
<i>hSP1_Exp_F</i>	AAACATATCAAAGACCCACCAGAAT	68°C
<i>hSP1_Exp_R</i>	ATATTGGTGGTAATAAGGGCTGAA	66°C
<i>hC/EBPα_Exp_F</i>	GCCAAGAAGTCGGTGGATAAGAAC	72°C

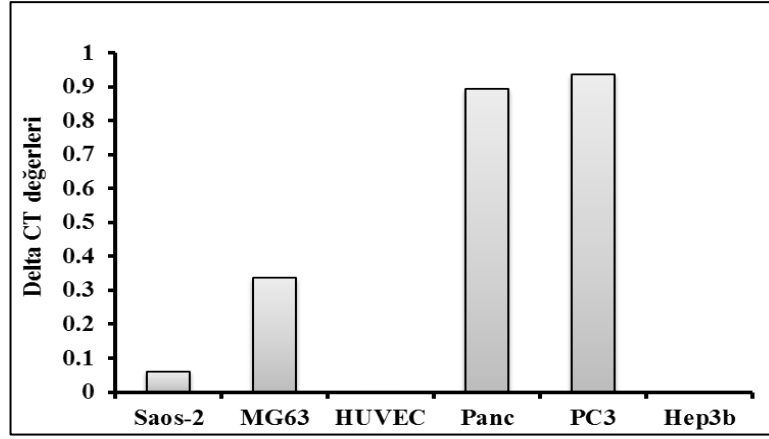
Tablo 4.5 (devamı): Ekspresyon çalışmalarında kullanılan primerleri

hC/EBPα_Exp_R	CGGTCATTGTCACCTGGTCAACTCC	77°C
hUSF_Exp_F	ACGTCTTCCGAACTGAGAATGG	66°C
hUSF_Exp_R	GGTGAAAGCTCCCTGGATCA	62°C
hCol1A1_F	CTAGACATGTTTCAGCTTTGTG	60°C
hCol1A1_R	GTTGTTCGCAGACGCAGATCCG	68°C
h COL2A1_F	TCGGAGAGTGCTGCCCATCT	68°C
h COL2A1_R	GGCAGCAAAGTTTCCACCAAGA	66°C
hCol3A1_F	AGCTGGCTACTTCTCGCTCTG	66°C
hCol3A1_R	GTTCTGAGGACCAGTAGGGCA	66°C
Beta Aktin F	TCCCTGGAGAAGAGCTACGA	50°C
Beta Aktin R	AAGAAAGGGTGTAACGCAAC	50°C

Elde edilen sonuçlar yorumlandığında mRNA düzeyinde en yüksek *ADAMTS-3* ekspresyonunun PC3 ve Panc hücrelerinde olduğu görüldü. En düşük ekspresyon seviyesi HUVEC hücrelerinde gözlenirken, Hep3B hücrelerinde ekspresyon gözlenmedi. Tez modeli olan Saos-2 hücrelerinde ve yan model olan MG63 hücrelerinde de *ADAMTS-3* ekspresyonu olduğu belirlendi (Şekil 4.25).



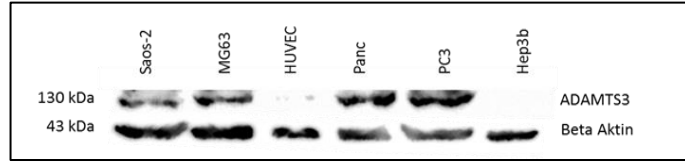
Şekil 4.24: Farklı hücre hatlarında mRNA düzeyinde *ADAMTS-3* ekspresyonunun belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilen RT-PCR sonucu agaroz jel görüntüleri.



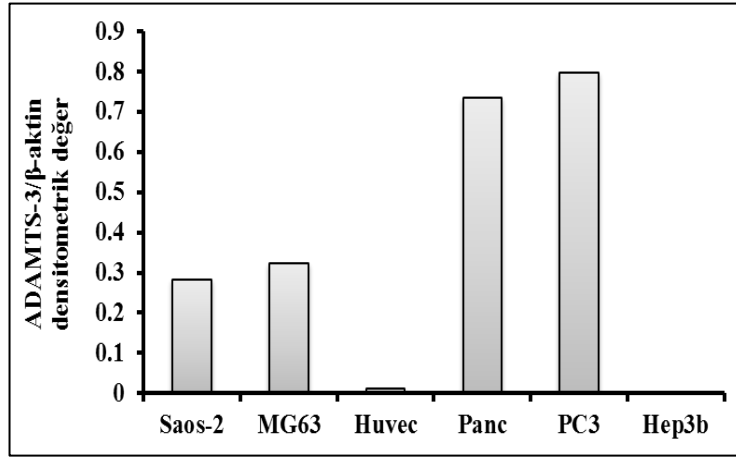
Şekil 4.25: Farklı hücre hatlarında mRNA düzeyinde *ADAMTS-3* ekspresyon seviyeleri.

4.4.2 Farklı Hücre Hatlarında Protein Düzeyinde *ADAMTS-3* Ekspresyon Çalışmaları

ADAMTS-3 geninin protein düzeyinde ekspresyonunun belirlenmesi amacıyla Bölüm 3.2.4.4’de anlatıldığı şekilde hücreler büyütülerek, Bölüm 3.2.7.1’de anlatıldığı şekilde RIPA solüsyonu kullanılarak hücrelerden elde edilen proteinler 50 µg konsantrasyonda olacak şekilde SDS-PAGE jelinde yürütüldü ve daha sonra 1 gece +4°C’de 15V’da membrana transfer edildi. Proteinlerin *ADAMTS-3* antikoruna ile işaretlenebilmesi için membran 2 µg/ml *ADAMTS-3* antikoruna ile 1 gece +4°C’de inkübasyona bırakıldı. Ertesi gün membran yıkanarak oda sıcaklığında, 1 saat, 1:5000 oranında sekonder antikora (anti-rabbit) tabi tutuldu. Oluşan bantların ECL çözeltisi kullanılarak görünür hale gelmesi sağlandı ve görüntüleme cihazı ile fotoğrafları çekildi (Şekil 4.26). Proteinlerin densitometrik değerlendirmeleri yapılarak *ADAMTS-3* protein ekspresyonu belirlendi. Sonuçların mRNA değerleri ile tutarlı olduğu görüldü. En yüksek *ADAMTS-3* ekspresyonunun PC3 ve Panc hücrelerinde olduğu görüldü. En düşük ekspresyon seviyesi yine HUVEC hücrelerinde gözlenirken, Hep3B hücrelerinde protein düzeyinde ekspresyon gözlenmedi. Tez modeli olan Saos-2 ve MG63 hücrelerinde protein düzeyinde *ADAMTS-3* ekspresyonu gözlemlendi (Şekil 4.27).



Şekil 4.26: Farklı hücre hatlarındaki *ADAMTS-3* ekspresyon analizi bant görüntüleri



Şekil 4.27: Farklı hücre hatlarında protein düzeyinde *ADAMTS-3* ekspresyon seviyeleri

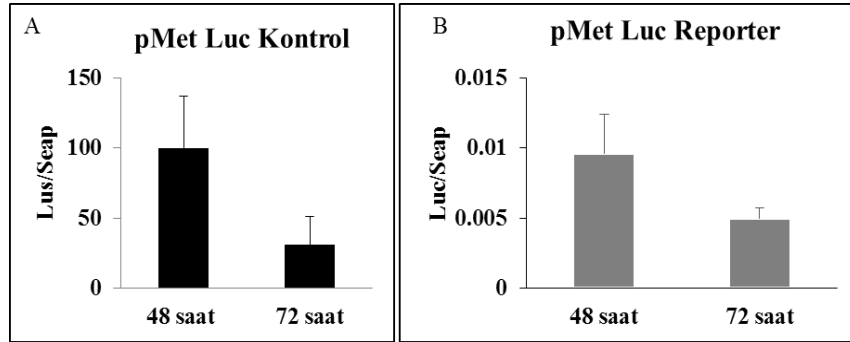
4.5 İnsan *ADAMTS-3* Genine Ait Promotorun Fonksiyonel Analizi

4.5.1 İnsan *ADAMTS-3* Promotor Konstraktlarının Büyük Ölçekli (Maxi Prep) Plazmit DNA İzolasyonu

ADAMTS-3 promotorundan kısaltılarak oluşturulmuş 4 farklı promotor parçası TS3[-131/+40], TS3[-576/+40], TS3[-899/+40], TS3[-1340/+40]'un büyük ölçekli plazmit DNA izolasyonu Bölüm 3.2.2.7'de anlaşıldığı şekile kit prosedürüne göre gerçekleştirildi. İzolasyon sonrası çoğaltılan her bir plazmitin Bölüm 3.2.3.4'te anlatıldığı şekilde DNA jel elektroforezinde yürütülerek kontrolleri gerçekleştirildi.

4.5.2 Kalsiyum Fosfat Geçi Transfeksiyonunun Salınan Lusiferaz Sisteminde Optimize Edilmesi

Geçici transfeksiyon deneyleri, kalsiyum-fosfat presipitasyonu yöntemiyle osteosarkoma hücrelerinde gerçekleştirildi. Osteosarkoma hücrelerinde transfeksiyonun optimizasyonu amacıyla öncelikle pMet Luc Kontrol ve pMet Luc Reporter vektörleri kalsiyum fosfat presipitasyonu yöntemi ile Bölüm 3.2.5.1’de belirtildiği gibi hücrelere transfekte edildi. pMet Luc Kontrol vektörü viral promotör içermektedir ve transfeksiyonda oldukça yüksek aktivite göstermesi beklenmektedir. Bu nedenle transfeksiyon etkinliğinin ölçülmesi amacıyla kullanılan pozitif kontroldür. pMet Luc Reporter vektörü, *ADAMTS-3* promotör parçalarını klonladığımız normalde promotör içermeyen bir vektördür. Klonlama yapılmamış olan (boş) pMet Luc vektörü arka plan aktivite verip vermediği konusunda negatif kontrol olarak kullanılmaktadır. Lusiferaz enzim aktivitesini belirlemek için Clontech Ready-To-Glow™ Secreted Luciferase System kullanıldı. Ölçümler Luminoskan Ascent marka luminometre ile yapıldı. Şekil 4.28’e bakıldığında transfeksiyonun çalıştığı elde edilen sonuçlarda görülmektedir.

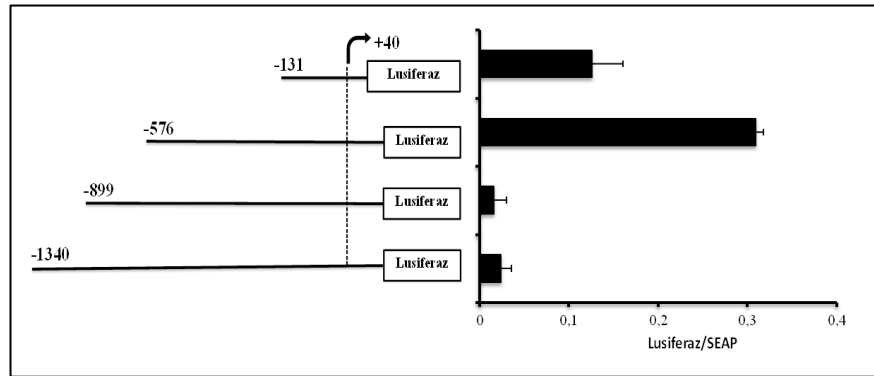


Şekil 4.28: A: pMet Luc Kontrol vektörü, B: pMet Luc reporter (haberci) vektörü transfeksiyon aktivitesi.

4.5.3 İnsan *ADAMTS-3* Geninin Bazal Promotor Aktivitesinin Belirlenmesi

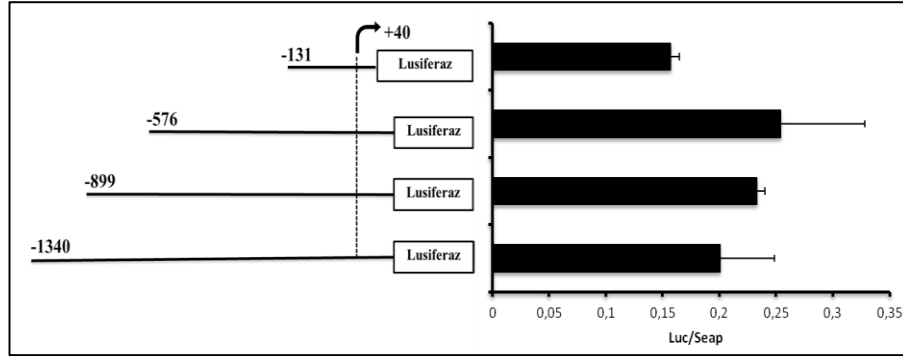
Osteosarkoma hücre modeli olan Saos-2 ve MG63 hücrelerine, daha önce pMet Luc haberci vektörüne klonlamalarını gerçekleştirdiğimiz *ADAMTS-3* promotoruna ait farklı büyüklüklerdeki promotor parçalarının transfeksiyonları yapılarak *ADAMTS-3* promotorunun bazal aktiviteleri karşılaştırıldı. pMet Luc haberci vektörüne klonlanmış *ADAMTS-3* promotor parçaları 1 µg olacak şekilde transfeksiyonda kullanıldı. Transfeksiyon etkinliğinin analiz edilmesi amacıyla 0.5 µg SEAP vektörü de transfekte edildi. SEAP vektörü yine viral promotora sahip transfeksiyon sonucunda yüksek alkalen fosfataz aktivitesi veren bir vektördür. Lusiferaz değerleri SEAP değerleri ile normalize edildi. Bölüm 3.2.5.1’de anlatıldığı şekilde transfeksiyon 12 kuyucuklu plakalarda ve her kuyucuk için 5×10^5 hücre ile yapıldı. Kontrol plazmitleri transfeksiyonda 0,5 µg kullanıldı. 48 ve 72 saat inkübasyon süreleri sonunda 100 µl medyum alınarak lusiferaz ve seap aktiviteleri Bölüm 3.2.5.2’de belirtildiği şekilde ölçüldü. Buna göre *ADAMTS-3*’e ait tüm promotor parçalarının aktif oldukları gözlemlendi.

Saos-2 hücrelerinde yapılan geçici transfeksiyon çalışmalarında tüm lusiferaz aktiviteleri göz önünde bulundurulduğunda 616 bç’lik TS3[-576/+40] promotor parçasının en yüksek aktiviteye sahip promotor parçası olduğu belirlendi (Şekil 4.29).



Şekil 4.29: Saos-2 hücrelerinde *ADAMTS-3* promotor parçalarının karşılaştırmalı bazal aktiviteleri

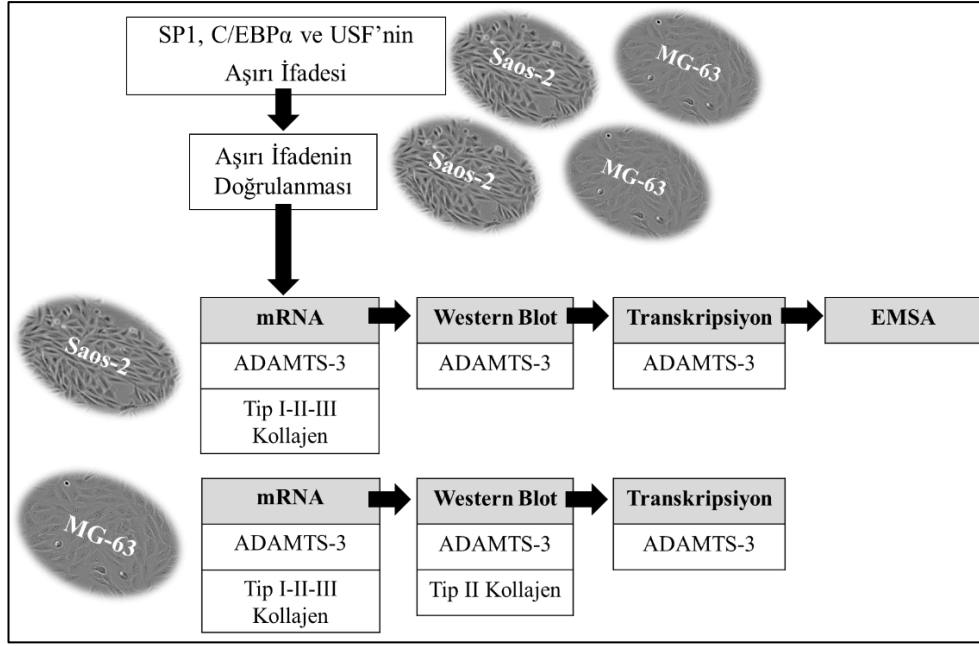
Çalışmamızın yan modeli olan diğer bir osteosarkoma hücre modeli MG63 hücrelerinde yapılan geçici transfeksiyon çalışmalarında 616 bç'lik TS3 [-576/+40] olarak isimlendirilmiş promotör parçasının en yüksek aktiviteye sahip promotör parçası olduğu belirlendi (Şekil 4.30).



Şekil 4.30: MG63 hücrelerinde *ADAMTS-3* promotör parçalarının karşılaştırmalı bazal aktiviteleri.

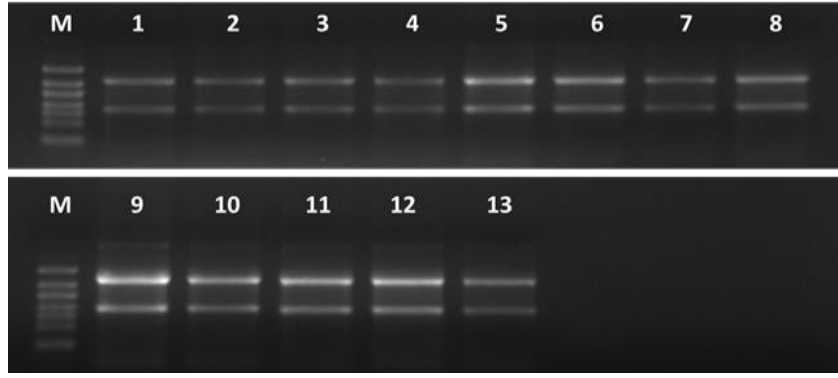
4.6 İnsan *ADAMTS-3* geninin SP1, C/EBP α ve USF Transkripsiyon Faktörleri ile Regülasyonu

Klonlaması tamamlanan *ADAMTS-3* promotörüne bağlanması muhtemel transkripsiyon faktörleri MatInspector programı kullanılarak belirlendi (Şekil 4.9 -bkz Ek E). Belirlenen yüzlerce transkripsiyon faktörü bağlanma bölgelerinden SP1, C/EBP α ve USF'nin fonksiyonel olup olmadığının belirlenmesine karar verildi. Bu transkripsiyon faktörlerinden SP1, C/EBP α ve USF'yi içeren ekspresyon vektörleri kottransfeksiyon çalışmalarında kullanıldı. Transkripsiyon faktörlerinin aşırı ifadesi sonrasında Şekil 4.31'de planlandığı şekilde mRNA ve protein düzeyinde ekspresyon çalışmaları söz konusu tüm transkripsiyon faktörleri etkisinde Saos-2 ve MG-63 hücrelerinde gerçekleştirilerek sonuçları değerlendirildi.



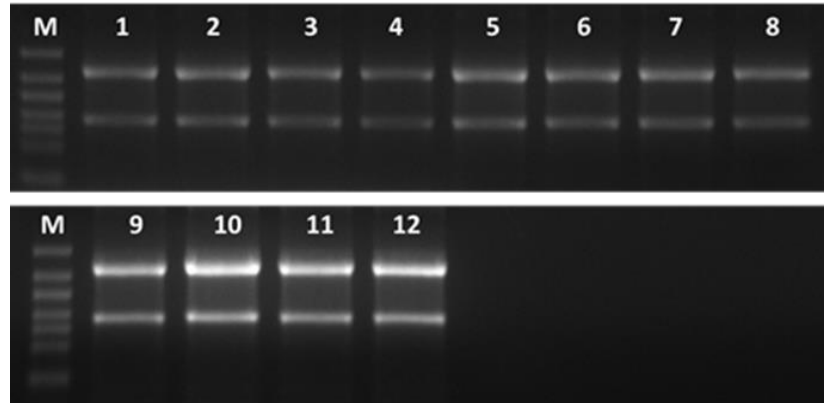
Şekil 4.31: SP1, C/EBPα ve USF transkripsiyon faktörlerinin aşırı ifadesi sonrası *ADAMTS-3* ekspresyon çalışmaları için düzenlenen plan özeti.

Saos-2 ve MG63 hücrelerinde insan SP1, C/EBPα ve USF transkripsiyon faktörlerinin geçici olarak over ekspresyonu amacıyla Bölüm 3.2.5.1’de anlatıldığı şekilde hücreler sayıca 2×10^6 olacak şekilde 25 cm²’lik küçük boy flasklara paylaştırıldı. (Bu ekspresyon plazmitleri Cardiff Üniversitesi öğretim üyesi Dr Dipak Ramji’den hediye olarak temin edilmiştir). Bahsedilen ekspresyon plazmitleri 10 µg olacak şekilde kalsiyum fosfat presipitasyonu yöntemiyle Saos-2 ve MG-63 hücrelerine aktarıldı. Herhangi bir ekspresyon plazmiti içermeyen gruplar kontrol grubu olarak kullanıldı. En yüksek ifade oldukları zaman diliminin belirlenmesi amacıyla deney gruplarına ait hücreler transfeksiyon sonrasında 6, 24, 48 ve 72 saat zaman dilimleri için inkübasyona bırakıldı ve süre sonunda tripsinizasyon ile pellet haline getirilerek daha sonra RNA izolasyonu yapılması amacıyla -80 °C dolaba kaldırıldı. RNA izolasyonları Gene Jet RNA izolasyon kiti (Fermentas) kullanılarak üretici firma talimatları doğrultusunda yapıldı. RNA miktarı florimetre (Qubit) kullanılarak belirlendi. İzole edilen RNA’lar ayrıca Bölüm 3.2.6.3’de anlatıldığı şekilde formaldehit agaroz jel elektroforezinde yürütülerek kontrol edildi (Şekil 4.32 ve 4.33).



Şekil 4.32: Saos-2 hücrelerinde kontrol ve deney gruplarına ait RNA'ların formaldehit agaroz jel elektroforezi görüntüsü.

1: Kontrol grubu Saos-2 hücreleri, **2-3-4:** SP1, C/EBP α ve USF transfekte edilen hücrelerden izole edilen RNA'lar (6 saat), **5-6-7:** SP1, C/EBP α ve USF transfekte edilen hücrelerden izole edilen RNA'lar (24 saat), **8-9-10:** SP1, C/EBP α ve USF transfekte edilen hücrelerden izole edilen RNA'lar (48 saat), **11-12-13:** SP1, C/EBP α ve USF transfekte edilen hücrelerden izole edilen RNA'lar (72 saat), **M:** RNA Büyüklük belirteci



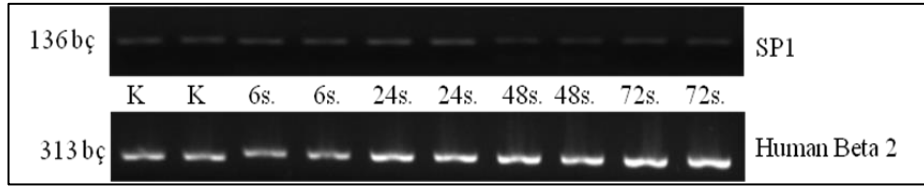
Şekil 4.33: MG63 hücrelerinde kontrol ve deney gruplarına ait RNA'ların formaldehit agaroz jel elektroforezi görüntüsü.

1: 6 saat kontrol grubu MG-63 hücrelerinden izole edilen RNA, **2-3-4:** SP1, C/EBP α ve USF transfekte edilen hücrelerden izole edilen RNA'lar (6 saat), **5:** 24 saat kontrol grubu MG-63 hücrelerinden izole edilen RNA, **6-7-8:** SP1, C/EBP α ve USF transfekte edilen hücrelerden izole edilen RNA'lar (24 saat), **9:** 48 saat kontrol grubu MG-63 hücrelerinden izole edilen RNA **10-11-12:** SP1, C/EBP α ve USF transfekte edilen hücrelerden izole edilen RNA'lar (48 saat), **M:** RNA Büyüklük belirteci

4.6.1 İnsan *ADAMTS-3* geninin SP1 Transkripsiyon Faktörü ile Regülasyonu

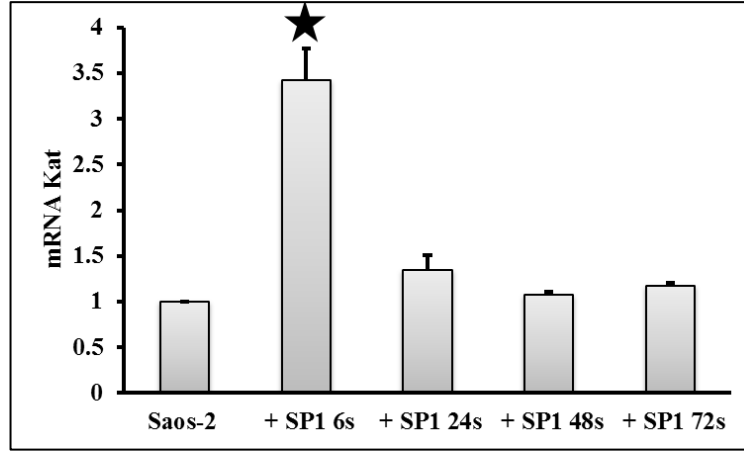
4.6.1.1 Saos-2 Hücrelerinde *ADAMTS-3* Geninin SP1 ile Regülasyonu

Bölüm 3.2.6.4'te anlatıldığı şekilde SP1 over ekspresyonu gerçekleştirilmiş olan hücrelerden izole edilen RNA'ların 1 µg'ı kullanılarak cDNA sentezi yapıldı. Belirtilen transkripsiyon faktörlerinin ilgili zaman dilimlerindeki ekspresyon düzeyi SP1 cDNA'larına özgün olarak tasarlanmış primerler (Tablo 4.5) kullanılarak sqRT-PCR ile Bölüm 3.2.3.3'te anlatıldığı şekilde en az 3 tekrarlı olacak şekilde çalışıldı. Sonuçlar densitometrik analiz ile değerlendirildi (Şekil 4.34). Kontrol ve deney grubuna ait değerler Livak metoduna göre insan β-2 mikroglobulin geninin densitometrik değerine bölünerek normalize edildi ve sonrasında kat olarak belirlendi (Şekil 4.35).



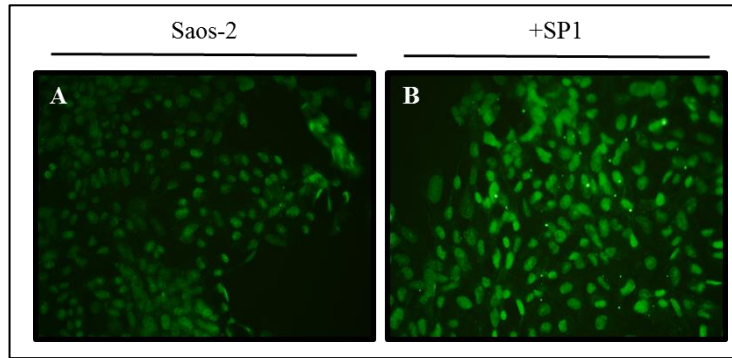
Şekil 4.34: Saos-2 hücrelerinde SP1'in 6-24-48 ve 72 saat inkübasyon süreleri sonunda geçici over ekspresyonunu gösteren sqRT-PCR jel görüntüsü

Yapılan değerlendirmeler incelendiğinde SP1 transkripsiyon faktörünün Saos-2 hücrelerinde 6 saatlik inkübasyon süresi sonunda maksimum ~3.5 kat kadar aşırı ifade olduğu belirlendi (Şekil 4.35). Sonuç olarak belirtilen transkripsiyon faktörlerinin Saos-2 hücrelerinde geçici over ekspresyonlarının başarılı bir şekilde gerçekleştiği belirlendi. Maksimum ifade oldukları inkübasyon süresindeki örnekler RNA ve protein çalışmalarında kullanıldı.

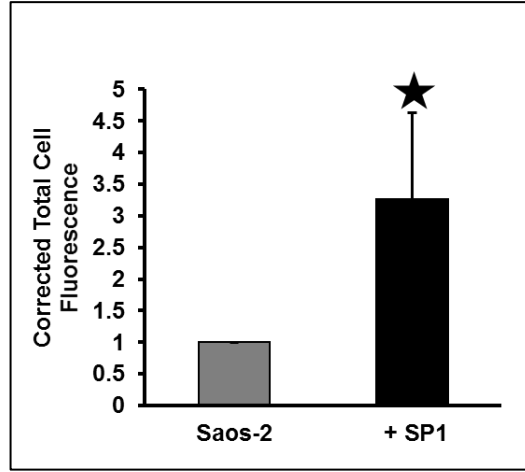


Şekil 4.35: Saos-2 hücrelerinde SP1'in 6- 24- 48 ve 72 saat inkübasyon süreleri sonunda geçici over ekspresyonunu sonucu SP1'in maksimum ifade olduğu inkübasyon süresini gösteren grafik.

SP1 aşırı ifadesinin protein düzeyinde de belirlenmesi amacıyla Bölüm 3.2.7.2'de anlatıldığı şekilde gerçekleştirilen immunofloresans deneyleri neticesinde elde edilen floresans mikroskop görüntüleri Şekil 4.36'da verildi. Image J programı kullanılarak gerçekleştirilen ve kontrol grubu için 5 alanda 87 hücrenin, deney grubu içinse 12 alanda 206 hücrenin değerlendirme sonuçlarına göre SP1'in ekspresyon değeri transfeksiyon sonrasında Saos-2 hücrelerinde yaklaşık 3 kata kadar arttırdı (Şekil 4.37).

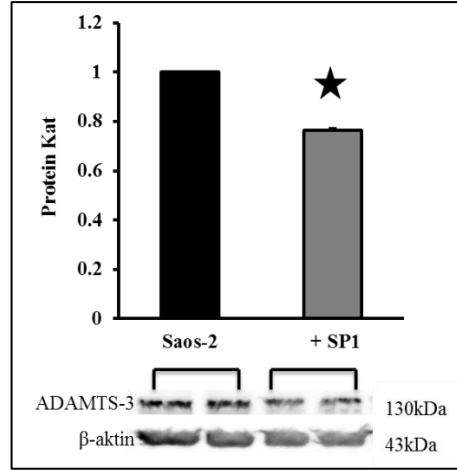


Şekil 4.36: SP1 aşırı ifadesi sonrası Saos-2 hücrelerinde immunofloresans görüntüleri.
A: SP1 uygulanmamış hücrelerde SP1 işaretlemesi, **B:** SP1 OE hücrelerde SP1 işaretlemesi



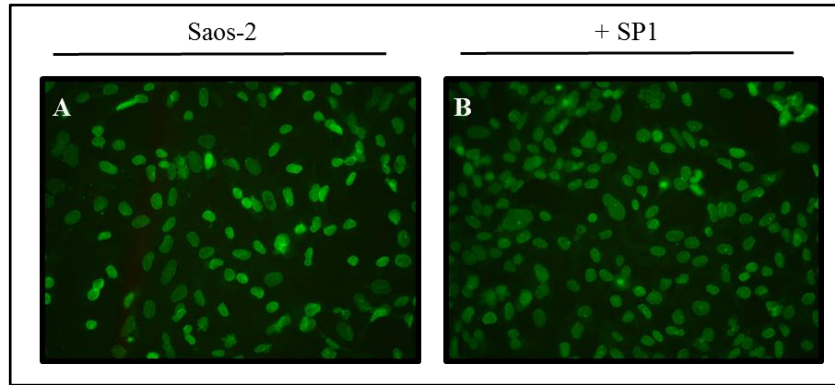
Şekil 4.37: SP1 aşırı ifadesi sonrası Saos-2 hücrelerinde immunofloresans değerlendirmeleri.

SP1 transkripsiyon faktörlerini taşıyan ekspresyon plazmitleri kalsiyum fosfat presipitasyonu ile geçici olarak Saos-2 hücrelerine transfekte edildikten sonra Bölüm 3.2.7.1’de anlatıldığı şekilde RIPA solüsyonu kullanılarak elde edilen proteinler 50 µg konsantrasyonda olacak şekilde SDS-PAGE jelinde yürütüldü ve daha sonra 1 gece +4 °C’de 15V’da membrana transfer edildi. Proteinlerin *ADAMTS-3* antikoruna ile işaretlenebilmesi için membran 2 µg/ml *ADAMTS-3* antikoruna ile 1 gece +4 °C’de inkübasyona bırakıldı. Ertesi gün membran yıkanarak; oda sıcaklığında 1 saat, 1:5000 oranında sekonder antikora (anti-rabbit) tabi tutuldu. Oluşan bantların ECL çözeltisi kullanılarak görünür hale gelmesi sağlandı ve görüntüleme cihazı ile fotoğrafları çekildi (Şekil 4.38). Western blot yöntemi kullanılarak *ADAMTS-3* proteinleri işaretlendi. Normalizasyon amacıyla β-aktin proteini kullanıldı. Sonuçlar Image J programı ile analiz edilerek değerlendirildi. Yapılan densitometrik analizler sonucunda SP1 transkripsiyon faktörünün protein düzeyinde *ADAMTS-3* ekspresyonunu ~0.7 kata kadar azalttığı belirlendi (Şekil 4.38). Elde edilen bu sonuç istatistiksel olarak da anlamlı bulundu.



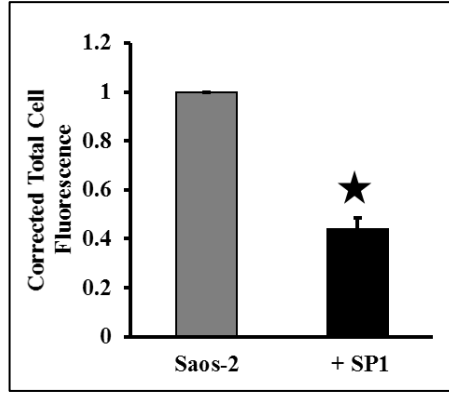
Şekil 4.38: Saos-2 hücrelerinde SP1 transkripsiyon faktörünün geçici over ekspresyonu ile *ADAMTS-3* geni protein düzeyine olan etkisini gösteren western blot membranı ve densitometrik analiz sonucu elde edilen sonuç grafiği.

SP1 aşırı ifadesinin *ADAMTS-3* protein düzeyine olan etkisinin belirlenmesi amacıyla Bölüm 3.2.7.2’de anlatıldığı şekilde *ADAMTS-3*’e özgü antikorlar kullanılarak gerçekleştirilen immunofloresans deneyleri neticesinde elde edilen floresans mikroskop görüntüleri Şekil 4.39’de verildi. Image J programı kullanılarak gerçekleştirilen ve kontrol grubu için 5 alanda 100 hücrenin, deney grubu içinse 8 alanda 160 hücrenin değerlendirme sonuçlarına göre *ADAMTS-3*’e ait ekspresyon değerinin transfeksiyon sonrasında Saos-2 hücrelerinde yarıya kata düştüğü belirlendi (Şekil 4.40).



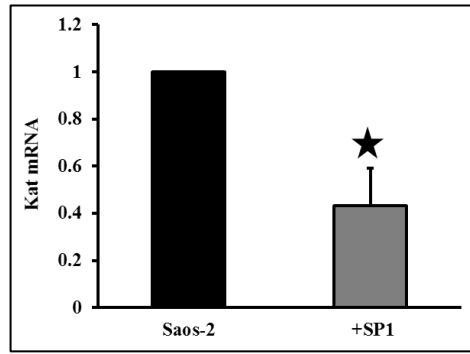
Şekil 4.39: SP1 aşırı ifadesi sonrası Saos-2 hücrelerinde *ADAMTS-3* proteini immunofloresans görüntüleri.

A: SP1 uygulanmamış hücrelerde *ADAMTS-3* işaretlenmesi, **B:** SP1 OE hücrelerde *ADAMTS-3* işaretlenmesi



Şekil 4.40: SP1 aşırı ifadesi sonrası Saos-2 hücrelerinde *ADAMTS-3* proteini immunofloresans değerlendirmeleri.

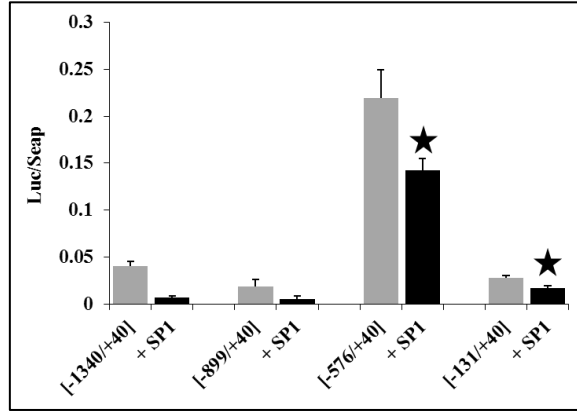
SP1 transkripsiyon faktörünün *ADAMTS-3* mRNA düzeyine olan etkisinin belirlenebilmesi amacıyla bir önceki bölümde izole edilen RNA'lardan her bir deney grubu için 1 µg kullanılarak cDNA sentezi yapıldı. *ADAMTS-3*'ün ilgili zaman dilimindeki ekspresyon düzeyinin belirlenebilmesi amacıyla *ADAMTS-3*'e özgü tasarlanmış primerler kullanılarak en az 3 tekrarlı olacak şekilde qRT-PCR ile çalışıldı. Yapılan çalışmalar değerlendirildiğinde SP1 transkripsiyon faktörünün *ADAMTS-3* mRNA seviyesinde 0.4 kata kadar istatistiksel olarak da anlamlı şekilde azalttığı belirlendi (Şekil 4.41).



Şekil 4.41: Saos-2 hücrelerinde SP1 transkripsiyon faktörünün geçici over ekspresyonunun *ADAMTS-3* mRNA düzeyine olan etkisi

Kotransfeksiyon analizlerinde 1 µg *ADAMTS-3* promotor parçalarıyla birlikte, ilgili transkripsiyon faktörünün hücrede ektopik ekspresyonunu sağlayacak olan ekspresyon plazmitlerinden 1-2 µg ve normalizasyon amacıyla da 0,5 µg Seap kontrol plazmiti ile birlikte, Bölüm 3.2.5.1'de anlatıldığı şekilde kalsiyum fosfat presipitasyonu yöntemi ile geçici olarak Saos-2 hücrelerine transfekte edildi. Bazal aktivite sonuçları, ekspresyon vektörü transfekte edilen hücrelerdeki lusiferaz

aktivitesi sonuçlarıyla karşılaştırılarak değerlendirildi. Saos-2 hücrelerinde yapılan kotransfeksiyonların sonuçları değerlendirildiğinde SP1 transkripsiyon faktörünün tüm promotor parçaları üzerinde; TS3[-1340/+40] için 0.2 kat, TS3[-899/+40] için 0.3 kat, TS3[-131/+40] için 0.6 kat ve en yüksek TS3[-576/+40] için 0.7 kat oranında transfeksiyon etkinliğini azaltıcı yönde etki gösterdiği belirlendi. Özellikle TS3[-576/+40] ve TS3[-131/+40] promotor parçaları üzerindeki bu etki istatistiksel olarak da anlamlı bulundu (Şekil 4.42).



Şekil 4.42: Saos-2 hücrelerinde SP1 transkripsiyon faktörünün *ADAMTS-3* promotor aktivitesine etkileri

4.6.1.1.1 İnsan *ADAMTS-3* promotorunun EMSA deneyleri kullanılarak SP1 transkripsiyon faktörü fonksiyonel bağlanma analizinin belirlenmesi

İnsan *ADAMTS3* geninin promotor analizinin yapılabilmesi amacıyla öncelikle muhtemel transkripsiyon faktörü bağlanma bölgelerini belirlediğimiz (Şekil 4.9) promotor parçamız için özel problemler dizayn edildi (Tablo 4.6). *ADAMTS-3*'e ait promotor analizi sonucu yoğun olarak SP1, USF ve C/EBP α transkripsiyon faktörü bağlanma motifleri olduğu tespit edildi. Bu transkripsiyon faktörlerinin *ADAMTS-3* promotorunda ilgili bölgelere bağlanıp bağlanmadığı belirlendi. EMSA reaksiyonları Saos-2 hücrelerinden söz konusu transkripsiyon faktörlerinin aşırı ifadesi yapılarak veya yapılmadan nükleer ekstraktlar Bölüm 3.2.8.1.1'de anlatıldığı şekilde elde edildi. Tüm EMSA deneyleri için nükleer ekstrakt konsantrasyonları 5 μ g olacak şekilde belirlendi.

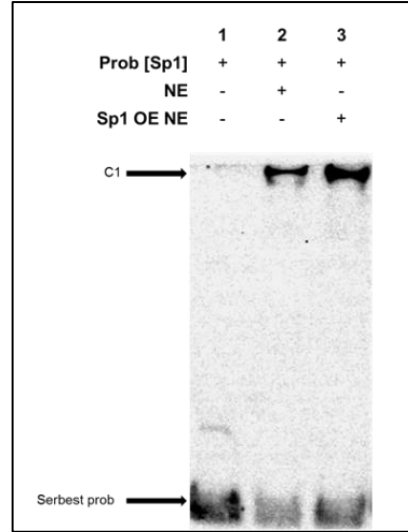
Tablo 4.6: EMSA deneylerinde kullanılan sentetik oligonükleotitler ve içerdikleri bağlanma motifleri

Prob Adı	Dizisi	İçerdiği bağlanma motifleri
-40/-12	5'AACTTATTTTGGGCGGGGGGGTGGGTTTGC3' 5'GCAAACCCACCCCGCCAAAATAAGTT3'	Gc-box - Kruppel like- E2F
-131/-103	5'GCTCAAATTTTCATTTTCATTGAAGCAAAG3' 5'CTTTGCTTCAATGAAAATGAAATTTGAGC3'	STAT
-489/-450	5'CTCCTCCTCCCTTCGCTCCTCCCGCCCCACCT3' 5'AGGTGGGGGCGGGAGGAGCGAAGGGGAGGAGGAG3'	GC box - E2F - Kruppel like-EGR
-641/-607	5'CATGATGTGGGCGCCACGGCGGGAGGGGCAGTCCG3' 5'CGGACTGCCCTCCCGCCGTGGCGCCACGTCATG3'	GC box-E2F-E box- Kruppel like- EGR
-973/-937	5'GACTGGTGCCTGGAAGGAGATCACCGGTGGTTAAG3' 5'CTTAACCACGCGGTGATCTCCCTTCCAGGCACCAGTC3'	STAT
-1225/-1205	5'CTAGGATTCCAGCAAACCTCTC3' 5'GAGAGTTTCTGGAATCCTAG3'	STAT
-1278/-1259	5'TCTGCTTTCTGGAAAGCACC3' 5'GGTGCTTCCAGAAAGCAGA3'	STAT
SP1 konsensus	5'ATTCGATCGGGGCGGGGCGAGC3' 5'GCTCGCCCCGCCCGATCGAAT3'	Konsensus dizi
C_EBP α konsensus	5'TGCAGATTGCGCAAT3' 5'TGCATTGCGCAATCT3'	Konsensus dizi
USF konsensus	5'TCGACGGTGTAGGCCACGTGACCGGGTGT3' 5'CGCACACCCGGTCACGTGGCCTACACCGT3'	Konsensus dizi
NF- κ B konsensus	5'AGTTGAGGGGACTTTCCAGGC3' 5'GCCTGGGAAAGTCCCCTCAACT3'	Konsensus dizi
STAT konsensus	5'GATCCTTCTGGGAATTCCTAGA3' 5'GATCTAGGAATTCAGAAAGGATC3'	Konsensus dizi
E2F konsensus	5'ATTTAAGTTTCGCGCCCTTCTCAA3' 5'TGAGAAAGGGCGCGAAACTTAAAT3'	Konsensus dizi
API konsensus	5'GATCCTTCGTGACTCAGCGGGATCCTTCGTGAC3' 5'CCGCTGAGTCACGAAGGATCCCGCTGAGTCACG3'	Konsensus dizi

EMSA deneyleri Bölüm 3.2.8.1'de anlatıldığı şekilde yapıldı. İstenilen promotor bölgesine özgü sentezlenen proplar öncelikle Bölüm 3.2.8.1.2'de anlatıldığı şekilde biyotin ile işaretlendi. Yarışma deneyleri için ise biyotin işaretli proplar hazırlandı. Daha sonra Bölüm 3.2.8.1.3'de anlatıldığı gibi biyotin işaretli ve biyotin işaretli (Etiketsiz proplar) oligoların bağlanma reaksiyonu için ayrı ayrı tüplerde aynı proba ait forward ve reverse proplar bir arada olacak şekilde oligoların çift zincirli hale getirilmesi sağlandı. Bölüm 3.2.8.1.4'de konsantrasyonlarıyla birlikte detaylandırıldığı şekilde Saos-2 nükleer ekstraktları kullanılarak EMSA bağlanma reaksiyonları planlandı. Kontrol amacıyla sadece biyotin işaretli prob (serbest prob) tek kuyu olarak çalışıldı. Yarışma deneyleri için biyotinli *ADAMTS-3* proplar ile birlikte biyotinsiz soğuk proplar en az 500 kat fark olacak şekilde aynı tüpte çalışıldı. Son olarak tüp bileşenler eklendiğinde oda sıcaklığında 20 dk inkübasyondan sonra bağlanma reaksiyonları denatüre olmayan %6'luk jelde +4°C sıcaklıkta 100 V akımda

yürütüldü. Jelde yürütülen örnekler 90mA akım, +4°C sıcaklıkta, % 0.5 X'lik soğuk TBE çözeltisinde naylon membrana transfer edildi. Proteinlerin membrana transferinden sonra DNA'ların membrana sabitlenmesi için (cross-link) membranın aktif yüzeyi 15 dakika boyunca UV uygulaması maruz bırakıldı. Cross-link uygulaması sonrasında LightShift® Chemiluminescent EMSA kit protokolü uygulanarak HRP bağlı streptavidin ile işaretlenen muhtemel komplekslerin görüntülenmesi amacıyla membran ECL ile muamele edilip Fusion FX Vilber Lourmat görüntüleme cihazında görüntüledi. Görüntülemenin ardından EMSA sonuçları değerlendirildi. Oluşan kompleksler şekil üzerinde "C" kodlaması ile isimlendirildi.

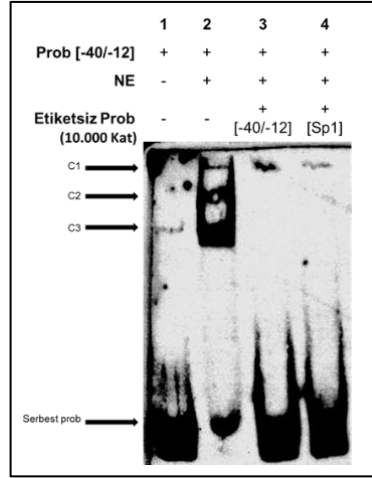
Saos-2 kontrol nükleer ekstraktları kullanılarak gerçekleştirilen ve SP1 biotinli probunun reaksiyona katıldığı EMSA çalışması neticesinde oluşan C1 kompleksi SP1 aşırı ifadesi yapılmış nükleer ekstraktlar reaksiyona katıldığında kuvvetlenmiş ve daha koyu bant vermiştir (Şekil 4.43). Bu sonuca göre SP1 aşırı ifadesinin gerçekleştiği ve SP1 probunun SP1 bağlanma bölgeleri ile kompleks oluşturduğu belirlenmiş oldu.



Şekil 4.43: Saos-2 nükleer ekstraktı ve SP1 biotinli probu kullanılarak gerçekleştirilen EMSA sonucu.

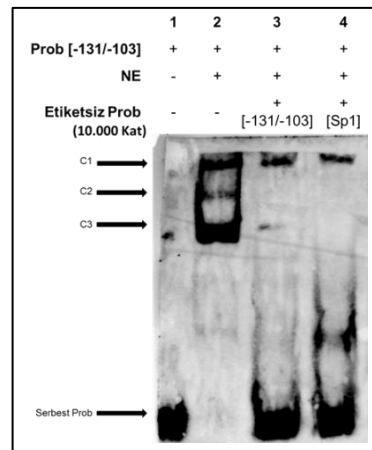
ADAMTS-3 promotörü için yapılan transkripsiyon faktörü bağlanma analizleri sonucunda SP1 bağlanma motiflerinin bulunduğu bölgelere özgü tasarlanan proplar (Tablo 4.6) kullanılarak EMSA deneyleri gerçekleştirildi. Saos-2 nükleer ekstraktları kullanılarak, prob [-40/-12] ve etiketsiz prob SP1'in 10.000 kat olacak şekilde yarıştırdığı EMSA neticesinde prob [-40/-12]'nin kullanılmasıyla oluşan 3 kompleksten C2 ve C3 SP1'le yarışması sonucunda kayboldu. Bu sonuca göre

promotora ait -40/-12'lik bu bölgede SP1 için bağlanma motifleri olduğu kesin olarak belirlendi (Şekil 4.44).



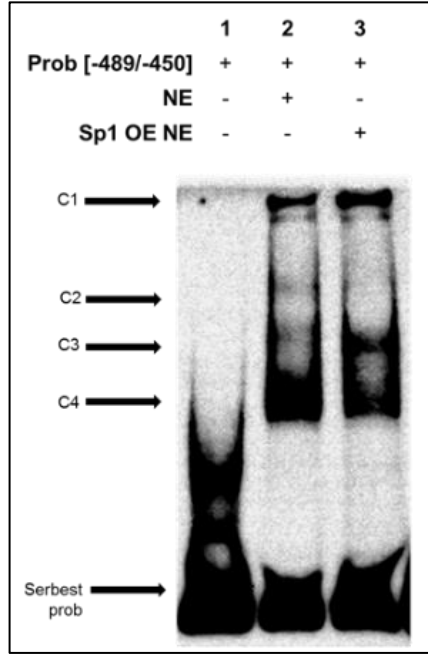
Şekil 4.44: Saos-2 nükleer ekstraktı ve prob [-40/-12] kullanılarak gerçekleştirilen yarışma EMSA sonucu.

Saos-2 nükleer ekstraktları kullanılarak, prob [-131/-103] ve etiketsiz prob SP1'in 10.000 kat olacak şekilde yarıştırdığı EMSA neticesinde prob [-131/-103]'le gerçekleştirilen reaksiyon sonucu oluşan 3 kompleksten C2 ve C3 SP1'le yarışması sonucunda kayboldu. Bu sonuca göre promotora ait -131/-103'lük bu bölgede SP1 için bağlanma motifleri olduğu kesin olarak belirlendi (Şekil 4.45).



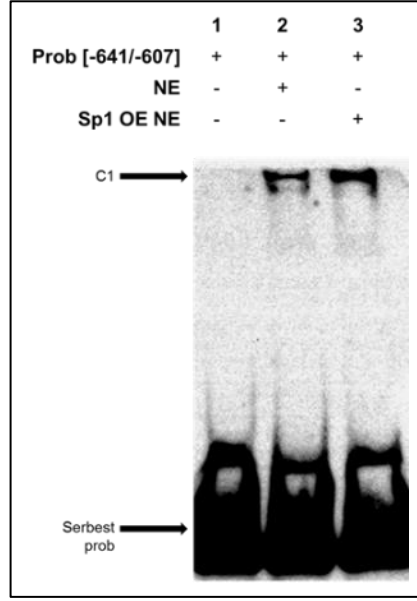
Şekil 4.45: Saos-2 nükleer ekstraktı ve prob [-131/-103] kullanılarak gerçekleştirilen yarışma EMSA sonucu.

Saos-2 nükleer ekstraktı ve prob [-489/-450] ile gerçekleştirilen reaksiyon sonrasında 4 tane kompleks oluştu. Bu komplekslerden C1 ve C3 SP1'in aşırı ifadesi yapıldığı nükleer ekstraktlar kullanılarak gerçekleştirilen reaksiyon sonrasında daha güçlü bant verdi. Bu sonuç bize -489/-450'lik promotor bölgesinde SP1 bağlanma motifleri bulunduğunu ve burada DNA-protein etkileşimlerinin SP1 bağlanması ile oluştuğunu ispatladı (Şekil 4.46).



Şekil 4.46: Saos-2 nükleer ekstraktı ve prob [-489/-450] kullanılarak gerçekleştirilen yarışma EMSA sonucu.

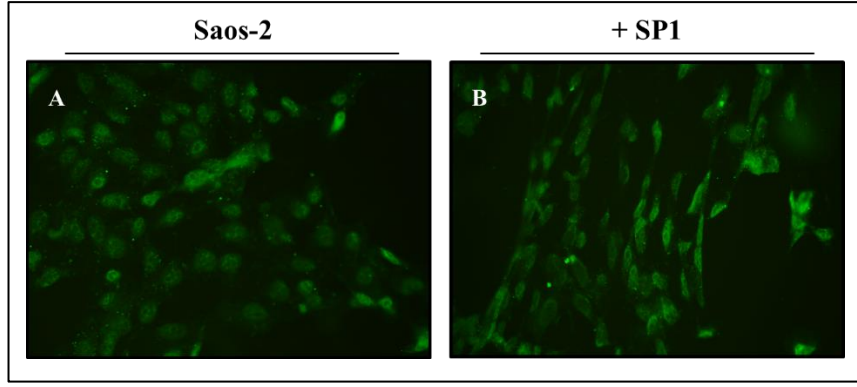
SP1 bağlanma bölgesi içerdiği düşünülen bir diğer prob [-641/-607] ile gerçekleştirilen ve Saos-2 nükleer ekstraktının kullanıldığı reaksiyon sonrasında oluşan C1 kompleksi, SP1'in aşırı ifade edildiği nükleer ekstraktla gerçekleştirilen reaksiyon sonrasında kuvvetlendi ve bu bölgede meydana gelen DNA-protein etkileşiminin SP1 bağlanması ile gerçekleştirildiğini gösterdi (Şekil 4.47).



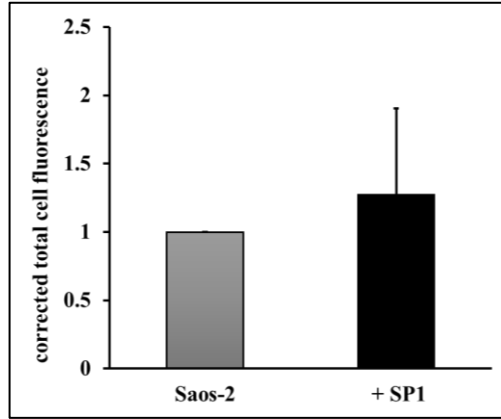
Şekil 4.47: Saos-2 nükleer ekstraktı ve prob [-641/-607] kullanılarak gerçekleştirilen yarışma EMSA sonucu.

4.6.1.1.2 Saos-2 Hücrelerinde Kollajen Tip I–II ve III genlerinin SP1 ile Regülasyonu

SP1 aşırı ifadesinin Tip II Kollajen protein düzeyine olan etkisinin belirlenmesi amacıyla Bölüm 3.2.7.2’de anlatıldığı şekilde COL2A1 antikoru kullanılarak gerçekleştirilen immunofloresans deneyleri neticesinde elde edilen floresans mikroskop görüntüleri Şekil 4.48’de verilmiştir. Image J programı kullanılarak gerçekleştirilen ve kontrol grubu için 4 alanda 79 hücrenin, deney grubu içinse 7 alanda 73 hücrenin değerlendirme sonuçlarına göre Tip II Kollajen’in ekspresyon değeri SP1 transfeksiyonu sonrasında Saos-2 hücrelerinde arttığı tespit edildi.(Şekil 4.49).

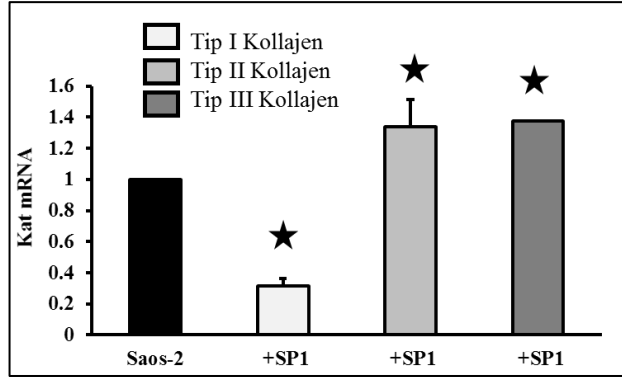


Şekil 4.48: SP1 aşırı ifadesi sonrası Saos-2 hücrelerinde Tip II Kollajen proteini immunofloresans görüntüleri.
A: SP1 uygulanmamış hücrelerde COL2A1 işaretlenmesi, **B:** SP1 OE hücrelerde COL2A1 işaretlenmesi



Şekil 4.49: SP1 aşırı ifadesi sonrası Saos-2 hücrelerinde Tip II Kollajen proteini immunofloresans değerlendirmeleri.

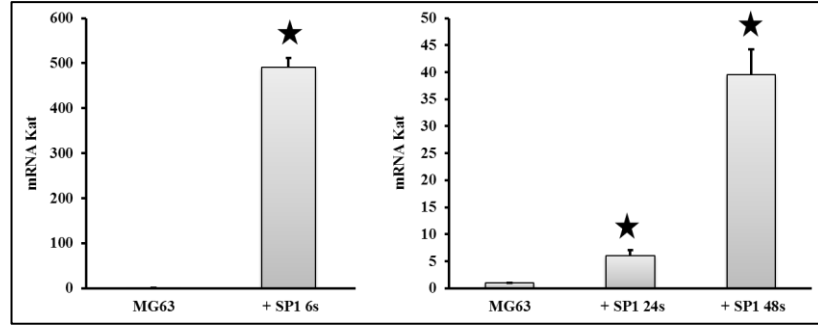
SP1 transkripsiyon faktörünün Tip I, II, III kollajenlerinin mRNA düzeyine olan etkisinin belirlenebilmesi amacıyla Bölüm 4.7’de izole edilen RNA’ların 1 µg’ı kullanılarak Bölüm 3.2.6.4’te anlatıldığı şekilde cDNA sentezi yapıldı. Tip I, II, III kollajenlerinin ilgili zaman dilimlerindeki ekspresyon düzeyinin belirlenebilmesi amacıyla Tablo 4.5’te verilen, kollajenlere özgü tasarlanmış primerler kullanılarak Bölüm 3.2.6.5’te anlatıldığı şekilde birbirinden bağımsız 2 farklı deney kuruldu ve en az 3 tekrarlı olacak şekilde qRT-PCR çalışıldı. Sonuçlar Livak metoduna göre değerlendirildi. p değeri ≤ 0.05 olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Sonuçlar değerlendirildiğinde SP1 transkripsiyon faktörünün Tip I kollajen ekspresyonunu 0.3 kata kadar azalttığı diğer yanda Tip II ve Tip III kollajen ekspresyonunu ise yaklaşık 1.3 kadar arttırdığı tespit edildi. mRNA seviyesindeki tüm ekspresyon sonuçları istatistiksel olarak anlamlı bulundu (Şekil 4.50).



Şekil 4.50: Saos-2 hücrelerinde SP1 transkripsiyon faktörünün geçici over ekspresyonunun tip I-II-III kollajenlerinin mRNA düzeyine olan etkisi

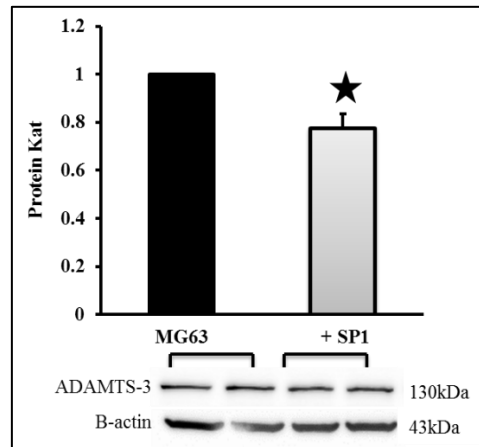
4.6.1.2 MG63 Hücrelerinde *ADAMTS-3* Geninin SP1 ile Regülasyonu

Over ekspresyonu gerçekleştirilmiş olan MG63 hücrelerinden izole edilen RNA'ların 1 µg'ı kullanılarak cDNA sentezi yapıldı. Belirtilen transkripsiyon faktörlerinin ilgili zaman dilimlerindeki ekspresyon düzeyi SP1 cDNA'larına özgün olarak tasarlanmış primerler (Tablo 4.5) kullanılarak qRT-PCR ile Bölüm 3.2.6.5' te anlatıldığı şekilde en az 3 tekrarlı olacak şekilde çalışıldı. Kontrol ve deney grubuna ait değerler Livak metoduna göre insan β-2 mikroglobulin geninin Ct değerine bölünerek normalize edildi ve sonrasında kat olarak belirlendi. Elde edilen sonuçlara göre SP1 transkripsiyon faktörünün MG63 hücrelerinde over ekspresyonunun en fazla 6. saat inkübasyon sonrasında yaklaşık 500 kata kadar arttığı belirlendi. SP1 ifadesinin transkripsiyonunun 48 saatlik inkübasyonuna kadar 40 kata kadar istatistiksel olarak da anlamlı şekilde devam ettiği belirlendi (Şekil 4.51). Sonuç olarak belirtilen transkripsiyon faktörünün MG-63 hücrelerinde geçici over ekspresyonunun başarılı bir şekilde gerçekleştiği belirlenmiştir. Maksimum ifade oldukları inkübasyon süresinde elde edilen örnekler RNA ve protein çalışmalarında kullanıldı.



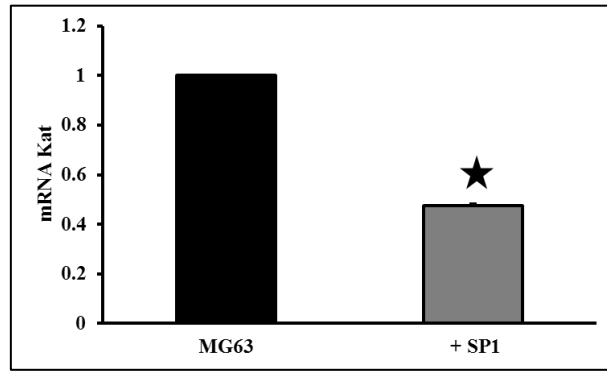
Şekil 4.51: MG-63 hücrelerinde SP1'in 6- 24 ve 48 saatlik inkübasyonu sonunda maksimum ifade olduğu inkübasyon süresini gösteren grafik.

SP1 transkripsiyon faktörlerini taşıyan ekspresyon plazmitleri kalsiyum fosfat presipitasyonu ile geçici olarak MG-63 hücrelerine transfeksiyon yöntemi ile aktarıldıktan sonra RIPA solüsyonu kullanılarak elde edilen 50 µg yoğunluğundaki proteinler SDS-PAGE jelde yürütüldü (Şekil 4.52) Western blot yöntemi kullanılarak *ADAMTS-3* antikorları ile proteinler işaretlendi. Normalizasyon amacıyla β-aktin proteini kullanıldı. Sonuçlar Image J programı ile analiz edilerek değerlendirildi. Yapılan densitometrik analizler sonucunda SP1 transkripsiyon faktörünün *ADAMTS-3* protein düzeyini 0.8 kata kadar azalttığı belirlendi. Elde edilen azalma istatistiksel olarak da anlamlı bulundu (Şekil 4.52).



Şekil 4.52: MG63 hücrelerinde SP1 transkripsiyon faktörünün geçici over ekspresyonu ile *ADAMTS-3* geni protein düzeyine olan etkisini gösteren western blot membranı ve densitometrik analiz sonucu elde edilen sonuç grafiği.

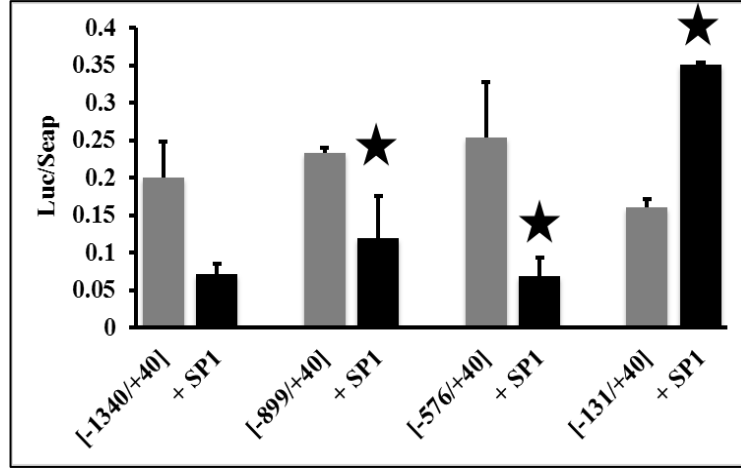
SP1 transkripsiyon faktörünün *ADAMTS-3* mRNA düzeyine olan etkisinin belirlenebilmesi amacıyla bir önceki bölümde izole edilen RNA'ların 1 µg'ı kullanılarak cDNA sentezi yapıldı. *ADAMTS-3* ilgili zaman dilimlerindeki ekspresyon düzeyinin belirlenebilmesi amacıyla *ADAMTS-3*'e özgü tasarlanmış primerler kullanılarak birbirinden bağımsız 2 farklı deney kuruldu ve en az 3 tekrarlı olacak şekilde qRT-PCR çalışıldı. Yapılan çalışmalar değerlendirildiğinde SP1 transkripsiyon faktörünün *ADAMTS-3* mRNA ekspresyon seviyesini daha önce belirlenmiş olan maksimum ifade olduğu inkübasyon süresi sonunda yaklaşık olarak 0.5 kata kadar azalttığı belirlendi (Şekil 4.53).



Şekil 4.53: MG-63 hücrelerinde SP1 transkripsiyon faktörünün geçici over ekspresyonunun *ADAMTS-3* mRNA düzeyine olan etkisini gösteren grafik

Kotransfeksiyon analizlerinde 1 µg *ADAMTS-3* promotor parçalarıyla birlikte, ilgili transkripsiyon faktörünün MG63 hücrelerinde ektopik ekspresyonunu sağlayacak olan ekspresyon plazmitlerinden 1-2 µg ve normalizasyon amacıyla da 0,5 µg Seap kontrol plazmiti ile birlikte Bölüm 3.2.5.1'de anlatıldığı şekilde kalsiyum fosfat presipitasyonu yöntemi ile geçici olarak MG63 hücrelerine transfekte edildi. Bazal aktivite sonuçları, ekspresyon vektörü transfekte edilen hücrelerdeki lusiferaz aktivitesi sonuçlarıyla karşılaştırılarak değerlendirildi. MG63 hücrelerinde yapılan kotransfeksiyon çalışmalarının sonuçları değerlendirildiğinde uygulanan SP1 transkripsiyon faktörünün *ADAMTS-3*'e ait tüm promotor parçalarının promotor aktivitelerini azalttığı belirlendi. Özellikle TS3 [-1340/+40] olarak isimlendirilen promotor parçasında 0.6 kata kadar olmak üzere TS3 [-576/+40] ve TS3 [-899/+40] promotor aktivitesinde azalma olduğu belirlendi. TS3 [-131/+40] promotor parçasında

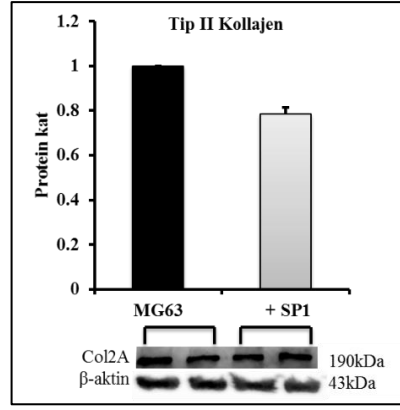
ise 2 kata kadar promotor aktivitede artış meydana geldiği belirlendi ve bu sonuç anlamlı bulundu (Şekil 4.54).



Şekil 4.54: MG63 hücrelerinde SP1 transkripsiyon faktörünün *ADAMTS-3* promotor aktivitesine üzerine etkilerini gösteren grafik

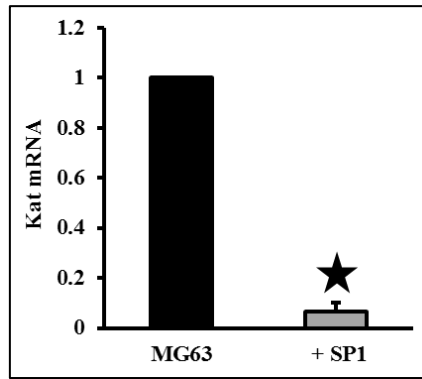
4.6.1.2.1 MG63 Hücrelerinde Tip I-II-III Kollajen Genlerinin SP1 ile Regülasyonu

Protein düzeyinde ekspresyon düzeylerinin belirlenmesi amacıyla, SP1 transkripsiyon faktörlerini taşıyan ekspresyon plazmitleri kalsiyum fosfat presipitasyonu ile geçici olarak MG63 hücrelerine transfeksiyon yöntemi ile aktarıldıktan sonra RIPA solüsyonu kullanılarak elde edilen proteinler (50 µg) SDS-PAGE jelde yürütüldü (Şekil 4.55). Western blot yöntemi kullanılarak Tip II Kollajen proteinlerine özgü antikorlar ile proteinler işaretlendi. Normalizasyon amacıyla β-aktin proteini kullanıldı. Sonuçlar Image J programı ile analiz edilerek değerlendirildi. Yapılan densitometrik analizler sonucunda SP1 transkripsiyon faktörünün Tip II Kollajen protein düzeyini yaklaşık 0.8 oranına kadar baskıladığı belirlendi (Şekil 4.55).

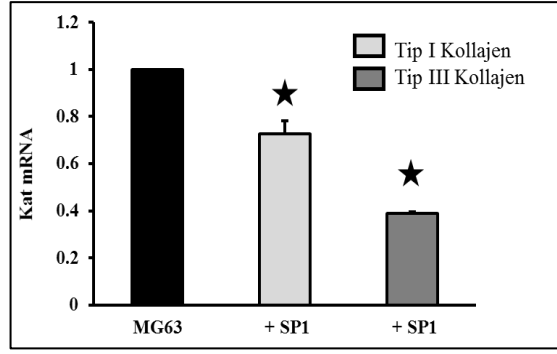


Şekil 4.55: MG63 hücrelerinde SP1 transkripsiyon faktörünün Tip II Kollajen protein düzeyine olan etkisinin membran görüntüsü ve grafiği

MG63 hücrelerinde SP1 aşırı ifadesi sonucu elde edilen hücrelerden Bölüm 3.2.6.1’de anlatıldığı şekilde kit proedürüne uyularak RNA izole edildi. İzole edilen bu RNA’lardan 1µg olacak şekilde kullanılarak Bölüm 3.2.6.4’te anlatıldığı gibi cDNA sentezlendi. Tip I, II, III kollajenlerinin ilgili zaman dilimlerindeki ekspresyon düzeyinin belirlenebilmesi amacıyla Tablo 4.5’te verilen kollajenlere özgü tasarlanmış primerler kullanılarak Bölüm 3.2.6.5’te anlatıldığı şekilde birbirinden bağımsız 2 farklı deney kuruldu ve en az 3 tekrarlı olacak şekilde qRT-PCR çalışıldı. Sonuçlar değerlendirildiğinde SP1’in çalışılan tüm kollajen tiplerinde mRNA seviyesinde ekspresyonu azalttığı gözlemlendi. Şekil 4.56’de görüldüğü gibi özellikle Tip II Kollajen ekspresyonunu 0.1 oranına kadar azalttığı ve alınan tüm sonuçların istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi (Şekil 4.57).



Şekil 4.56: MG63 hücrelerinde SP1 transkripsiyon faktörünün geçici over ekspresyonunun Tip II Kollajen mRNA düzeyleri üzerine olan etkisi.

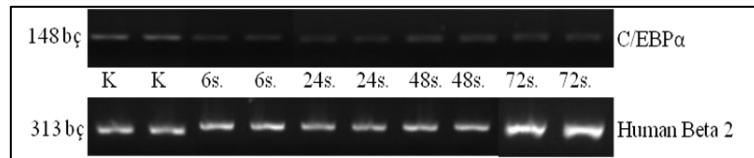


Şekil 4.57: MG63 hücrelerinde SP1 transkripsiyon faktörünün geçici over ekspresyonunun Tip I ve Tip III Kollajen mRNA düzeyleri üzerine olan etkisi

4.6.2 İnsan *ADAMTS-3* geninin C/EBP α Transkripsiyon Faktörü ile Regülasyonu

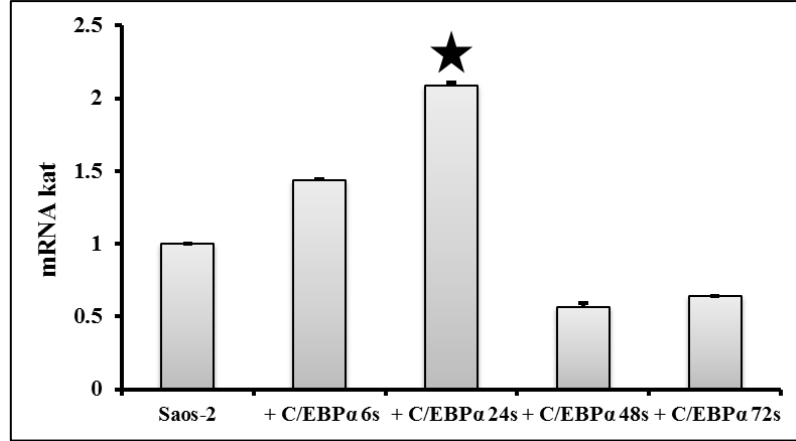
4.6.2.1 Saos-2 Hücrelerinde *ADAMTS-3* Geninin C/EBP α ile Regülasyonu

Bölüm 3.2.6.4'te anlatıldığı şekilde C/EBP α over ekspresyonu gerçekleştirilmiş olan hücrelerden izole edilen RNA'ların 1 μ g'ı kullanılarak cDNA sentezi yapıldı. Belirtilen transkripsiyon faktörlerinin ilgili zaman dilimlerindeki ekspresyon düzeyi C/EBP α cDNA'larına özgün olarak tasarlanmış primerler (Tablo 4.5) kullanılarak sqRT-PCR ile Bölüm 3.2.3.3'te anlatıldığı şekilde en az 3 tekrarlı olacak şekilde çalışıldı. Sonuçlar densitometrik analiz ile değerlendirildi (Şekil 4.58). Kontrol ve deney grubuna ait değerler Livak metoduna göre insan β -2 mikroglobulin geninin densitometrik değerine bölünerek normalize edildi ve sonrasında kat olarak belirlendi.



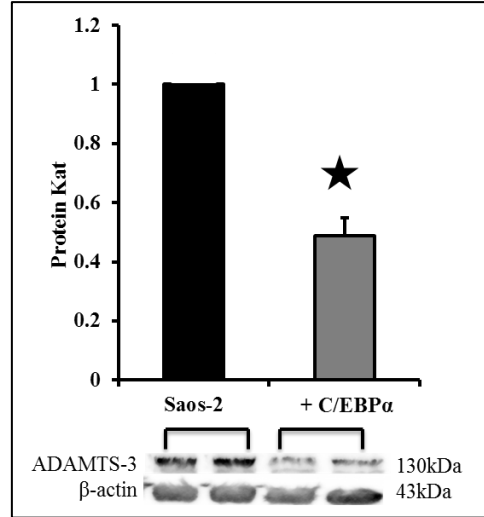
Şekil 4.58: Saos-2 hücrelerinde C/EBP α 'in 6-24-48 ve 72 saat inkübasyon süreleri sonunda geçici over ekspresyonunu gösteren sqRT-PCR jel görüntüsü

Yapılan değerlendirmeler incelendiğinde C/EBP α transkripsiyon faktörünün Saos-2 hücrelerinde 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda maksimum ~2 kat kadar aşırı ifade olduğu belirlendi (Şekil 4.59). Sonuç olarak belirtilen transkripsiyon faktörlerinin Saos-2 hücrelerinde geçici over ekspresyonlarının başarılı bir şekilde gerçekleştiği belirlendi. Maksimum ifade oldukları inkübasyon süresindeki örnekler RNA ve protein çalışmalarında kullanıldı.



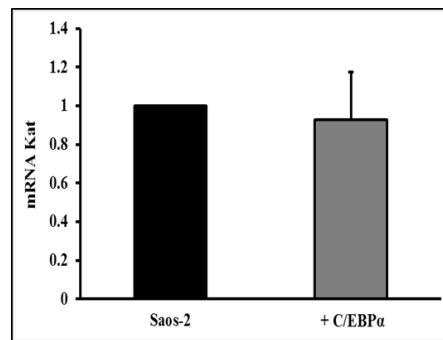
Şekil 4.59: Saos-2 hücrelerinde C/EBP α 'nın 6- 24- 48 ve 72 saat sonunda geçici over ekspresyonu sonucu C/EBP α 'nın maksimum ifade olduğu inkübasyon süresini gösteren grafik.

C/EBP α transkripsiyon faktörlerini taşıyan ekspresyon plazmitleri kalsiyum fosfat presipitasyonu ile geçici olarak Saos-2 hücrelerine transfekte edildikten sonra Bölüm 3.2.7.1'de anlatıldığı şekilde RIPA solüsyonu kullanılarak elde edilen proteinler 50 μ g konsantrasyonda olacak şekilde SDS-PAGE jelinde yürütüldü ve daha sonra 1 gece +4°C'de 15V'da membrana transfer edildi. Proteinlerin ADAMTS-3 antikoruna ile işaretlenebilmesi için membran 2 μ g/ml ADAMTS-3 antikoruna ile 1 gece +4°C'de inkübasyona bırakıldı. Ertesi gün membran yıkanarak oda sıcaklığında 1 saat, 1:5000 oranında sekonder antikoruna (anti-rabbit) tabi tutuldu. Oluşan bantların ECL çözeltisi kullanılarak görünür hale gelmesi sağlandı ve görüntüleme cihazı ile fotoğrafları çekildi (Şekil 4.60). Western blot yöntemi kullanılarak ADAMTS-3 proteinleri işaretlendi. Normalizasyon amacıyla β -aktin proteini kullanıldı. Sonuçlar Image J programı ile analiz edilerek değerlendirildi. Yapılan densitometrik analizler sonucunda C/EBP α transkripsiyon faktörünün protein düzeyinde ADAMTS-3 ekspresyonunu ~0.5 kata kadar azalttığı belirlendi (Şekil 4.60). Elde edilen bu sonuç istatistiksel olarak da anlamlı bulundu.



Şekil 4.60: Saos-2 hücrelerinde C/EBPα transkripsiyon faktörünün geçici over ekspresyonu ile *ADAMTS-3* geni protein düzeyine olan etkisini gösteren western blot membranı ve densitometrik analiz sonucu elde edilen sonuç grafiği.

C/EBPα transkripsiyon faktörünün *ADAMTS-3* mRNA düzeyine olan etkisinin belirlenebilmesi amacıyla bir önceki bölümde izole edilen RNA'lardan her bir deney grubu için 1 µg kullanılarak cDNA sentezi yapıldı. *ADAMTS-3*'ün ilgili zaman dilimindeki ekspresyon düzeyinin belirlenebilmesi amacıyla *ADAMTS-3*'e özgü tasarlanmış primerler kullanılarak en az 3 tekrarlı olacak şekilde qRT-PCR ile çalışıldı. Yapılan çalışmalar değerlendirildiğinde C/EBPα transkripsiyon faktörünün *ADAMTS-3* mRNA seviyesini azalttığı belirlendi (Şekil 4.61).

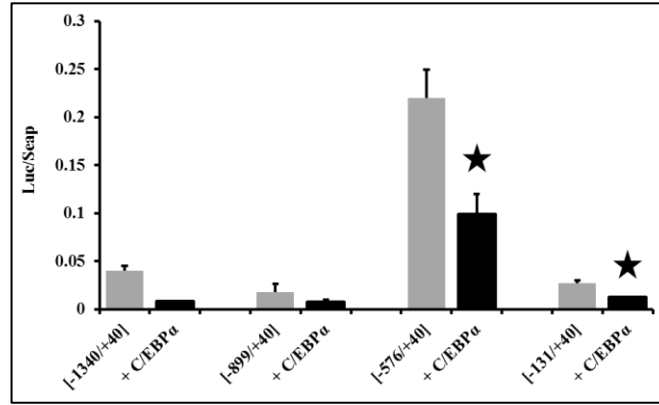


Şekil 4.61: Saos-2 hücrelerinde C/EBPα transkripsiyon faktörünün geçici over ekspresyonunun *ADAMTS-3* mRNA düzeyine olan etkisi

Kotransfeksiyon analizlerinde 1 µg *ADAMTS-3* promotor parçalarıyla birlikte, ilgili transkripsiyon faktörünün hücrede ektopik ekspresyonunu sağlayacak olan ekspresyon plazmitlerinden 1-2 µg ve normalizasyon amacıyla da 0,5 µg Seap kontrol

plazmiti ile birlikte Bölüm 3.2.5.1’de anlatıldığı şekilde kalsiyum fosfat presipitasyonu yöntemi ile geçici olarak Saos-2 hücrelerine transfekte edildi. Bazal aktivite sonuçları, ekspresyon vektörü transfekte edilen hücrelerdeki lusiferaz aktivitesi sonuçlarıyla karşılaştırılarak değerlendirildi.

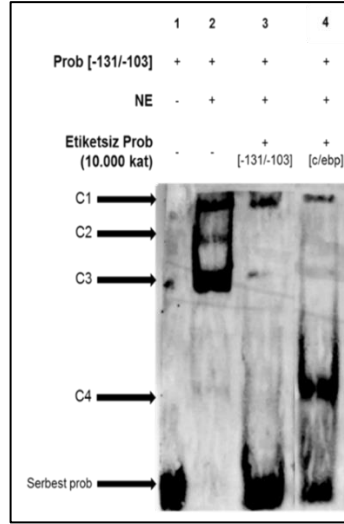
Saos-2 hücrelerinde yapılan kotransfeksiyonların sonuçları değerlendirildiğinde C/EBP α transkripsiyon faktörünün tüm promotor parçaları üzerinde; TS3[-1340/+40] için 0.2 kat, TS3[-899/+40] için 0.4 kat, TS3[-576/+40] için 0.4 kat ve TS3[-131/+40] için 0.4 kat oranında transfeksiyon etkinliğini azaltıcı yönde etki gösterdiği belirlendi. Özellikle TS3[-576/+40] ve TS3[-131/+40] promotor parçaları üzerindeki bu etki istatistiksel olarak da anlamlı bulundu (Şekil 4.62).



Şekil 4.62: Saos-2 hücrelerinde C/EBP α transkripsiyon faktörünün *ADAMTS-3* promotor aktivitesine üzerine etkilerini gösteren grafik

4.6.2.1.1 İnsan *ADAMTS-3* promotorunun EMSA deneyleri kullanılarak C/EBP α transkripsiyon faktörü fonksiyonel bağlanma analizinin belirlenmesi

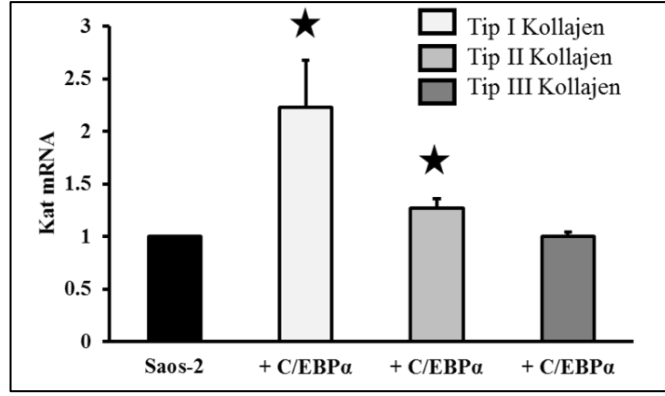
ADAMTS-3 promotoru için yapılan transkripsiyon faktörü bağlanma analizleri sonucunda transkripsiyon faktörü bağlanma motiflerinin bulunduğu bölgelere özgü tasarlanan problrar (Tablo 4.6) kullanılarak EMSA deneyleri gerçekleştirildi. Saos-2 nükleer ekstraktları kullanılarak, prob [-131/-103] ve etiketsiz prob C/EBP α 'nın 10.000 kat olacak şekilde yarıştırdığı EMSA neticesinde prob [-131/-103]'ün kullanılmasıyla oluşan 3 kompleksten C2 ve C3 C/EBP α ile yarışması sonucunda kayboldu. Bu sonuca göre promotora ait -131/-103'lük bu bölgede C/EBP α için bir bağlanma olduğu belirlendi (Şekil 4.63).



Şekil 4.63: Saos-2 nükleer ekstraktı ve prob [-131/-103] kullanılarak gerçekleştirilen C/EBP α yarışma EMSA sonucu.

4.6.2.1.2 Saos-2 Hücrelerinde Tip I-II-III Kollajen Genlerinin C/EBP α ile Regülasyonu

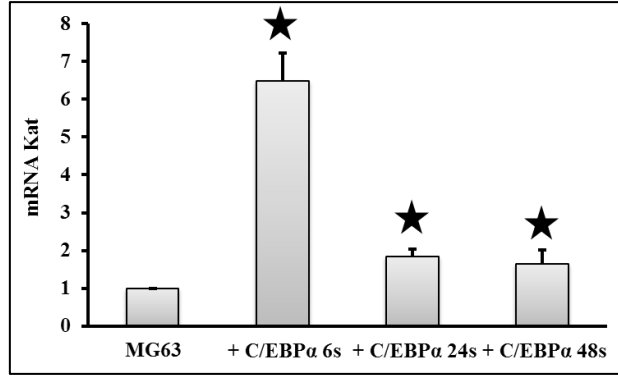
C/EBP α transkripsiyon faktörünün Tip I, II, III kollajenlerinin mRNA düzeyine olan etkisinin belirlenebilmesi amacıyla Bölüm 4.7' de izole edilen RNA'ların 1 μ g'ı kullanılarak Bölüm 3.2.6.4'te anlatıldığı şekilde cDNA sentezi yapıldı. Tip I, II, III kollajenlerinin ilgili zaman dilimlerindeki ekspresyon düzeyinin belirlenebilmesi amacıyla Tablo 4.5' te verilen, kollajenlere özgü tasarlanmış primerler kullanılarak Bölüm 3.2.6.5'te anlatıldığı şekilde birbirinden bağımsız 2 farklı deney kuruldu ve en az 3 tekrarlı olacak şekilde qRT-PCR çalışıldı. Sonuçlar Livak metoduna göre değerlendirildi. p değeri ≤ 0.05 olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Sonuçlar değerlendirildiğinde C/EBP α transkripsiyon faktörünün Tip I Kollajen ekspresyonunu 2 kata, Tip II Kollajen ekspresyonunu 1.3 kata ve Tip III kollajen ekspresyonunu yaklaşık 1.2 kata arttırdığı tespit edildi. Özellikle Tip I ve Tip II Kollajen'de elde edilen bu sonuçlar istatistiksel olarak da anlamlı bulundu (Şekil 4.64).



Şekil 4.64: Saos-2 hücrelerinde C/EBP α transkripsiyon faktörünün geçici over ekspresyonunun Tip I-II ve III Kollajen mRNA düzeylerine olan etkisi

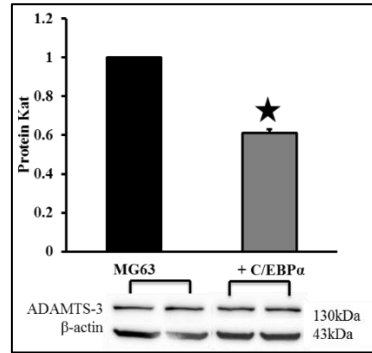
4.6.2.2 MG63 Hücrelerinde ADAMTS-3 Geninin C/EBP α ile Regülasyonu

Over ekspresyonu gerçekleştirilmiş olan MG63 hücrelerinden izole edilen RNA'ların 1 μ g'ı kullanılarak cDNA sentezi yapıldı. Belirtilen transkripsiyon faktörünün ilgili zaman dilimlerindeki ekspresyon düzeyi C/EBP α cDNA'larına özgün olarak tasarlanmış primerler (Tablo 4.5) kullanılarak qRT-PCR ile Bölüm 3.2.6.5'te anlatıldığı şekilde en az 3 tekrarlı olacak şekilde çalışıldı. Kontrol ve deney grubuna ait değerler Livak metoduna göre insan β -2 mikroglobulin geninin Ct değerine bölünerek normalize edildi ve sonrasında kat olarak belirlendi. Elde edilen sonuçlara göre C/EBP α transkripsiyon faktörünün MG63 hücrelerinde over ekspresyonunun en fazla 6 saat inkübasyon sonrasında yaklaşık 6,5 kata kadar arttığı belirlendi (Şekil 4.65). C/EBP α ekspresyonu için elde edilen bu sonuç istatistiksel olarak da anlamlı bulundu. Sonuç olarak belirtilen transkripsiyon faktörünün MG-63 hücrelerinde geçici over ekspresyonunun başarılı bir şekilde gerçekleştiği belirlenmiştir. Maksimum ifade oldukları inkübasyon süresinde elde edilen örnekler RNA ve protein çalışmalarında kullanıldı.



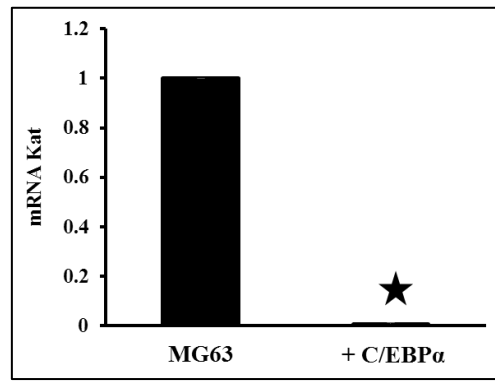
Şekil 4.65: MG-63 hücrelerinde C/EBPα'nın 6- 24 ve 48 saat sonunda geçici over ekspresyonu sonucu C/EBPα'nın maksimum ifade olduğu inkübasyon süresini gösteren grafik.

C/EBPα transkripsiyon faktörlerini taşıyan ekspresyon plazmitleri kalsiyum fosfat presipitasyonu ile geçici olarak MG-63 hücrelerine transfeksiyon yöntemi ile aktarıldıktan sonra RIPA solüsyonu kullanılarak elde edilen 50 µg yoğunluğundaki proteinler SDS-PAGE jelde yürütüldü (Şekil 4.66) Western blot yöntemi kullanılarak *ADAMTS-3* antikoru ile proteinler işaretlendi. Normalizasyon amacıyla β-aktin proteini kullanıldı. Sonuçlar Image J programı ile analiz edilerek değerlendirildi. Yapılan densitometrik analizler sonucunda C/EBPα transkripsiyon faktörünün *ADAMTS-3* protein düzeyini 0.6 kata kadar azalttığı belirlendi. Elde edilen azalma istatistiksel olarak da anlamlı bulundu (Şekil 4.66).



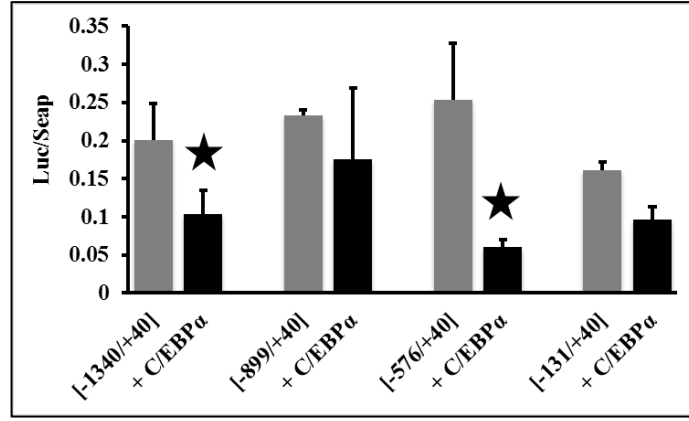
Şekil 4.66: MG-63 hücrelerinde C/EBPα transkripsiyon faktörünün geçici over ekspresyonu ile *ADAMTS-3* geni protein düzeyine olan etkisini gösteren western blot membranı ve densitometrik analiz sonucu elde edilen sonuç grafiği.

C/EBP α transkripsiyon faktörünün *ADAMTS-3* mRNA düzeyine olan etkisinin belirlenebilmesi amacıyla bir önceki bölümde izole edilen RNA'ların 1 μ g'ı kullanılarak cDNA sentezi yapıldı. *ADAMTS-3* ilgili zaman dilimlerindeki ekspresyon düzeyinin belirlenebilmesi amacıyla *ADAMTS-3*'e özgü tasarlanmış primerler kullanılarak birbirinden bağımsız 2 farklı deney kuruldu ve en az 3 tekrarlı olacak şekilde qRT-PCR çalışıldı. Yapılan çalışmalar değerlendirildiğinde C/EBP α transkripsiyon faktörünün *ADAMTS-3* mRNA ekspresyon seviyesini daha önce belirlenmiş olan maksimum ifade olduğu inkübasyon süresi sonunda neredeyse tamamen azalttığı istatistiksel olarak da anlamlı bulundu (Şekil 4.67).



Şekil 4.67: MG-63 hücrelerinde C/EBP α transkripsiyon faktörünün geçici over ekspresyonunun *ADAMTS-3* mRNA düzeyine olan etkisi.

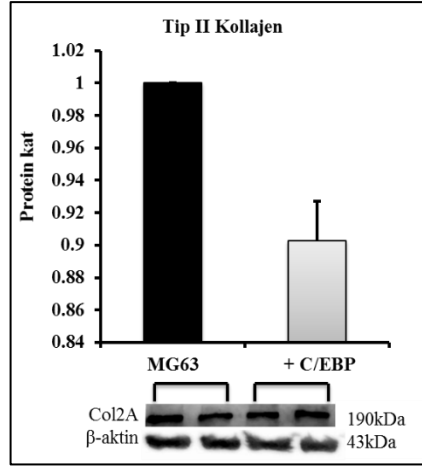
Kotransfeksiyon analizlerinde 1 μ g *ADAMTS-3* promotor parçalarıyla birlikte, ilgili transkripsiyon faktörünün MG63 hücrelerinde ektopik ekspresyonunu sağlayacak olan ekspresyon plazmitlerinden 1-2 μ g ve normalizasyon amacıyla da 0,5 μ g Seap kontrol plazmiti ile birlikte Bölüm 3.2.5.1'de anlatıldığı şekilde kalsiyum fosfat presipitasyonu yöntemi ile geçici olarak MG63 hücrelerine transfekte edildi. Bazal aktivite sonuçları, ekspresyon vektörü transfekte edilen hücrelerdeki lusiferaz aktivitesi sonuçlarıyla karşılaştırılarak değerlendirildi. MG63 hücrelerinde yapılan kotransfeksiyon çalışmalarının sonuçları değerlendirildiğinde uygulanan C/EBP α transkripsiyon faktörünün *ADAMTS-3*'e ait tüm promotor parçalarının promotor aktivitelerini azalttığı belirlendi. Özellikle TS3 [-1340/+40] ve TS3 [-899/+40] promotor parçalarındaki aktivite azalışı istatistiksel olarak da anlamlı bulundu (Şekil 4.68).



Şekil 4.68: MG63 hücrelerinde C/EBP α transkripsiyon faktörünün *ADAMTS-3* promotor aktivitesine etkileri

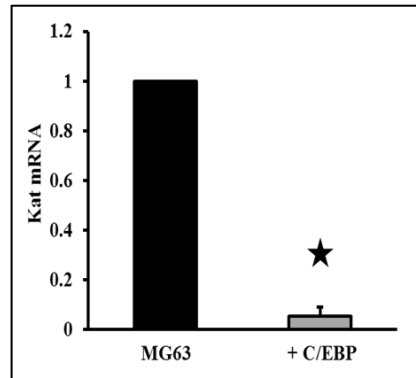
4.6.2.2.1 MG63 Hücrelerinde Tip I-II-III Kollajen Genlerinin C/EBP α ile Regülasyonu

Protein düzeyinde ekspresyon düzeylerinin belirlenmesi amacıyla, C/EBP α transkripsiyon faktörlerini taşıyan ekspresyon plazmitleri kalsiyum fosfat presipitasyonu ile geçici olarak MG63 hücrelerine transfeksiyon yöntemi ile aktarıldıktan sonra RIPA solüsyonu kullanılarak elde edilen proteinler (50 μ g) SDS-PAGE jelde yürütüldü (Şekil 4.69) Western blot yöntemi kullanılarak Tip II Kollajen proteinlerine özgü COL2A1 antikoru ile proteinler işaretlendi. Normalizasyon amacıyla β -aktin proteini kullanıldı. Sonuçlar Image J programı ile analiz edilerek değerlendirildi. Yapılan densitometrik analizler sonucunda C/EBP α transkripsiyon faktörünün Tip II Kollajen'in protein düzeyini yaklaşık 0.9 oranına kadar azalttığı belirlendi (Şekil 4.69).

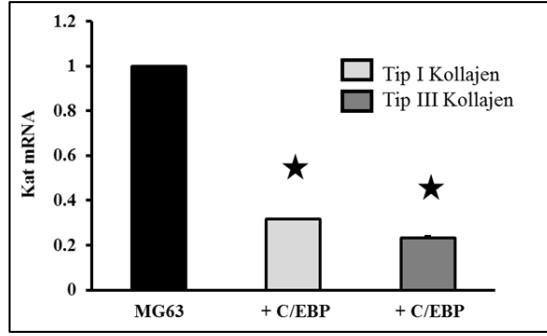


Şekil 4.69: MG63 hücrelerinde C/EBP α transkripsiyon faktörünün Tip II Kollajen'in protein düzeyine olan etkisini gösteren membran ve densitometrik analiz sonucu.

MG63 hücrelerinde C/EBP α aşırı ifadesi sonucu elde edilen hücrelerden Bölüm 3.2.6.1'de anlatıldığı şekilde kit prosedürüne uyularak RNA izole edildi. İzole edilen bu RNA'lardan 1 μ g olacak şekilde kullanılarak Bölüm 3.2.6.4'te anlatıldığı gibi cDNA sentezlendi. Tip I, II, III kollajenlerinin ilgili zaman dilimlerindeki ekspresyon düzeyinin belirlenebilmesi amacıyla Tablo 4.5' te verilen, kollajenlere özgü tasarlanmış primerler kullanılarak Bölüm 3.2.6.5'te anlatıldığı şekilde birbirinden bağımsız 2 farklı deney kuruldu ve en az 3 tekrarlı olacak şekilde qRT-PCR çalışıldı. Sonuçlar değerlendirildiğinde C/EBP α 'nın çalışılan tüm kollajen tiplerinde mRNA seviyesinde ekspresyonu azalttığı gözlemlendi. Tip II Kollajen ekspresyonunda 0.05 oranına kadar azalma gerçekleşirken (Şekil 4.70), Tip I Kollajen'de 0.3' e, Tip III Kollajen ekspresyonunda ise 0.2 oranına kadar bir azalma olduğu belirlendi. Alınan tüm sonuçların istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi (Şekil 4.71).



Şekil 4.70: MG63 hücrelerinde C/EBP α transkripsiyon faktörünün geçici over ekspresyonunun tip II Kollajenin mRNA düzeyine olan etkisi

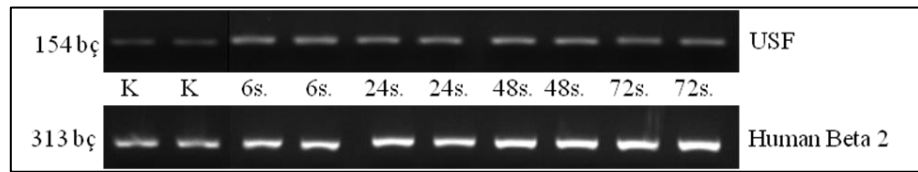


Şekil 4.71: MG63 hücrelerinde C/EBP α transkripsiyon faktörünün geçici over ekspresyonunun tip I-II-III Kollajenlerinin mRNA düzeyine olan etkisi

4.6.3 İnsan *ADAMTS-3* geninin USF Transkripsiyon Faktörü ile Regülasyonu

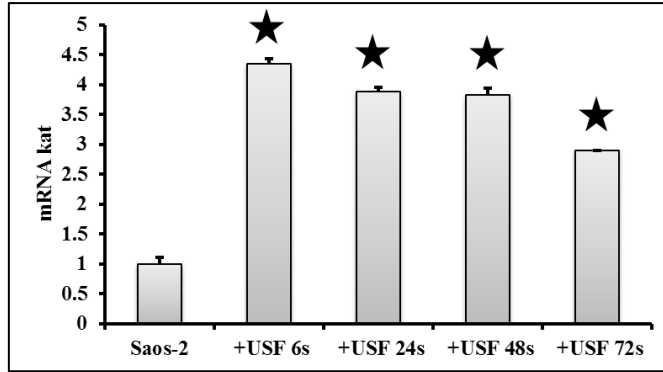
4.6.3.1 Saos-2 Hücrelerinde *ADAMTS-3* Geninin USF ile Regülasyonu

Bölüm 3.2.6.4'te anlatıldığı şekilde USF over ekspresyonu gerçekleştirilmiş olan hücrelerden izole edilen RNA'ların 1 μ g'ı kullanılarak cDNA sentezi yapıldı. Belirtilen transkripsiyon faktörlerinin ilgili zaman dilimlerindeki ekspresyon düzeyi USF cDNA'larına özgün olarak tasarlanmış primerler (Tablo 4.5) kullanılarak sqRT-PCR ile Bölüm 3.2.3.3'te anlatıldığı şekilde en az 3 tekrarlı olacak şekilde çalışıldı. Sonuçlar densitometrik analiz ile değerlendirildi (Şekil 4.72). Kontrol ve deney grubuna ait değerler Livak metoduna göre insan β -2 mikroglobulin geninin densitometrik değerine bölünerek normalize edildi ve sonrasında kat olarak belirlendi.



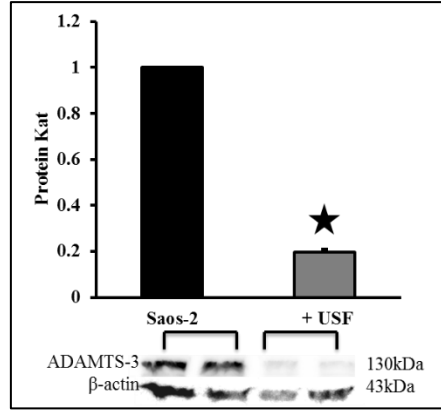
Şekil 4.72: Saos-2 hücrelerinde USF'nin 6- 24- 48 ve 72 saat inkübasyon süreleri sonunda geçici over ekspresyonunu gösteren sqRT-PCR jel görüntüsü

Yapılan değerlendirmeler incelendiğinde USF transkripsiyon faktörünün Saos-2 hücrelerinde 6 saatlik inkübasyon süresi sonunda 4 kata kadar maksimum ifade olduğu ve bu etkinin 72 saat sonuna kadar azalarak devam ettiği belirlendi (Şekil 4.73). Sonuç olarak belirtilen transkripsiyon faktörlerinin Saos-2 hücrelerinde geçici over ekspresyonlarının başarılı bir şekilde gerçekleştiği belirlendi. Maksimum ifade oldukları inkübasyon süresindeki örnekler RNA ve protein çalışmalarında kullanıldı.



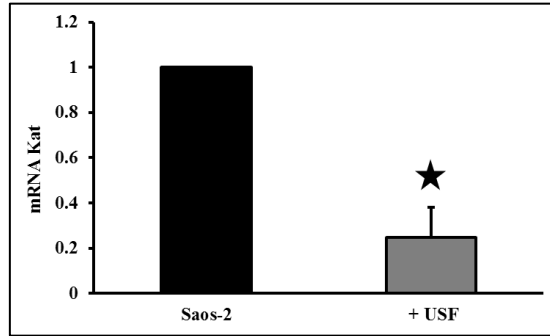
Şekil 4.73: Saos-2 hücrelerinde USF'nin 6- 24- 48 ve 72 saat sonunda geçici over ekspresyonu sonucu USF'nin maksimum ifade olduğu inkübasyon süresini gösteren grafik.

USF transkripsiyon faktörlerini taşıyan ekspresyon plazmitleri kalsiyum fosfat presipitasyonu ile geçici olarak Saos-2 hücrelerine transfekte edildikten sonra Bölüm 3.2.7.1'de anlatıldığı şekilde RIPA solüsyonu kullanılarak elde edilen proteinler 50 µg konsantrasyonda olacak şekilde SDS-PAGE jelinde yürütüldü ve daha sonra 1 gece +4°C'de 15V'da membrana transfer edildi. Proteinlerin *ADAMTS-3* antikoruna ile işaretlenebilmesi için membran 2 µg/ml *ADAMTS-3* antikoruna ile 1 gece +4°C'de inkübasyona bırakıldı. Ertesi gün membran yıkanarak; oda sıcaklığında 1 saat, 1:5000 oranında sekonder antikora (anti-rabbit) tabi tutuldu. Oluşan bantların ECL çözeltisi kullanılarak görünür hale gelmesi sağlandı ve görüntüleme cihazı ile fotoğrafları çekildi (Şekil 4.74). Western blot yöntemi kullanılarak *ADAMTS-3* proteinleri işaretlendi. Normalizasyon amacıyla β-aktin proteini kullanıldı. Sonuçlar Image J programı ile analiz edilerek değerlendirildi. Yapılan densitometrik analizler sonucunda USF transkripsiyon faktörünün protein düzeyinde *ADAMTS-3* ekspresyonunu ~0.2 kata kadar azalttığı belirlendi (Şekil 4.74). Elde edilen bu sonuç istatistiksel olarak da anlamlı bulundu.



Şekil 4.74: Saos-2 hücrelerinde USF transkripsiyon faktörünün geçici over ekspresyonu ile *ADAMTS-3* geni protein düzeyine olan etkisini gösteren western blot membranı ve densitometrik analiz sonucu elde edilen sonuç grafiği.

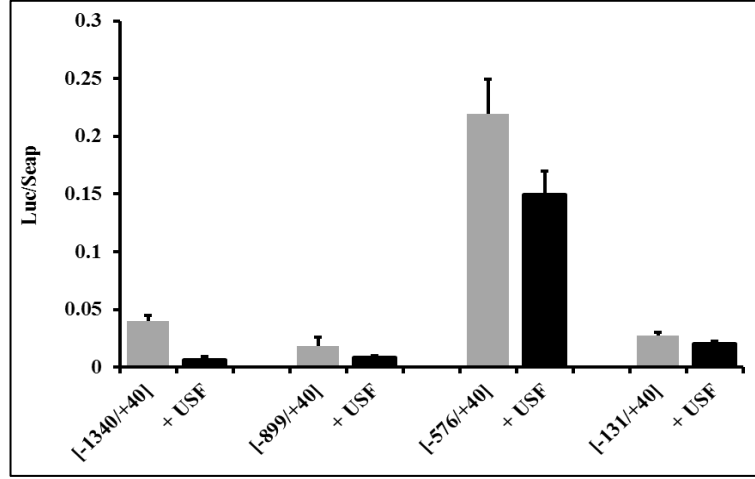
USF transkripsiyon faktörünün *ADAMTS-3* mRNA düzeyine olan etkisinin belirlenebilmesi amacıyla bir önceki bölümde izole edilen RNA'lardan her bir deney grubu için 1 µg kullanılarak cDNA sentezi yapıldı. *ADAMTS-3*'ün ilgili zaman dilimindeki ekspresyon düzeyinin belirlenebilmesi amacıyla *ADAMTS-3*'e özgü tasarlanmış primerler kullanılarak en az 3 tekrarlı olacak şekilde qRT-PCR ile çalışıldı. Yapılan çalışmalar değerlendirildiğinde USF transkripsiyon faktörünün *ADAMTS-3* mRNA seviyesinde 0.2 kata kadar azalttığı belirlendi (Şekil 4.75).



Şekil 4.75: Saos-2 hücrelerinde USF transkripsiyon faktörünün geçici over ekspresyonunun *ADAMTS-3* mRNA düzeyine olan etkisi

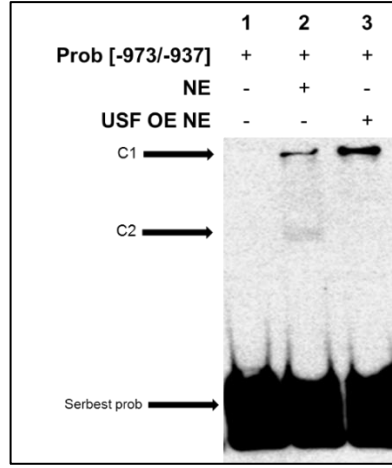
Kotransfeksiyon analizlerinde 1 µg *ADAMTS-3* promotor parçalarıyla birlikte, ilgili transkripsiyon faktörünün hücrede ektopik ekspresyonunu sağlayacak olan ekspresyon plazmitlerinden 1-2 µg ve normalizasyon amacıyla da 0,5 µg Seap kontrol plazmiti ile birlikte Bölüm 3.2.5.1'de anlatıldığı şekilde kalsiyum fosfat presipitasyonu yöntemi ile geçici olarak Saos-2 hücrelerine transfekte edildi. Bazal

aktivite sonuçları, ekspresyon vektörü transfekte edilen hücrelerdeki lusiferaz aktivitesi sonuçlarıyla karşılaştırılarak değerlendirildi. Saos-2 hücrelerinde yapılan kotransfeksiyonların sonuçları değerlendirildiğinde USF transkripsiyon faktörünün tüm promotor parçaları üzerinde; TS3[-1340/+40] için 0.2 kat, TS3[-899/+40] için 0.5 kat, TS3[-576/+40] için 0.7 kat ve TS3[-131/+40] için 0.7 kat oranında transfeksiyon etkinliğini azaltıcı yönde etki gösterdiği belirlendi (Şekil 4.76).



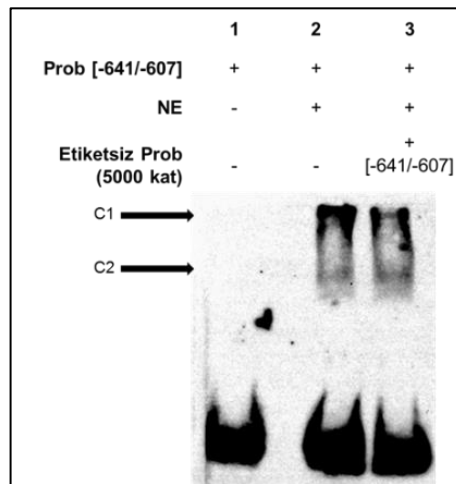
Şekil 4.76: Saos-2 hücrelerinde USF transkripsiyon faktörünün *ADAMTS-3* promotor aktivitesine etkileri

Saos-2 kontrol nükleer ekstraktları kullanılarak gerçekleştirilen ve biotinli prob [-973/-937]'ün reaksiyona katıldığı EMSA çalışması neticesinde oluşan C1 kompleksi, USF aşırı ifadesi yapılmış nükleer ekstraktlar reaksiyona katıldığında kuvvetlenmiş ve daha koyu bant vermiştir (Şekil 4.77). Bu sonuca göre USF aşırı ifadesinin gerçekleştiği ve promotora ait -973/-937'lük bu bölgede USF için bağlanma motifleri olduğu kesin olarak belirlendi



Şekil 4.77: Saos-2 nükleer ekstraktı ve biotinli prob [-973/-937] kullanılarak gerçekleştirilen EMSA sonucu.

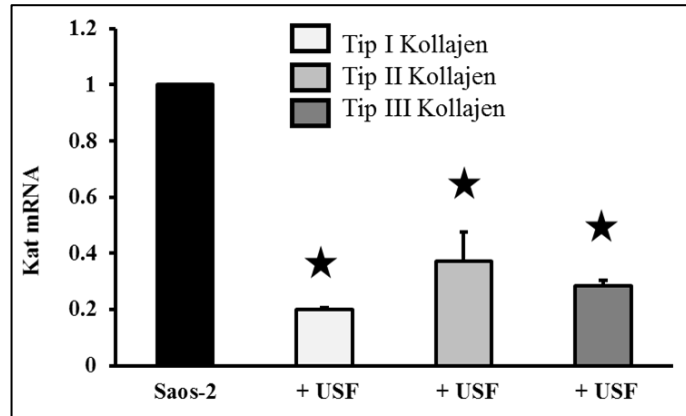
ADAMTS-3 promotoru için yapılan transkripsiyon faktörü bağlanma analizleri sonucunda transkripsiyon faktörü bağlanma motiflerinin bulunduğu bölgelere özgü tasarlanan proplar (Tablo 4.6) kullanılarak EMSA deneyleri gerçekleştirildi. Saos-2 nükleer ekstraktları kullanılarak, prob [-641/-607] ve etiketsiz prob [-641/607]'nin 5.000 kat olacak şekilde yarıştırdığı EMSA neticesinde prob [-641/-607]'nin kullanılmasıyla 2 kompleks oluştu. Bu komplekslerden C1 etiketsiz prob ile yarışması sonucunda kayboldu. Bu sonuca göre promotora ait -641/-607'lik bu bölgede kendi probu kullanıldığında DNA-protein etkileşiminin gerçekleştiği belirlendi (Şekil 4.78).



Şekil 4.78: Saos-2 nükleer ekstraktı ve prob [-641/-607] kullanılarak gerçekleştirilen yarışma EMSA sonucu.

4.6.3.2 Saos-2 Hücrelerinde Tip I-II-III Kollajen Genlerinin USF ile Regülasyonu

USF transkripsiyon faktörünün Tip I, II, III kollajenlerinin mRNA düzeyine olan etkisinin belirlenebilmesi amacıyla Bölüm 4.7' de izole edilen RNA'ların 1 µg'ı kullanılarak Bölüm 3.2.6.4'te anlatıldığı şekilde cDNA sentezi yapıldı. Tip I, II, III kollajenlerinin ilgili zaman dilimindeki ekspresyon düzeyinin belirlenebilmesi amacıyla Tablo 4.5' te verilen, kollajenlere özgü tasarlanmış primerler kullanılarak Bölüm 3.2.6.5'te anlatıldığı şekilde birbirinden bağımsız 2 farklı deney kuruldu ve en az 3 tekrarlı olacak şekilde qRT-PCR çalışıldı. Sonuçlar Livak metoduna göre değerlendirildi. p değeri ≤ 0.05 olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Sonuçlar değerlendirildiğinde USF transkripsiyon faktörünün Tip I Kollajen ekspresyonunu 0.2 kata, Tip II Kollajen ekspresyonunu 0.4 kata ve Tip III kollajen ekspresyonunu yaklaşık 0.2 kata düşürdüğü tespit edildi. Elde edilen bu sonuçlar istatistiksel olarak da anlamlı bulundu (Şekil 4.79).

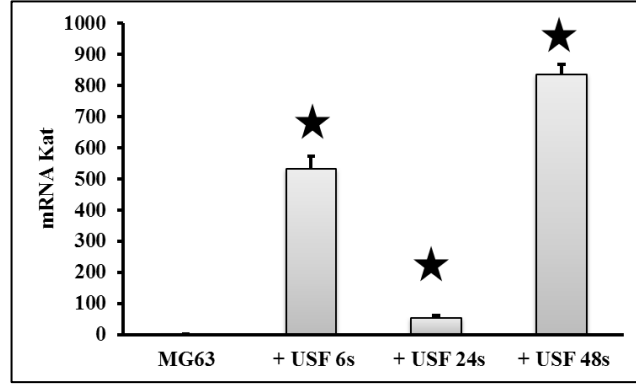


Şekil 4.79: Saos-2 hücrelerinde USF transkripsiyon faktörünün geçici over ekspresyonunun Tip I-II ve III Kollajen mRNA düzeylerine olan etkisi

4.6.3.3 MG63 Hücrelerinde ADAMTS-3 Geninin USF ile Regülasyonu

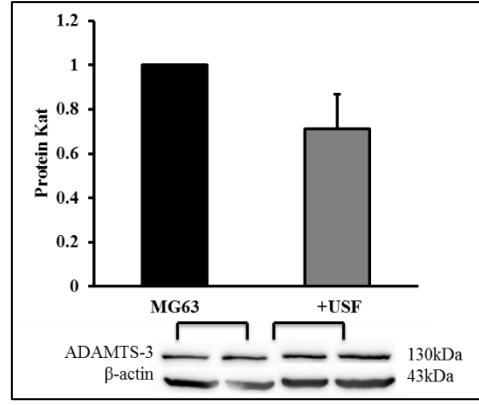
Over ekspresyonu gerçekleştirilmiş olan MG63 hücrelerinden izole edilen RNA'ların 1 µg'ı kullanılarak cDNA sentezi yapıldı. Belirtilen transkripsiyon faktörünün ilgili zaman dilimindeki ekspresyon düzeyi USF cDNA'larına özgün olarak tasarlanmış primerler (Tablo 4.5) kullanılarak qRT-PCR ile Bölüm 3.2.6.5'te

anlatıldığı şekilde en az 3 tekrarlı olacak şekilde çalışıldı. Kontrol ve deney grubuna ait değerler Livak metoduna göre insan β -2 mikroglobulin geninin Ct değerine bölünerek normalize edildi ve sonrasında kat olarak belirlendi. Değerlendirmelere göre USF transkripsiyon faktörünün over ekspresyonunun transfeksiyondan 6 saat sonra yaklaşık 500 kata kadar arttığı ve bu artışın istatistiksel olarak da anlamlı olduğu tespit edildi. USF ekspresyonunun en fazla 48 saat inkübasyon sonrasında yaklaşık 800 kata kadar arttığı belirlendi. Fakat bu etki istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (Şekil 4.80). USF ekspresyonu için elde edilen bu sonuç istatistiksel olarak da anlamlı bulundu. Sonuç olarak belirtilen transkripsiyon faktörünün MG-63 hücrelerinde geçici over ekspresyonunun başarılı bir şekilde gerçekleştiği belirlenmiştir. Maksimum ifade oldukları inkübasyon süresinde elde edilen örnekler RNA ve protein çalışmalarında kullanıldı.



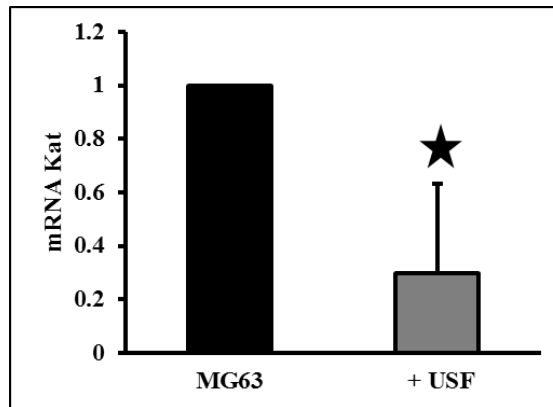
Şekil 4.80: MG-63 hücrelerinde USF'nin 6- 24- 48 ve 72 saat sonunda geçici over ekspresyonu sonucu USF'nin maksimum ifade olduğu inkübasyon süresini gösteren grafik

USF transkripsiyon faktörlerini taşıyan ekspresyon plazmitleri kalsiyum fosfat presipitasyonu ile geçici olarak MG-63 hücrelerine transfeksiyon yöntemi ile aktarıldıktan sonra RIPA solüsyonu kullanılarak elde edilen 50 μ g yoğunluğundaki proteinler SDS-PAGE jelde yürütüldü (Şekil 4.81) Western blot yöntemi kullanılarak *ADAMTS-3* antikorları ile proteinler işaretlendi. Normalizasyon amacıyla β -aktin proteini kullanıldı. Sonuçlar Image J programı ile analiz edilerek değerlendirildi. Yapılan densitometrik analizler sonucunda USF transkripsiyon faktörünün *ADAMTS-3* protein düzeyini 0.7 kata kadar azalttığı belirlendi. Elde edilen azalma istatistiksel olarak da anlamlı bulundu (Şekil 4.81).



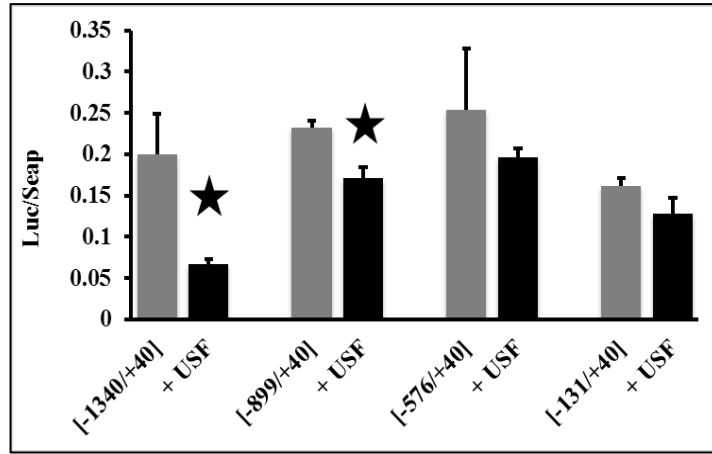
Şekil 4.81: MG-63 hücrelerinde USF transkripsiyon faktörünün geçici over ekspresyonu ile *ADAMTS-3* geni protein düzeyine olan etkisini gösteren western blot membranı ve densitometrik analiz sonucu elde edilen sonuç grafiği.

USF transkripsiyon faktörünün *ADAMTS-3* mRNA düzeyine olan etkisinin belirlenebilmesi amacıyla bir önceki bölümde izole edilen RNA'ların 1 µg'ı kullanılarak cDNA sentezi yapıldı. *ADAMTS-3* ilgili zaman dilimlerindeki ekspresyon düzeyinin belirlenebilmesi amacıyla *ADAMTS-3*'e özgü tasarlanmış primerler kullanılarak birbirinden bağımsız 2 farklı deney kuruldu ve en az 3 tekrarlı olacak şekilde qRT-PCR çalışıldı. Yapılan çalışmalar değerlendirildiğinde USF transkripsiyon faktörünün *ADAMTS-3* mRNA ekspresyon seviyesini daha önce belirlenmiş olan maksimum ifade olduğu inkübasyon süresi sonunda 0.3 kat kadar azalış olduğu, istatistiksel olarak da anlamlı bulundu (Şekil 4.82).



Şekil 4.82: MG-63 hücrelerinde USF transkripsiyon faktörünün geçici overekspresyonunun *ADAMTS-3* mRNA düzeyine olan etkisini gösteren grafik

Kotransfeksiyon analizlerinde 1 µg *ADAMTS-3* promotor parçalarıyla birlikte, ilgili transkripsiyon faktörünün MG63 hücrelerinde ektopik ekspresyonunu sağlayacak olan ekspresyon plazmitlerinden 1-2 µg ve normalizasyon amacıyla da 0,5 µg Seap kontrol plazmiti ile birlikte Bölüm 3.2.5.1’de anlatıldığı şekilde kalsiyum fosfat presipitasyonu yöntemi ile geçici olarak MG63 hücrelerine transfekte edildi. Bazal aktivite sonuçları, ekspresyon vektörü transfekte edilen hücrelerdeki lusiferaz aktivitesi sonuçlarıyla karşılaştırılarak değerlendirildi. MG63 hücrelerinde yapılan kotransfeksiyon çalışmalarının sonuçları değerlendirildiğinde uygulanan USF transkripsiyon faktörünün *ADAMTS-3*’e ait tüm promotor parçalarının promotor aktivitelerini azalttığı belirlendi. TS3 [-1340/+40] promotor parçasındaki 0.3 kata kadarki azalış ve TS3 [-899/+40]’ta meydana gelen azalış istatistiksel olarak da anlamlı bulundu (Şekil 4.83).

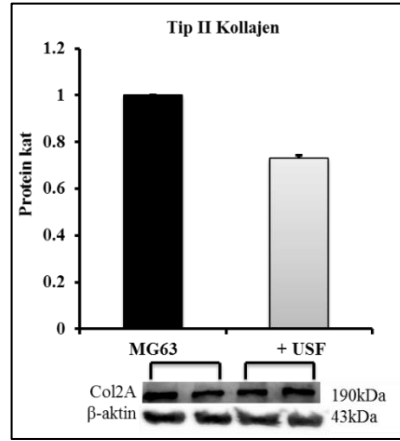


Şekil 4.83: MG63 hücrelerinde USF transkripsiyon faktörünün *ADAMTS-3* promotor aktivitesine etkileri

4.6.3.4 MG63 Hücrelerinde Tip I-II-III Kollajen Genlerinin USF ile Regülasyonu

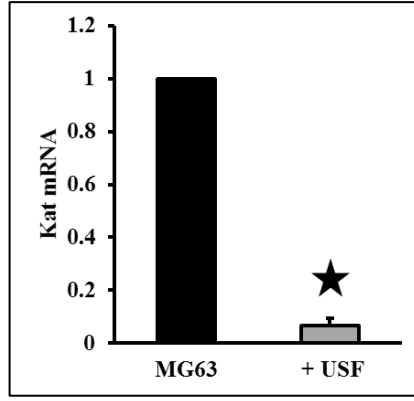
Protein düzeyinde ekspresyon düzeylerinin belirlenmesi amacıyla, USF transkripsiyon faktörlerini taşıyan ekspresyon plazmitleri kalsiyum fosfat presipitasyonu ile geçici olarak MG63 hücrelerine transfeksiyon yöntemi ile aktarıldıktan sonra RIPA solüsyonu kullanılarak elde edilen proteinler (50 µg) SDS-PAGE jelde yürütüldü (Şekil 4.84). Western blot yöntemi kullanılarak Tip II Kollajen proteinlerine özgü COL2A1 antikoruna ile proteinler işaretlendi. Normalizasyon

amacıyla β -aktin proteini kullanıldı. Sonuçlar Image J programı ile analiz edilerek değerlendirildi. Yapılan densitometrik analizler sonucunda USF transkripsiyon faktörünün Tip II Kollajen'in protein düzeyini yaklaşık 0.7 oranına kadar azalttığı belirlendi (Şekil 4.84).

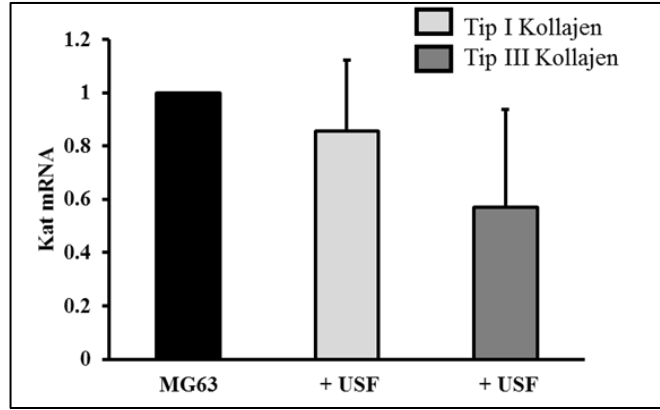


Şekil 4.84: MG63 hücrelerinde USF transkripsiyon faktörünün tip II kollajenin protein düzeyine olan etkisini gösteren membran ve densitometrik analiz sonucu.

MG63 hücrelerinde USF aşırı ifadesi sonucu elde edilen hücrelerden Bölüm 3.2.6.1'de anlatıldığı şekilde kit proedürüne uyularak RNA izole edildi. İzole edilen bu RNA'lardan 1 μ g olacak şekilde kullanılarak Bölüm 3.2.6.4'te anlatıldığı gibi cDNA sentezlendi. Tip I, II, III kollajenlerinin ilgili zaman dilimlerindeki ekspresyon düzeyinin belirlenebilmesi amacıyla Tablo 3.5' te verilen, kollajenlere özgü tasarlanmış primerler kullanılarak Bölüm 3.2.6.5'te anlatıldığı şekilde birbirinden bağımsız 2 farklı deney kuruldu ve en az 3 tekrarlı olacak şekilde qRT-PCR çalışıldı. Sonuçlar değerlendirildiğinde USF'nin çalışılan tüm kollajen tiplerinde mRNA seviyesinde ekspresyonu azalttığı gözlemlendi. Tip II Kollajen ekspresyonunda 0.05 oranına kadar azalma gerçekleşirken (Şekil 4.85), Tip I Kollajen'de 0.8' e, Tip III Kollajen ekspresyonunda ise 0.5 oranına kadar bir azalma olduğu belirlendi (Şekil 4.86). Özellikle Tip II kollajen için elde edilen sonuç istatistiksel olarak da anlamlı bulundu.



Şekil 4.85: MG63 hücrelerinde USF transkripsiyon faktörünün geçici over ekspresyonunun Tip II Kollajen'in mRNA düzeyine olan etkisi



Şekil 4.86: MG63 hücrelerinde USF transkripsiyon faktörünün geçici over ekspresyonunun Tip I ve Tip III Kollajenleri'nin mRNA düzeyine olan etkisi

5. SONUÇ VE TARTIŞMA

İlk kez beyin hücrelerinde cDNA'sı klonlanan *ADAMTS-3* geni, 4. kromozomun kısa kolunda bulunan büyük bir gendir. Temel görevinin özellikle tip II kollojen olgunlaşmasında N-terminal uçlarda bulunan peptitlerin uzaklaştırılması olduğu tespit edilen *ADAMTS-3*'e bu nedenle prokollojen II N-propeptidaz da denilmektedir [96]. Kollajen sentezinin düzenlenmesinden sorumlu olduğu düşünülen *ADAMTS-3*'ün en fazla insan cilt hücrelerinde, cilt fibroblastlarında, kıkırdakta, kemiklerde ve plasentada; en düşük ise akciğer, beyin ve kalpte ifade olduğu belirlenmiştir [26]. Yapılan çalışmalarda *ADAMTS-3*'ün prokollajen I ve II'ce zengin hücrelerde ekspresyonunun daha fazla olduğu ve dolayısıyla prokollajen II ile birlikte prokollajen I'in olgunlaşmasında da görevli olduğu sonucuna varılmıştır [26, 100]. Prokollajen N-propeptidaz aktivitesi sayesinde *ADAMTS-3*, embriyonik lenfogenез ve placentada damarlaşmasında, yetişkinlerde lenfotik dengenin sağlanmasında görev alır. Bununla beraber yara iyileşmesi, doku yenilenmesi ve enflamasyonla da ilişkilidir [108]. *ADAMTS-3* dinamik olarak omurilikte ekspre olmakta ve sinir uçlarında meydana gelen dallanmalardaki kollejen sentezinin düzenlenmesinde rol oynamaktadır [101]. *ADAMTS-3* ifadesi TNF alfa ve VEGF sitokinleri varlığında kollajen senteziyle bağlantılı olarak da incelenmiştir [104, 108].

İnsan *ADAMTS-3* geniyle ilgili literatürde birçok ekspresyon çalışması bulunurken, geninin transkripsiyonel olarak düzenlenmesine dair yapılmış bir çalışma henüz bulunmamaktadır. Transkripsiyonel düzenlenme bir genin ifadesinin ortaya çıkmasındaki en önemli kontrol basamağıdır. Gen ekspresyonunun farklı şekillerde düzenlenmesi, hücreler ve organlar bazında değişiklik göstermesi gen ekspresyonunun kontrolü ile mümkündür. *ADAMTS-3* geninin düzenlenmesinde rolü olan faktörlerin belirlenmesi ve incelenmesi *ADAMTS-3* geninin normal ve patolojik durumlardaki ekspresyonunun detaylıca anlaşılabilmesine ışık tutacaktır. Gen düzenlenmesinde görevli olan proteinler genin promotor bölgesine bağlanarak

transkripsiyonu kontrol ederler. Bu nedenle tez çalışmasında ilk olarak *ADAMTS-3* genine ait promotor bölgesi klonlanmıştır.

İnsan *ADAMTS-3* genine ait promotor bölgesinin klonlanabilmesi için ilk olarak gen bankasında kayıtlı olan *ADAMTS-3* (NM_014243) geninden yararlanılarak biyoinformatik olarak belirlenen translasyon başlangıç noktasından yaklaşık 1380 bp üst bölgede bulunan muhtemel promotor bölgesi pGEM-T easy vektörüne klonlandı. Promotor bölgesine ait yapılan biyoinformatik analizler neticesinde *ADAMTS-3* promotorunun %50 oranında GC içeriğine sahip olduğu ve özellikle translasyon başlangıç kodonundan itibaren (-326)-(-750)'inci bazlar arası CpG adası oluşumlarının yoğun olduğu belirlendi. Daha sonra transkripsiyonel aktivite çalışmalarında kullanılabilmesi amacı ile 5' ucu sabit tutulan promotor dizisinden, dört adet TS3 [-131/+40], TS3 [-576/+40], TS3 [-899/+40] ve TS3 [-1340/+40] promotor parçasının pMet Luc vektörüne alt klonlamaları gerçekleştirildi. Klonlamaların gerçekleştirilmesinden sonra tüm promotor parçaları dizi analizine gönderilerek doğruluğu tespit edildi, herhangi bir mutasyon olup olmadığı kontrol edildi. Dizileme sonuçları, gen bankasında bulunan dizi ve biyoinformatik olarak belirlenen muhtemel *ADAMTS-3* promotor bölgesi ile karşılaştırılarak düzenlenen *ADAMTS-3* promotoruna ait son dizi gen bankasına kayıt ettirildi ve Geçici Erişim Numarası (KX454214) temin edildi.

Son dizinin oluşturulmasından sonra yapılan biyoinformatik analizler ile ATG bölgesi ve transkripsiyonun başlangıç bölgesi (+1) belirlendi. Yapılan biyoinformatik analizler sonucu *ADAMTS-3* promotorunun TATA kutusu içermediği belirlendi. GC içeriği açısından oldukça zengin olduğu ve birçok farklı transkripsiyon faktörü bağlanma motifi içerdiği belirlendi. Mathinspector programı ile yapılan analizlerde en fazla bağlanma motifine sahip transkripsiyon faktörünün SP1/GC kutusu bağlanma motifi olduğu ve bununla birlikte E2F, kruppel benzeri bağlanma motifi, EGR/NGF, STAT, E-kutusu ve AP1 bağlanma motiflerinin de *ADAMTS-3* promotorunda mevcut olduğu tespit edildi (Şekil 4.9) (Bknz Ek-E).

İnsan *ADAMTS-3* geninin mRNA ve protein düzeyinde ekspresyonuna dair bilgi sahibi olmak ve tez çalışmasında hangi hücre modeli ile çalışmalara devam edileceğinin belirlemesi amacıyla Saos-2, MG63, HUVEC, Panc, PC3 ve Hep3B hücre hatlarında RT-PCR ve western blot yöntemleri kullanılarak ekspresyon

analizleri gerçekleştirildi. Bunların neticesinde mRNA ve protein düzeyinde en fazla ekspresyonun PC3 hücre hattında olduğu tespit edildi. Literatürde daha önce yapılan çalışmalarda plasentada, ciltte, omurilikte, lenfte, sinir hücrelerinde, iskelet kası hücrelerinde, kalpte, kıkırdak ve kemikte ADAMTS-3 ekspresyonu olduğu belirlenmiştir. Tez çalışmasında model hücre hattı olarak kullanılmak üzere ise yine ADAMTS-3 ekspresyonunun gözlemlendiği osteosarkoma hücre modelleri Saos-2 ve MG63 hücreleri tercih edildi. İki osteosarkoma hücre modelinin temel olarak farklı olmayacağı düşünülse de Saos-2 ve MG63 hücreleri hem birbirlerinden hem de osteoblast hücrelerinden özellikle proliferasyon kinetikleri ve kemik dokusu üretimleri açısından farklılık gösterirler. Saos-2 hücreleri en olgun osteoblastik fenotipi sergilerken alkalen fosfataz, osteokalsin, kemik sialoprotein, dekorin ve kollajen I ve III gibi kemik markırları için pozitif sonuç vermektedirler. MG63 hücreleri ise hem olgun hem genç osteoblastik özellikleri taşımalarıyla şimdiye kadar belirlenmiş en heterojen yapıdaki osteosarkoma hücreleridirler [155]. Bu iki hücre hattının birbirinden farklı kemik profilleri sergilemeleri, kemik dokuda kollajen sentezinin yüksek olması ve ADAMTS-3'ün, prokollajenlerin kollajene olgunlaşmasındaki rolü göz önünde bulundurularak ve ayrıca kemik kanserinde ADAMTS-3 'ün düzenlenmesine dair literatürde aydınlatılmış bir çalışma olmaması sebebi ile osteosarkoma hücre hatları Saos-2 ve MG63 çalışmada kullanılmak üzere seçildi.

pMet Luc haberci vektörüne klonlaması yapılan TS3 [-131/+40], TS3 [-576/+40], TS3 [-899/+40] ve TS3 [-1340/+40] promotor parçalara ait transkripsiyonel aktivite sonuçları değerlendirildiğinde her iki hücre hattında tüm promotor parçaları aktivite gösterdi. En yüksek bazal aktivite iki hücre hattı için de 616 bç'lik TS3 [-576/+40] promotor parçasında gözlemlendi. Bu sonuç kor promotor bölgesinin transkripsiyon başlangıç noktasından yaklaşık 576 bç yukarıda bulunabileceğini ortaya koydu. TS3 [-879/+40] ve TS3 [-1340/+40] promotor parçaları MG63 hücrelerinde Saos-2 hücrelerine göre 2.5 kat daha fazla aktivite sergilemiştir. Bu fark muhtemelen ADAMTS-3 promotorunun osteosarkoma modellerinde, hücreye özgün olarak düzenlendiği şeklinde yorumlanabilir. Gen ifadesinin düzenlenmesi, genin düzenleyici dizisi olan promotor bölgesine özgün proteinlerin bağlanmasıyla gerçekleşmektedir. Genlerin baskılanmasını veya daha fazla ifade olmasını sağlayan bu düzenleyici proteinlere transkripsiyon faktörleri denilmektedir. Binlerce farklı transkripsiyon faktörü bulunmaktadır. Bu proteinler DNA dizisi üzerinde bulunan

özgün DNA bağlanma motiflerini tanıyarak bağlanmaktadır. Özellikle SP1, C/EBP α ve USF transkripsiyon faktörlerine ait bağlanma dizilerinin *ADAMTS-3* promotörü üzerinde çok sayıda oldukları biyoinformatik analizlerle tespit edilmiştir.

Bu transkripsiyon faktörlerinden en fazla bağlanma motifi içeren SP1 transkripsiyon faktörü özellikle *ADAMTS-3* gibi GC bazları açısından zengin promotora sahip genlerin regülasyonu için oldukça önemlidir. SP1 transkripsiyon faktörünün transkripsiyonu aktive etmesi ya da baskılaması fizyolojik ve patolojik birçok uyarana bağlıdır. GC-zengin motiflere yüksek afinite ile bağlanarak hücre büyümesi, apoptoz, hücre farklılaşması ve immun cevabı gibi birçok süreçte görev alan sayısız genin ifadesini düzenlemektedir [110]. Özellikle ekstraselüler matriks genleriyle bağlantılı birçok genin düzenlenmesine katılmaktadır [115, 116]. Saos-2 ve MG63 hücrelerinde elde edilen sonuçlar neticesinde aşırı ifade oldukları RT-PCR ile tespit edilen transkripsiyon faktörlerinin *ADAMTS-3* ekspresyonuna olan etkileri detaylandırıldı. SP1'in iki hücre hattında da *ADAMTS-3* mRNA ve protein ekspresyon seviyelerini yaklaşık yarı yarıya düşürdüğü ve tüm promotor parçaları üzerinde transkripsiyonel aktiviteyi azaltıcı yönde etki ettiği belirlendi. Saos-2 hücrelerinde SP1 en yüksek etkiyle TS3 [-576/+40] için 0.7 kat oranında transfeksiyon etkinliğini azaltırken, MG63 hücrelerinde en küçük promotor parçası üzerinde arttırıcı yönde etki göstermiştir. Muhtemelen [-131/+40]'lık bu bölgede bulunan farklı bir bağlanma dizisinin SP1'in *ADAMTS-3* transkripsiyonel aktivitesini arttırıcı yönde etki etmesine neden olduğu sonucuna varılabilir. Saos-2 hücrelerinde gerçekleştirilen DNA-protein bağlanma analizlerinin neticesinde *ADAMTS-3* promotörünün gerçekten de SP1 bağlanma motifleri içerdiği ve SP1 transkripsiyon faktörünün bu özgün bölgelere bağlandığı tespit edildi. *ADAMTS* genleriyle yapılan çeşitli çalışmalara baktığımızda; SP1'in susturulduğu durumda insan *ADAMTS17* geninin ekspresyonunun baskılandığı [120], bir başka çalışmada ise SP1'in düşük oksijen koşullarında *ADAMTS1*'in ekspresyonunu arttırdığı [121] belirlenmiştir. SP1'in kemik metabolizmasında meydana gelen tahribatlarla da bağlantılı olduğu ve kollajen genlerinin düzenlenmesinde de etkin olabileceği yapılan çalışmalarda ortaya konmuştur [122, 123].

Çalışmada kullanılan bir diğer transkripsiyon faktörü olan C/EBP α , genlerin promotor bölgesinde bulunan CCAAT bağlanma motiflerini özgün olarak tanıyıp ve bağlanır. C/EBP α , hücrelerel farklılaşmanın düzenlenmesinde, enflamasyon veya akut

faz cevabında görevli genlerin regülasyonunda rol alır. Sonuçlarımız değerlendirildiğinde, hem Saos-2 hem de MG63 hücrelerinde C/EBP α 'nın ADAMTS-3 ekspresyonunu mRNA ve protein seviyesinde düşürdüğü tespit edildi. Promotor aktiviteleri üzerinde de C/EBP α tüm promotor konstraktları üzerinde ve her iki hücre hattında transkripsiyonel aktiviteyi azaltıcı yönde etki göstermiştir. Saos-2 hücrelerinde gerçekleştirilen EMSA deneylerinde elde edilen sonuçlar (-131/-103) bölgesinde muhtemel bir C/EBP bağlanma bölgesi olabileceğini işaret etmiştir. Literatürde damarlaşmanın düzenlenmesinde rol alan insan ADAMTS1 geninin C/EBP ile düzenlenmesiyle dolaşım hastalıkları için yeni bir tedavi yöntemi geliştirilebileceği yapılan çalışmalarda ortaya konmuştur [129]. Ayrıca kıkırdak dokusunda aşırı ifade olduğu durumlarda C/EBP β 'nin matriks degradasyonuna neden olduğu tespit edilmiştir [134]. C/EBP α aynı zamanda kemik yıkımında da görev almaktadır.

DNA dizisinde E-kutusu motiflerini tanıyarak bağlanan USF transkripsiyon faktörü embriyonik gelişimde, birçok genin transkripsiyonel düzenlenmesinde tek başına ya da diğer transkripsiyon faktörleri etkileşerek etkisini göstermektedir. USF'nin tümör baskılayıcı bir protein olduğu da yapılan çalışmalarda gösterilmiştir [151]. ADAMTS-3 ekspresyonuyla ilgili yaptığımız çalışmalarda Saos-2 ve MG63 osteosarkoma modellerinde USF'nin mRNA, protein ve transkripsiyonel aktivite seviyesinde ADAMTS-3 ekspresyonunu azalttığı tespit edildi. E-kutusu bağlanma motiflerinin yoğun olarak bulunduğu bölgeler için gerçekleştirilen EMSA sonuçlarına göre de USF'nin ADAMTS-3 promotoruna birçok bölgeden bağlandığı Saos-2 hücrelerinde belirlendi. Daha önce gerçekleştirilen bir çalışmada, USF ADAMTS gen ailesinin ilk üyesi olan ADAMTS-1'in transkripsiyonel regülasyonuna katılarak promotor aktivitesini arttırdığı ortaya konmuştur [152].

ADAMTS-3'ün en önemli rolü tip II kollajenin N-terminal ucundaki propeptit dizlerinin uzaklaştırılmasıdır. Bunun yanısıra, tip I kollajen molekülünün de olgunlaşmasında görev aldığı literatürde bulunmaktadır [95]. Bu bilgiler ışığında çalışmanın bu bölümünde osteosarkoma hücrelerinde aşırı iadesi gerçekleştirilen SP1, C/EBP α ve USF transkripsiyon faktörlerinin tip I, II ve III kollajenleri üzerindeki etkileri araştırıldı. Saos-2 ve MG63 hücreleri hücre karakteri, gen ekspresyon profilleri ve kollajen içerikleri açısından farklılıklar gösterirler. Saos-2 ve MG63 hücreleri farklı kollajen tipleri için farklı ekspresyon paternleri sergilerler. Tip I kollajen Saos-2 hücrelerinde daha fazla ekspre olurken, tip II ve tip III kollajenin MG63 hücrelerinde

daha fazla ekspre olmaktadır [155]. Bağ dokunun temel kollajen tipi, tip II kollajenden oluşmaktadır. Tip II kollajen özellikle kıkırdakta olmak üzere kıkırdak ve kemikte fibriller formda oluşum gösterir. Dolayısıyla tip II kollajen ekspresyonunda meydana gelen düşüş kıkırdak ve kemik dokuda çeşitli hastalıklara neden olmaktadır [156-160]. Tip I kollajen, tendon, kemik, cilt, kornea ve kan damarlarının duvarında fibriller formda kollajen yapılanması oluşturur. Tip III kollajen ise, ciltte ve damarlarda tip I kollajenle birlikte heterotipik fibriller oluşturur [36, 37].

Tez çalışmasında elde ettiğimiz sonuçlara göre SP1 Saos-2 hücrelerinde tip I ve III kollajen ekspresyonunu mRNA düzeyinde azaltırken, tip II kollajen ekspresyon düzeyini arttırmaktadır. MG63 hücrelerinde ise SP1'in overekspresyonu sonrası tip I, II ve III kollajenlerin mRNA seviyesinde ekspresyonu azalmaktadır. Protein seviyesinde ise tip II kollajenle yapılan deneylerde tip II kollajen seviyesinin azaldığı görülmüştür. Literatürde yapılan çalışmalarda SP1'in varlığında tip II kollajen ekspresyonunun negatif yönde düzenlendiği belirlemiştir. Bunun aksine ciltte, tendonlarda ve kemikte bağ dokunun kararlılığı açısından tip I kollajen ekspresyonunun pozitif olarak düzenlendiği, SP1 ile yapılan çalışmalarda ortaya konmuştur [161]. Tip III kollajen miktarının baskılandığı durumlarda, bağ dokunun vücudun çeşitli kısımlarında zayıflamasının Ehlers-Danlos sendromuna neden olduğu yapılan bir çalışmada belirlenmiştir [162].

C/EBP α ile gerçekleştirdiğimiz kollajen ekspresyon çalışmalarında, Saos-2 hücrelerinde C/EBP α overekspresyonu tip I ve tip II kollajen ekspresyonunu arttırırken tip III kollajen ekspresyonunu azaltmıştır. MG63 hücrelerinde ise üç kollajen tipi için de mRNA seviyesinde ekspresyonu azaltmış, protein seviyesinde ise tip II kollajen ekspresyonunu baskılamıştır. Daha önce literatürde gerçekleştirilen çalışmalarda, C/EBP β direk olarak MMP-13 promotoruna bağlanarak MMP-13 ekspresyonunu eklem iltihabı taşıyan bölgedeki kıkırdak hücrelerinde düzenlediği ortaya konmuştur [95]. Karaciğer hücreleri, kan hücreleri, yağ hücreleri ve akciğer hücrelerinin kullanıldığı bir kanser araştırma çalışmasında C/EBP α 'nın baskılandığı durumlarda birçok kanser türünün baskılanabileceği ortaya konmuştur [163].

USF transkripsiyon faktörünün aşırı ifade edildiği durumlarda elde ettiğimiz sonuçlara göre her iki osteosarkoma hücre modelinde tip I, II ve III kollajen ifadelerinin azaldığı sonucuna varılmıştır. Literatüre bakıldığında tip I kollajene ait

promotor bölgesindeki USF bağlanma motifleri olan E-kutusu motiflerinde meydana getirilen mutasyonlar sonucu elde edilen sonuçlarda USF1 ve USF2'nin tip I kollajen regülayonunu arttırıcı yönde düzenlediği bulunmuştur [157]. Sığır granülosa hücrelerinde yapılan çalışmada, ADAMTS1 promotorunda bulunan USF bağlanma bölgelerinde kuvvetli DNA-protein komplekslerinin oluştuğu ve bu komplekslerin USF transkripsiyon faktörünün bağlanmasıyla meydana geldiği belirlenmiştir. USF'nin bağlanması neticesinde ADAMTS1'in transkripsiyonel aktivitesinin azaldığı tespit edilmiştir [152].

Sonuç olarak, literatürde ilk kez bu çalışmada insan ADAMTS-3 genine ait transkripsiyonel düzenlenme aydınlatılmıştır. SP1, C/EBP α ve USF transkripsiyon faktörlerinin varlığında ADAMTS-3 ekspresyonunun azaldığı, benzer şekilde ADAMTS-3 geninin işlediği temel kollajen tipi olan tip II kollajenin ifadesinin de söz konusu transkripsiyon faktörlerinin etkisiyle azaldığı osteosarkoma hücre modellerinde ortaya konmuştur.

Elde edilen bu sonuçların kemik kanseri metabolizmasının düzenlenmesine ve kollajenle bağlantılı dokulardaki anormalliklerin aydınlatılmasına ışık tutacağı düşünülmektedir.

6. KAYNAKLAR

- [1] Baumann, S. and Hennet, T., “Collagen accumulation in osteosarcoma cells lacking GLT25D1 collagen galactosyl transferase”, *J. Biol. Chem.*, 291, 18514, (2016).
- [2] Myllyharju, J. and Kivirikko, K.I., “Collagens, modifying enzymes and their mutations in humans, flies and worms”, *TRENDS in Genetics.*, 20, 1, (2004).
- [3] Natalizio, B. J., Muniz, L. C., Arhin, G. K., Wilusz, J. and Lutz, C. S., “Upstream elements present in the 3'-untranslated region of collagen genes influence the processing efficiency of overlapping polyadenylation signals”, *The Journal Of Biological Chemistry*, 277, 45, 42733–42740, (2002).
- [4] Sunay, F. B., Türkoğlu, S. A. ve Köçkar F., “ADAMTS ailesi ve anti-anjiogenetik ADAMTS1”, *Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 38, 1, 49-56, (2012).
- [5] Darwin, J. P. “COLLAGENS: Molecular biology, diseases, and potentials for therapy”, *Annu. Rev. Biochem.*, 64, 403-34, (1995).
- [6] Wada, H., Okuyama, M., Satoh, N. and Zhange, S., “Molecular evolution of fibrillar collagen in chordates, with implications for the evolution of vertebrate skeletons and chordate phylogeny”, *Evolution & Development*, 8, 4, 370–377, (2006).
- [7] Urabe, K., Jingushi, S., Ikenoue, T., Okazaki, K., Sakai, H., Li C., et al., “Immature osteoblastic cells express the pro- α 2(XI) collagen gene during bone formation in vitro and in vivo”, *Journal of Orthopaedic Research*, 19, 1013-1020, (2001).
- [8] Pace, J. M., Corrado, M., Missero, C., and Byers, P.H., “Identification, characterization and expression analysis of a new fibrillar collagen gene, COL27A1”, *Matrix Biol.*, 22, 1, 3-14, (2003).

- [9] Jenkins, E., Moss, J. B., Pace, J. M. and Bridgewater L. C., “The new collagen gene *COL27A1* contains SOX9-responsive enhancer elements”, *Matrix Biol.*, 24, 3, 177–184, (2005).
- [10] Bekhouche, M. and Colige, A., “The procollagen N-proteinases ADAMTS2, 3 and 14 in pathophysiology”, *Matrix Biology*, 44–46, (2015).
- [11] Olderøy, M.Ø., Lilledahl, M.B., Beckwith, M.S., Melvik, J.E., Reinholt, F., et al., “Biochemical and structural characterization of neocartilage formed by mesenchymal stem cells in alginate hydrogels”, *PLoS ONE*, 9, 3, e91662, (2014).
- [12] Huey, D. J., Hu, J. C. and Athanasiou, K. A., “Unlike bone, cartilage regeneration remains elusive”, *Science*, 16, 338(6109), 917–921, (2012).
- [13] Hoshi, O., “Observation of collagen fibrils produced by osteosarcoma cells using atomic force microscopy.”, *Med Mol Morphol.*, 47, 201–206, (2014).
- [14] Leung, M. K., Fessler, L. I., Greenberg, D. B. and Fessler, J. H., “Separate amino and carboxyl procollagen peptidases in chick embryo tendon”, *J. Biol. Chem.*, 254, 224-232, (1979).
- [15] Hulmes, D. J., Kadler, K. E., Mould, A. P., Hojima, Y., Holmes, D. F., Cummings, C., Chapman, J. A. and Prockop, D. J., “Pleomorphisin type I collagen fibrils produced by persistence of the procollagen Npropeptide”, *J. Mol. Biol.*, 210, 337-345, (1989).
- [16] Kadler, K. E., Hojima, Y. and Prockop, D. J., “Assembly of collagen fibrils de novo by cleavage of the type I pC-collagen with procollagen Cproteinase. Assay of critical concentration demonstrates that collagen selfassembly is a classical example of an entropy-driven process”, *J. Biol. Chem.*, 262, 15696-15701, (1987).
- [17] Miyahara, M., Njieha, F. K. and Prockop, D. J., “Formation of collagen fibrils in vitro by cleavage of procollagen with procollagen proteinases”, *J. Biol. Chem.*, 257, 8442-8448, (1982).
- [18] Miyahara, M., Hayashi, K., Berger, J., Tanzawa, K., Njieha, F. K., Trelstad, R. L. and Prockop, D. J., “Formation of collagen fibrils by enzymic cleavage of precursors of type I collagen in vitro”, *J. Biol. Chem.*, 259, 9891-9898, (1984).

- [19]Hojima, Y., van der Rest, M. and Prockop, D. J., "Type I procollagen carboxyl-terminal proteinase from chick embryo tendons. Purification and characterization", *J. Biol. Chem.*, 260, 15996-16003, (1985).
- [20]Hartigan, N., Garrigue-Antar, L. and Kadler, K. E., "Bone morphogenetic protein-1 (BMP-1). identification of the minimal domain structure for procollagen C-proteinase activity", *J. Biol. Chem.*, 278, 18045- 18049, (2003).
- [21]Kessler, E., Takahara, K., Biniaminov, L., Brusel, M. and Greenspan, D. S., "Bone morphogenetic protein-1: the type I procollagen C proteinase", *Science*, 271, 360-362, (1996).
- [22]Li, S. W., Sieron, A. L., Fertala, A., Hojima, Y., Arnold, W. V. and Prockop, D. J., "The C-proteinase that processes procollagens to fibrillar collagens is identical to the protein previously identified as bone morphogenic protein-1", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93, 5127-5130, (1996).
- [23]Scott, I. C., Blitz, I. L., Pappano, W. N., Imamura, Y., Clark, T. G., Steiglit, B. M., Thomas, C. L., Maas, S. A., Takahara, K., Cho, K. W. et al., "Mammalian BMP-1/Tolloid-related metalloproteinases, including novel family member mammalian Tolloid-like 2, have differential enzymatic activities and distributions of expression relevant to patterning and skeleto genesis", *Dev. Biol.*, 213, 283-300, (1999).
- [24]Colige, A., Li, S. W., Sieron, A. L., Nusgens, B. V., Prockop, D. J. And Lapiere, C. M., "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. USA*, 94, 2374-2379, (1997).
- [25]Colige, A., Vandenberghe, I., Thiry, M., Lambert, C. A., Van Beeumen, J., Li, S. W., Prockop, D. J., Lapiere, C. M. and Nusgens, B. V., "Cloning and characterization of *ADAMTS-14*, a novel ADAMTS displaying high homology with *ADAMTS-2* and *ADAMTS-3*", *J. Biol. Chem.* 277, 5756-5766, (2002).
- [26]Fernandes, R. J., Hirohata, S., Engle, J. M., Colige, A., Cohn, D. H., Eyre, D. R. and Apte, S. S., "Procollagen II amino propeptide processing by *ADAMTS-3*. Insights on dermatosparaxis", *J. Biol. Chem.*, 276, 31502- 31509, (2001).
- [27]Gopalakrishnan, B., Wang, W.-M. and Greenspan, D. S., "Biosynthetic processing of the pro-alpha1(V)pro-alpha2(V)pro-alpha3(V) procollagen heterotrimer", *J. Biol. Chem.*, 279, 30904-30912, (2004).

- [28] Unsold, C., Pappano, W. N., Imamura, Y., Steiglit, B. M. and Greenspan, D. S., “Biosynthetic processing of the pro-alpha 1(V)2pro-alpha 2(V) collagen heterotrimer by bone morphogenetic protein-1 and furin-like proprotein convertases”, *J. Biol. Chem.*, 277, 5596-5602, (2002).
- [29] Leighton, M. and Kadler, K. E., “Paired basic/Furin-like proprotein convertase cleavage of Pro-BMP-1 in the trans-Golgi network”, *J. Biol. Chem.*, 278, 18478-18484, (2003).
- [30] Canty, E. G. and Kadler, K. E., “Procollagen trafficking, processing and fibrillogenesis”, *Journal of Cell Science*, 118, 1341-1353, (2005).
- [31] Imamura, Y., Steiglit, B. M. and Greenspan, D. S., “Bone morphogenetic protein-1 processes the NH₂-terminal propeptide, and a furin-like proprotein convertase processes the COOH-terminal propeptide of pro- α 1(V) collagen”, *The Journal Of Biological Chemistry*, 273, 42, 27511–27517, (1998).
- [32] Koch, M., Laub, F., Zhou P., Hahn, R. A., Tanaka S., Burgeson, R. E., et al., “Collagen XXIV, a vertebrate fibrillar collagen with structural features of invertebrate collagens: selective expression in developing cornea and bone”, *J. Biol. Chem.*, 278, 43236–43244, (2003).
- [33] Plumb, D. A., Dhir, V., Mironov, A., Ferrara, L., Poulsom, R. and Kadler, K. E., “Collagen XXVII is developmentally regulated and forms thin fibrillar structures distinct from those of classical vertebrate fibrillar collagens”, *The Journal Of Biological Chemistry*, 282, 17, 12791–12795, (2007).
- [34] Chu, M. L., Myers, J. C., Bernard, M. P., Ding, J.F. and Ramirez F., “Cloning and characterization of five overlapping cDNAs specific for the human pro α 1(I) collagen chain”, *Nucleic Acids Res.*, 10, 5925-5934, (1982).
- [35] Myers, J. C., Chu, M. L., Faro, S. H., Clark, W. J., Prockop, D. J. and Ramirez, F., “Cloning a cDNA for the pro-alpha 2 chain of human type I collagen”, *Proc Natl Acad Sci USA*, 78, 6, 3516-20, (1981).
- [36] Miller, E. J. and Matukas, V.J., “Chick cartilage collagen: a new type of alpha 1 chain not present in bone or skin of the species”, *Proc Natl Acad Sci USA*, 64, 4, 1264-8, (1969).

- [37] Cameron, G. J., Alberts, I. L., Laing, J. H. and Wess, T. J., "Structure of type I and type III heterotypic collagen fibrils: an X-ray diffraction study", *J Struct Biol.*, 137, (1-2), 15-22, (2002).
- [38] Timpl, R. and Brown, J.C., "Supramolecular assembly of basement membranes", *Bioessays*, 18, 2, 123-32, (1996).
- [39] Timpl, R., Wiedemann, H., van Delden, V., Furthmayr, H. and Kühn, K., "A network model for the organization of type IV collagen molecules in basement membranes", *Eur J Biochem.*, 120, 2, 203-11, (1981).
- [40] Birk, G. T. and DeLee, J. C., "Osteochondral injuries. Clinical findings", *Clin Sports Med.*, 20, 2, 279-86, (2001).
- [41] Kessler, E., Fichard, A., Chanut-Delalande, H., Brusel, M. and Ruggiero, F., "Bone morphogenetic protein-1 (BMP-1) mediates C-terminal processing of procollagen V homotrimer", *The Journal Of Biological Chemistry*, 276, 29, 27051–27057, (2001).
- [42] Kielty, C. M., Whittaker, S.P., Grant, M. E. and Shuttleworth, C. A., "Attachment of human vascular smooth muscles cells to intact microfibrillar assemblies of collagen VI and fibrillin", *J Cell Sci.*, 103, 2, 445-51, (1992).
- [43] Keene, D.R., Sakai, L.Y., Bächinger, H.P. and Burgeson, R. E., "Type III collagen can be present on banded collagen fibrils regardless of fibril diameter", *J Cell Biol.*, 105, 5, 2393-402, (1987).
- [44] Kapoor, R., Bornstein, P. and Sage, E.H., "Type VIII collagen from bovine Descemet's membrane: structural characterization of a triple-helical domain", *Biochemistry*, 25, 13, 3930-7, (1986).
- [45] Kapoor, R., Sakai, L. Y., Funk, S., Roux, E., Bornstein, P. and Sage, E.H., "Type VIII collagen has a restricted distribution in specialized extracellular matrices", *J Cell Biol.*, 107, 2, 721-30, (1988).
- [46] Stephan, S., Sherratt, M.J., Hodson, N., Shuttleworth, C.A. and Kielty, C. M., "Expression and supramolecular assembly of recombinant alpha1(VIII) and alpha2(VIII) collagen homotrimers", *J Biol Chem.*, 279, 20, 21469-77, (2004).

- [47]Olsen, B. R., “Collagen IX”, *Int J Biochem Cell Biol*, 29, 4, 555-8, (1997).
- [48]Shimokomaki, M., Wright, D. W., Irwin, M. H., van der Rest, M. and Mayne, R., “The structure and macromolecular organization of type IX collagen in cartilage”, *Ann NY Acad Sci.*, 580, 1-7, (1990).
- [49]Kwan, A. P., Cummings, C. E., Chapman, J. A. and Grant, M. E., “Macromolecular organization of chicken type X collagen in vitro”, *J Cell Biol.*, 114, 3, 597-604, (1991).
- [50]Mendler, M., Eich-Bender, S. G., Vaughan, L., Winterhalter, K. H. and Bruckner, P., “Cartilage contains mixed fibrils of collagen types II, IX, and XI”, *J Cell Biol.*, 108, 1, 191-7, (1989).
- [51]Keene, D. R., Sakai, L. Y. and Burgeson, R. E., “Human bone contains type III collagen, type VI collagen, and fibrillin: type III collagen is present on specific fibers that may mediate attachment of tendons, ligaments, and periosteum to calcified bone cortex”, *J Histochem Cytochem*, 39, 1, 59-69, (1991).
- [52]Nishiyama, T., McDonough, A. M., Bruns, R. R. and Burgeson, R. E., “Type XII and XIV collagens mediate interactions between banded collagen fibers in vitro and may modulate extracellular matrix deformability”, *J Biol Chem.*, 269, 45, 28193-9, (1994).
- [53]Zhang, Y., Song, S., Fong, C. C., Tsang, C. H., Yang, Z. and Yang, M., “cDNA microarray analysis of gene expression profiles in human fibroblast cells irradiated with red light”, *J Invest Dermatol*, 120, 849–857, (2003).
- [54]Latvanlehto, A., Snellman, A., Tu, H. and Pihlajaniemi, T., “Type XIII collagen and some other transmembrane collagens contain two separate coiled-coil motifs, which may function as independent oligomerization domains”, *J Biol Chem.*, 278, 39, 37590-9, (2003).
- [55]Young, B. B., Gordon, M. K. and Birk, D. E., “Expression of type XIV collagen in developing chicken tendons: association with assembly and growth of collagen fibrils”, *Dev Dyn.*, 217, 4, 430-9, (2000).

- [56] Young, B. B., Zhang, G., Koch, M. and Birk, D. E., “The roles of types XII and XIV collagen in fibrillogenesis and matrix assembly in the developing cornea”, *J Cell Biochem.*, 87, 2, 208-20, (2002).
- [57] Myers, J. C., Dion, A. S., Abraham, V. and Amenta, P. S., “Type XV collagen exhibits a widespread distribution in human tissues but a distinct localization in basement membrane zones”, *Cell Tissue Res.*, 286, 3, 493-505, (1996).
- [58] Ramchandran, R., Dhanabal, M., Volk, R., Waterman, M. J., Segal, M., Lu, H., Knebelmann, B. and Sukhatme, V. P., “Antiangiogenic activity of restin, NC10 domain of human collagen XV: comparison to endostatin”, *Biochem Biophys Res Commun.*, 255, 3, 735-9, (1999).
- [59] Kassner, A., Hansen, U., Miosge, N., Reinhardt, D. P., Aigner, T., Bruckner-Tuderman, L., et al., “Discrete integration of collagen XVI into tissue-specific collagen fibrils or beaded microfibrils”, *Matrix Biol.*, 22, 2, 131-43, (2003).
- [60] Hopkinson, S. B., Findlay, K., deHart, G. W. and Jones, J. C., “Interaction of BP180 (type XVII collagen) and alpha6 integrin is necessary for stabilization of hemidesmosome structure”, *J Invest Dermatol*, 111, 6, 1015-22, (1998).
- [61] Sasaki, S., Zhou, B., Fan, W. W., Kim, Y., Barker, D. F., Denison, J. C., et al., “Expression of mRNA for type IV collagen alpha1, alpha5 and alpha6 chains by cultured dermal fibroblasts from patients with X-linked Alport syndrome”, *Matrix Biol.*, 17, 4, 279-91, (1998).
- [62] Myers, J. C., Li, D., Amenta, P. S., Clark, C. C., Nagaswami, C. and Weisel, J. W., “Type XIX collagen purified from human umbilical cord is characterized by multiple sharp kinks delineating collagenous subdomains and by intermolecular aggregates via globular, disulfide-linked, and heparin-binding amino termini”, *J Biol Chem.*, 278, 34, 32047-57, (2003).
- [63] Koch, M., Foley, J. E., Hahn, R., Zhou, P., Burgeson, R. E., Gerecke, D. R. and Gordon, M. K., “ $\alpha 1(\text{XX})$ collagen, a new member of the collagen subfamily, fibril-associated collagens with interrupted triple helices”, *J. Biol. Chem.*, 276, 23120–23126, (2001).

- [64] Fitzgerald, J. and Bateman, J. F., “A new FACIT of the collagen family: COL21A1”, *FEBS Lett.*, 505, 275–280, (2001).
- [65] Koch, M., Schulze, J., Hansen, U., Ashwodt, T., Keene, D. R., Brunken, W. J., Burgeson, R. E., Bruckner, P. and Bruckner-Tuderman, L., “A novel marker of tissue junctions, collagen XXII”, *J Biol Chem.*, 279, 21, 22514–21, (2004).
- [66] Banyard, J., Bao, L. and Zetter, B. R., “Type XXIII collagen, a new transmembrane collagen identified in metastatic tumor cells”, *J. Biol. Chem.*, 278, 20989–20994, (2003).
- [67] Hashimoto, T., Wakabayashi, T., Watanabe, A., Kowa, H., Hosoda, R. and Nakamura, A., “CLAC: a novel Alzheimer amyloid plaque component derived from a transmembrane precursor, CLAC-P/ collagen type XXV”, *EMBO J.*, 21, 1524–1534, (2002).
- [68] Sato, K., Yomogida, K., Wada, T., Yorihuzi, T., Nishimune, Y., Hosokawa, N. and Nagata, K., “Type XXVI collagen, a new member of the collagen family, is specifically expressed in the testis and ovary”, *J. Biol. Chem.*, 277, 37678–37684, (2002).
- [69] Akada, T., Yamazaki, T., Miyashita, H., Niizeki, O., Abe, M., Sato, A., Satomi, S. and Sato, Y., “Puromycin insensitive leucyl-specific aminopeptidase (PILSAP) is involved in the activation of endothelial integrins”, *J Cell Physiol.*, 193, 2, 253–62, (2002).
- [70] Boot-Handford, R. P., Tuckwell, D. S., Plumb, D. A., Rock, C. F. and Poulsom, R., “A novel and highly conserved collagen [proa1(XXVII)] with a unique expression pattern and unusual molecular characteristics establishes a new clade within the vertebrate fibrillar collagen family”, *J. Biol. Chem.*, 278, 31067–31077, (2003).
- [71] Tang, B. L., “ADAMTS: a novel family of extracellular matrix proteases”, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 33, 33–44, (2001).
- [72] Kuno, K., Kanada, N., Nakashima, E., Fujiki, F., Ichimura, F. and Matsushima, K., “Molecular cloning of a gene encoding a new type of metalloproteinase-

- disintegrin family protein with thrombospondin motifs as an inflammation associated gene”, *The Journal of Biological Chemistry*, 272, 1, 556, (1997).
- [73]Porter, S., Clark, I. M., Kevorkian, L. and Edwards R. D., “The ADAMTS metalloproteinases”, *Biochem. J.*, 386, 15–27, (2005).
- [74]Apte, S. S., “A disintegrin-like and metalloprotease (reprolysin type) with thrombospondin type 1 motifs: the ADAMTS family”, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 36, 981–985, (2004).
- [75]Bolz, H., Ramirez, A., von Brederlow, B. and Kubisch, C., “Characterization of ADAMTS14, a novel member of the ADAMTS metalloproteinase family”, *Biochimica et Biophysica Acta.*, 1522, 221-225, (2001).
- [76]Greenspan, D. and Wang, W.M., “Overview of ADAMTS Proteinases and ADAMTS 2”, *Proteases in Biology and Disease*, 4, 261-282, (2005).
- [77]Seals, D. F. And Courtneidge, S. A., “The ADAMs family of metalloproteases: multidomain proteins with multiple functions”, *Genes Dev.*, 17, 1, 7-30, (2003).
- [78]Takeda, S., “Three-dimensional domain architecture of the ADAM family proteinases”, *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 20, 2, 146-152, (2009).
- [79]Wise, R. J., Barr, P. J., Wong, P. A., Kiefer, M. C., Brake, A. J. and Kaufman, R. J., “Expression of a human proprotein processing enzyme: correct cleavage of the von Willebrand factor precursor at a paired basic amino acid site”, *Proc Natl Acad Sci USA*, 87, 23, 9378-82, (1990).
- [80]Roebroek, A. J., Schalken, J. A., Leunissen, J. A., Onnekink, C., Bloemers, H. P. and Van De Ven, W. J., “Evolutionary conserved close linkage of the c-fes/fps proto-oncogene and genetic sequences encoding a receptor-like protein”, *Embo j.*, 5, 9, 2197-202, (1986).
- [81]Kiefer, M. C., Tucker, J. E., Joh, R., Landsberg, K. E., Saltman, D. and Barr, P. J., “Identification of a second human subtilisin-like protease gene in the fes/fps region of chromosome 15”, *DNA Cell Biol.*, 10, 10, 757-69, (1991).
- [82]Hooper, N. M. and Lendeckel, U., “The ADAM Family of Proteases”, *Springer US*, 4, 261-282, (2005).

- [83] Colige, A., Beschin, A., Samyn, B., Goebels, Y., Van Beeumen, J., Nusgens, B.V. and Lapiere, C.M., “Characterization and partial amino acid sequencing of a 107-kDa procollagen I N-proteinase purified by affinity chromatography on immobilized type XIV collagen”, *J. Biol. Chem.*, 270, 16724–16730, (1995).
- [84] Yilmaz K., Çimtay İ., Elitok B., Metin N., Yaman İ. ve Saki C. E., “Bir Kuzuda Dermatosparaxis Olgusu”, *Tr. J. of Veterinary and Animal Sciences*, 22, 83-88, (1998).
- [85] Tuderman, L. and Prockop, D. J., “Procollagen N-proteinase. Properties of the enzyme purified from chick embryo tendons”, *Eur. J. Biochem.*, 125, 545-549, (1982).
- [86] Wang, W. M., Lee, S., Steiglitz, B. M., Scott, I. C., Lebares, C. C., Allen, M. L., Brenner, M. C., Takahara, K. and Greenspan, D. S., “Transforming growth factor-beta induces secretion of activated ADAMTS-2. A procollagen III N-proteinase”, *J. Biol. Chem.* 278, 19549-19557, (2003).
- [87] Goff, C. L., Somerville, R. P. T., Kesteloot, F., Powell, K., Birk, D. E., Colige, A. C., et al., “Regulation of procollagen amino-propeptide processing during mouse embryogenesis by specialization of homologous ADAMTS proteases: insights on collagen biosynthesis and dermatosparaxis”, *Development.*, 133, 1587-1596, (2006).
- [88] Lapiere, C. M. and Nusgens, B. V., “Ehlers-Danlos type VII-C, or human dermatosparaxis”, The offspring of a union between basic and clinical research. *Arch. Dermatol*, 129, 1316-1319, (1993).
- [89] Alper, M. ve Kockar F., “IL-6 upregulates a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 2 (ADAMTS-2) in human osteosarcoma cells mediated by JNK pathway”, *Mol Cell Biochem.*, 393:165–175, (2014).
- [90] Alper, M., Aydemir, A. T. ve 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, 321–327, (2015).
- [91] Li, S.-W., Arita, M., Fertala, A., Bao, Y., Kopen, G. C., Langsjö, T. K., Hyttinen, M. M., Helminen, H. D., and Prockop, D. J., “Transgenic mice with inactive

alleles for procollagen N-proteinase (ADAMTS-2) develop fragile skin and male sterility”, *Biochem. J.* 355, 271–278, (2001).

- [92] Kawahara, C., Forster, T., Chapman, K., Carr, A. and Loughlin, J., “Genetic association analysis of the IGFBP7, ADAMTS3, and IL8 genes as the potential osteoarthritis susceptibility that maps to chromosome 4q”, *Ann Rheum Dis.*, 64, 474–476, (2005).
- [93] Bevitt, D. J., Mohamed, Catterall, J. B., Li, Z., Arris, C. E., Hiscott, P., et al., “Expression of ADAMTS metalloproteinases in the retinal pigment epithelium”, *Biochimica et Biophysica Acta.*, 1626, 83– 91, (2003).
- [94] Porter, S., Scott, S. D., Sassoon, E. M., Williams, M. R., Jones, J. L., Girling, A. C., et al., “Dysregulated Expression of Adamalysin -Thrombospondin Genes in Human Breast Carcinoma”, *Clin Cancer Res.*, 10, 2429-2440, (2004).
- [95] Lee, C. W., Hwang, I., Park, C. S., Duk, Lee, H., Park, D. W., Kang, S. J., et al., “Expression of ADAMTS-2, -3, -13, and -14 in culprit coronary lesions in patients with acute myocardial infarction or stable angina”, *J Thromb Thrombolysis*, 33, 362–370, (2012).
- [96] Asakawa, K., Abe, G. and Kawakami, K., “Cellular dissection of the spinal cord motor column by BAC transgenesis and gene trapping in zebrafish”, *Frontiers in Neural Circuits*, 7, 100, 1-14, (2013).
- [97] Janssen, L., Dupont, L., Bekhouche, M., Noel, A., Leduc, C. and Voz, M., “ADAMTS3 activity is mandatory for embryonic lymphangiogenesis and regulates placental angiogenesis”, *Angiogenesis*, 19, 1, 53–65, (2015).
- [98] Alberts, B., Johnson A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Walter, P. *Molecular Biology Of The Cell.5th Edition*. New York: Garland Science, (2008).
- [99] Dynan, W. S. and Tjian, R., “The promoter-specific transcription factor Sp1 binds to upstream sequences in the SV40 early promoter”, *Cell*, 35, 79–87, (1983).
- [100] Dynan, W. S. and Tjian R., “Isolation of transcription factors that discriminate between different promoters recognized by RNA polymerase II.”, *Cell*, 32, 669–680, (1983).

- [101] Dynan, W. S. and Tjian, R., “Control of eukaryotic messenger RNA synthesis by sequence-specific DNA-binding proteins”, *Nature*, 316, 774–778, (1985).
- [102] Briggs, M. R., Kadonaga, J. T., Bell, S. P., et al., “Purification and biochemical characterization of the promoter- specific transcription factor, Sp1”, *Science*, 234, 47–52, (1986).
- [103] Kadonaga, J. T., Carner, K. R., Masiarz, F. R., et al., “Isolation of cDNA encoding transcription factor Sp1 and functional analysis of the DNA binding domain”, *Cell*, 51, 1079–1090, (1987).
- [104] Kadonaga, J. T., Courey, A. J., Ladika, J., et al., “Distinct regions of Sp1 modulate DNA binding and transcriptional activation”, *Science*, 242, 1566–1570, (1988).
- [105] Kadonaga, J. T., Jones, K. A. and Tjian, R., “Promoter-specific activation of RNA polymerase II transcription by Sp1”, *TIBS*, 11, 20–23, (1986).
- [106] Bucher, P., “Weight matrix descriptions of four eukaryotic RNA polymerase II promoter elements derived from 502 unrelated promoter sequences”, *J Mol Biol.*, 212, 563–578, (1990).
- [107] Pavletich, N. P. and Pabo, C. O., “Zinc finger-DNA recognition: crystal structure of a Zif268-DNA complex at 2.1Å”, *Science*, 252, 809–817, (1991).
- [108] Narayan, V. A., Kriwacki, R. W. and Caradonna, J. P., “Structures of zinc finger domains from transcription factor Sp1. Insights into sequence-specific protein-DNA recognition”, *J Biol Chem.*, 272, 7801–7809, (1997).
- [109] Safe, S. and Abdelrahim, M., “Sp transcription factor family and its role in cancer”, *European Journal of Cancer*, 41, 2438–2448, (2005).
- [110] Weizmann Institute of Science, Human gene data bank [online] <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=SP1>, (2016).
- [111] Sylvester, J., Ahmad, R. and Zafarullah, M., “Role of Sp1 transcription factor in Interleukin-1-induced ADAMTS-4 (aggrecanase-1) gene expression in human articular chondrocytes”, *Rheumatol Int*, 33: 517–522, (2013).
- [112] Wang, X. X., Li, C., Liang, A., Peng, Y., Sun, J. and Huang, D., et al., “Regulation of a disintegrins and metalloproteinase with thrombospondin motifs 7 during inflammation in nucleus pulposus (NP) cells: role of AP-1, Sp1 and NF- κ B signaling”, *Inflamm. Res.*, 1-12, (2016).

- [113] Mertens-Talcott, S. U., Noratto, G. D., Li, X., Angel-Morales, G., Bertoldi, M. C. and Safe, S., “Betulinic acid decreases ER-negative breast cancer cell growth in vitro and in vivo: Role of Sp transcription factors and microRNA-27a:ZB TB10”, *Mol Carcinog*, 52: 591–602, (2013).
- [114] Zhao, Y., Zhang, W., Guo, Z., et al., “Inhibition of the transcription factor Sp1 suppresses colon cancer stem cell growth and induces apoptosis in vitro and in nude mouse xenografts”, *Oncol Rep.*, 30, 1782–1792, (2013).
- [115] Noratto, G. D., Jutooru, I., Safe, S., Angel-Morales, G. and Mertens-Talcott, S. U., “The drug resistance suppression induced by curcuminoids in colon cancer SW-480 cells is mediated by reactive oxygen species-induced disruption of the microRNA-27a-ZBTB10-Sp axis”, *Mol Nutr Food Res.*, 57, 1638–1648, (2013).
- [116] Jia, Z., Gao, S., Rabet, N.M., De Geyter, C. and Zhang, H., “Sp1 is necessary for gene activation of Adamts17 by estrogen”, *Journal of Cellular Biochemistry*, 115, 1829–1839, (2014).
- [117] Turkoglu, S. A., ve Kockar, F., “SP1 and USF differentially regulate ADAMTS1 gene expression under normoxic and hypoxic conditions in hepatoma cells”, *Gene*, 575: 48-57, (2016)
- [118] Villegas-Martinez, I., de-Miguel-Elizaga, I., Carrasco-Torres, R., Marras, C., Canteras-Jordana, M. and Yedra-Guzmán, M. J., “The COL1A1 SP1 polymorphism is associated with lower bone mineral density in patients treated with valproic acid”, *Pharmacogenetics and Genomics*, 26, 3, 126–132, (2016).
- [119] Dehghan, M. and Pourahmad-Jaktaji, R., “Sp1 binding site polymorphism of a collagen gene (rs 1800012) in women aged 45 and over and its association with bone density”, *Turk J Med Sci.*, 45, 3, 644-50, (2015).
- [120] Kansara, M., Teng, M. W., Smyth, M. J. and Thomas, D. M., “Translational biology of osteosarcoma”, *Nat Rev Cancer*, 14, 722–735, (2014).
- [121] Wilson, H., Chadalapaka, G., Jutooru, I., et al., “Effect of tolafenamic acid on canine cancer cell proliferation, specificity protein (Sp) transcription factors, and Sp-regulated proteins in canine osteosarcoma, mammary carcinoma, and melanoma cells”, *J Vet Intern Med.*, 26, 977–986, (2012).

- [122] Silva, G., Marins, M., Fachin, A. L., Lee, S. and Baek, S. J., “Anti-cancer activity of trans-chalcone in osteosarcoma: Involvement of Sp1 and P53”, *Mol Carcinog*, 55, 10, 1438-48, (2015).
- [123] Goto, T., Matsui, Y., Fernandes, R. J., Hanson, D. A., Kubo, T. and Yukata, K., “Sp1 family of transcription factors regulates the human $\alpha 2$ (XI) collagen gene (COL11A2) in Saos-2 osteoblastic cells”, *Journal Of Bone And Mineral Research*, 21, 5, (2006).
- [124] Freytag, S. O., Paielli, D. L. and Gilbert, J. D., “Ectopic expression of the CCAAT/enhancer-binding protein alpha promotes the adipogenic program in a variety of mouse fibroblastic cells”, *Genes & Development*, 8, 14, 1654–63, (1994).
- [125] Birkenmeier, E. H., Gwynn, B., Howard, S., Jerry, J., Gordon, J. I., Landschulz, W. H. and McKnight, S. L., “Tissue-specific expression, developmental regulation, and genetic mapping of the gene encoding CCAAT/enhancer binding protein”, *Genes Dev.*, 3, 8, 1146-56, (1989).
- [126] Xanthopoulos, K. G., Mirkovitch, J., Decker, T., Kuo, C. E. and Darnell, J. E., Jr., “Cell-specific transcriptional control of the mouse DNA-binding protein mC/EBP”, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86, 4117-4121, (1989).
- [127] Mischoulon, D., Rana, B., Bucher, N. L. R., and Farmer, S. R., “Growth-dependent inhibition of CCAAT enhancer-binding protein (C/EBP alpha) gene expression during hepatocyte proliferation in the regenerating liver and in culture”, *Mol. Cell. Biol.*, 12, 2553-2560, (1992).
- [128] Hendricks-Taylor, L. R. and Darlington, G. J., “Inhibition of cell proliferation by C/EBP α occurs in many cell types, does not require the presence of p53 or Rb, and is not affected by large T-antigen”, *Nucleic Acids Research*, 23, 224726-4733, (1995).
- [129] Oller, J., Alfranca, A., Méndez-Barbero, N., Villahoz, S., Lozano-Vidal, N. and Martín-Alonso, M., “C/EBP β and nuclear factor of activated T cells differentially regulate Admts-1 induction by stimuli associated with vascular remodeling”, *Mol Cell Biol.*, 35, 3409 –3422, (2015).

- [130] Tsushima, H., Okazaki, K., Hayashida, M., Ushijima, T. and Iwamoto, Y., “CCAAT/enhancer binding protein β regulates expression of matrix metalloproteinase-3 in arthritis”, *Ann Rheum Dis.*, 71, 1, 99-107, (2012).
- [131] Jules, J., Chen, W., Feng, X. and Li, Y. P., “CCAAT/Enhancer-binding Protein α (C/EBP α) Is Important for Osteoclast Differentiation and Activity”, *J Biol Chem.*, 29, 31, 16390-403, (2016).
- [132] Gregor, P. D., M. Sawadogo, and R. G. Roeder., “The adenovirus major late transcription factor USF is a member of the helix-loop-helix group of regulatory proteins and binds to DNA as a dimer”, *Genes Dev.*, 4, 1730–1740, (1990).
- [133] Kaulen, H., P. Pognonec, P. D. Gregor, and R. G. Roeder., “The Xenopus B1 factor is closely related to the mammalian activator USF and is implicated in the developmental regulation of TFIIIA gene expression”, *Mol. Cel. Biol.*, 11, 412-424, (1991).
- [134] Kozlowski, M. T., L. Gan, J. M. Venuti, M. Sawadogo, and W. H. Klein., “Sea urchin USF: a helix-loop-helix protein active in embryonic ectoderm cells”, *Dev. Biol.*, 148, 625–630, (1991).
- [135] Sirito, M., Q. Lin, T. Maity, and M. Sawadogo., “Ubiquitous expression of the 43- and 44-kDa forms of transcription factor USF in mammalian cells”, *Nucleic Acids Res.*, 22, 427-433, (1994).
- [136] Bendall, A. S., and P. L. Molloy., “Base preference for DNA binding by the bHLH-Zip protein USF: effects of MgCl₂ on specificity and comparison with binding of Myc family members”, *Nucleic Acids Res.*, 22, 2801-2810, (1994).
- [137] Roy, A. L., Du, H., Gregor, P. D., Novina, C. D., Martinez, E. and Roeder, R. G., “Cloning of an inr- and E-box-binding protein, TFII-I, that interacts physically and functionally with USF1”, *EMBO J.*, 16, 23, 7091-104, (1997).
- [138] Henrion, A. A., Vaultont, S., Raymondjean, M. and Kahn. A., “Mouse USF1 gene cloning: comparative organization with the c-myc gene family”, *Mamm. Genome*, 7, 803–809, (1996).

- [139] Lin, Q., Luo, X. and Sawadogo, M., “Archaic structure of the gene encoding transcription factor USF”, *J. Biol. Chem.*, 269, 23894–23903, (1994).
- [140] Siritto, M., Lin, Q., Deng, J. M., Behringer, R. R. and Sawadogo, M., “Overlapping roles and asymmetrical cross-regulation of the USF proteins in mice”, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 3758–3763, (1998).
- [141] Vallet, V. S., Henrion, A. A., Bucchini, D., Casado, M., Raymondjean, M., Kahn, A. and Vaulont, S., “Glucose-dependent liver gene expression in upstream stimulatory factor 22/2 mice”, *J. Biol. Chem.*, 272, 21944–21949, (1997).
- [142] Corre, S., Galibert, M. D., “Upstream stimulating factors: highly versatile stress-responsive transcription factors”, *Pigment Cell Res.*, 18, 5, 337-48, (2005).
- [143] Rada-Iglesias, A., Ameer, A., Kapranov, P., Enroth, S., Komorowski, J., Gingeras, T. R. and Wadelius, C., “Whole-genome maps of USF1 and USF2 binding and histone H3 acetylation reveal new aspects of promoter structure and candidate genes for common human disorders”, *Genome Res.*, 18, 3, 380-92, (2008).
- [144] Pezzolesi, M. G., Zbuk, K. M., Waite, K. A. and Eng, C., “Comparative genomic and functional analyses reveal a novel cis-acting PTEN regulatory element as a highly conserved functional E-box motif deleted in Cowden syndrome”, *Hum Mol Genet.*, 16, 9, 1058-71, (2007).
- [145] Bu, Y. and Gelman, I.H., “v-Src-mediated down-regulation of SSeCKS metastasis suppressor gene promoter by the recruitment of HDAC1 into a USF1-Sp1-Sp3 complex”, *J Biol Chem.*, 282, 37, 26725-39, (2007).
- [146] McMurray, H. R. and McCance, D. J., “Human papillomavirus type 16 E6 activates TERT gene transcription through induction of c-Myc and release of USF-mediated repression”, *J Virol.*, 77, 18, 9852-61, (2003).
- [147] Cogswell, J. P., Godlevski, M. M., Bonham, M., Bisi, J. and Babiss, L., “Upstream stimulatory factor regulates expression of the cell cycle-dependent cyclin B1 gene promoter”, *Mol Cell Biol.*, 15, 5, 2782-90, (1995).

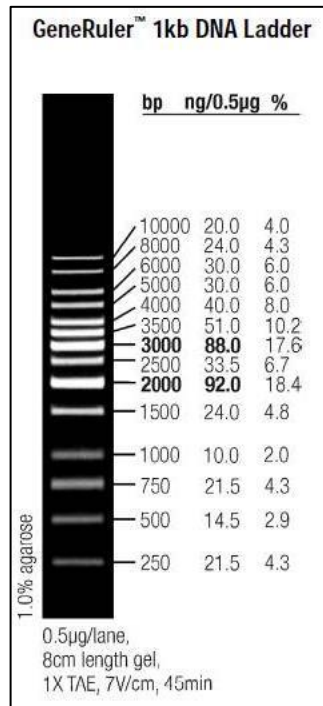
- [148] Jung, H. S., Kim, K. S., Chung, Y. J., Chung, H. K., Min, Y. K., Lee, M. S., et al., “USF inhibits cell proliferation through delay in G2/M phase in FRTL-5 cells. *Endocr J.*, 54, 2, 275-85, (2007).
- [149] Luo, X. and Sawadogo, M., “Antiproliferative properties of the USF family of helix-loop-helix transcription factors”, *Proc Natl Acad Sci USA*, 93, 3, 1308-13, (1996).
- [150] Ismail, P. M., Lu, T. and Sawadogo, M., “Loss of USF transcriptional activity in breast cancer cell lines”, *Oncogene*, 18, 40, 5582-91, (1999).
- [151] Verhoeven, A. J. M., “USF1 (upstream transcription factor 1)”, *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol.*, 15, 1, (2011).
- [152] Sayasith, K., Lussier, J. and Sirois, J., “Molecular Characterization and Transcriptional Regulation of a Disintegrin and Metalloproteinase With Thrombospondin Motif 1 (ADAMTS1) in Bovine Preovulatory Follicles”, *Endocrinology*, 154, 8, 2857–2869, (2013).
- [153] Rippe, R. A., Umezawa, A., Kimball, J. P., Breind M. and Brenner, D. A., “Binding of Upstream Stimulatory Factor to an E-box in the 3’-Flanking Region Stimulates $\alpha 1(I)$ Collagen Gene Transcription”, *The Journal Of Biological Chemistry*, 272, 3, 1753–1760, (1997).
- [154] Livak, K. J. and Schmittgen, T. D., “Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method”, *Methods*, 25, 4, 402-8, (2001).
- [155] Pautke, C., Schieker, M., Tischer T., Kolk, A., Neth, P., Mutschler, W., et al., “Characterization of osteosarcoma cell lines MG-63, Saos-2 and U-2 OS in comparison to human osteoblasts”, *Anticancer Research*, 24, 3743-3748, (2004).
- [156] Chadjichristos, C., Ghayor, C., Herrouin, J. F., Ala-Kokko, L., Suske, G., Pujol, J. P. and Galéra, P., “Down-regulation of human type II collagen gene expression by transforming growth factor- $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) in articular chondrocytes involves SP3/SP1 ratio”, *The Journal Of Biological Chemistry*, 277, 43903-4391, (2002).

- [157] Kannu, P., Bateman, J. F., Randle, S., Cowie, S., Sart, D. D., McGrath, S., et al., “Premature arthritis is a distinct type II collagen phenotype”, *Arthritis & Rheumatism*, 62, 1421–1430, (2010).
- [158] Hollander, A. P., Pidoux, I., Reiner, A., Rorabeck, C., Bourne, R. and Poole, A. R., “Damage to type II collagen in aging and osteoarthritis starts at the articular surface, originates around chondrocytes, and extends into the cartilage with progressive degeneration”, *J Clin Invest.*, 96, 2859-69, (1995).
- [159] Squires, G. R., Okouneff, S., Ionescu, M. and Poole, A. R., “The pathobiology of focal lesion development in aging human articular cartilage and molecular matrix changes characteristic of osteoarthritis”, *Arthritis Rheum.*, 48, 1261-70, (2003).
- [160] Dejica, V. M., Mort, J. S., Laverty, S., Percival, M. D., Antoniou, J., Zukor, D. J., et al., “Cleavage of type II collagen by cathepsin K in human osteoarthritic cartilage”, *Am J Pathol.*, 173, 161-169, (2008).
- [161] Li, L., Artlett, C. M., Jimenez, S. A., Hall, D. J. and Varga, J., “Positive regulation of human $\alpha 1$ (I)collagen promoter activity by transcription factor Spl”, *Gene*, 164, 229-234, (1999).
- [162] Schwarze, U., Schievink, W. I., Petty, E., Jaff, M. R., Babovic-Vuksanovic, D., Cherry, K. J., et al., “Haploinsufficiency for one COL3A1 allele of type III procollagen results in a phenotype similar to the vascular form of Ehlers-Danlos syndrome, Ehlers-Danlos syndrome type IV”, *Am J HumGenet.*, 69, 989-1001, (2001).
- [163] Koschmieder, S., Halmos, B., Levantini, E. and Tenen, D. G., “Dysregulation of the C/EBP Differentiation Pathway in Human Cancer”, *Journal Of Clinical Oncology*, 27,4, (2009).

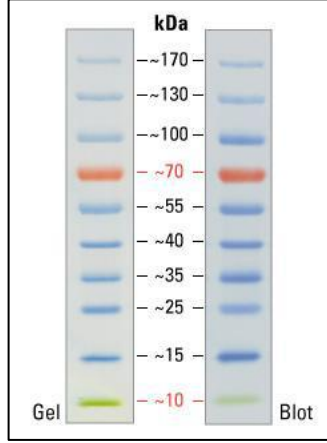
EKLER

7. EKLER

EK-A DNA Büyüklük Belirteci



EK-B Protein Büyüklük Beliteci



EK-C ADAMTS-3 cDNA Bilgileri

Homo sapiens ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif 3 (ADAMTS3), mRNA
LOCUS NM_014243 5836 bp mRNA linear PRI 26-AUG-2016
DEFINITION Homo sapiens ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif 3 (ADAMTS3), mRNA.
ACCESSION NM_014243
VERSION NM_014243.2
KEYWORDS RefSeq.
SOURCE Homo sapiens (human)
ORGANISM [Homo sapiens](#)
Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Mammalia; Eutheria; Euarchontoglires; Primates; Haplorrhini; Catarrhini; Hominidae; Homo.
REFERENCE 1 (bases 1 to 5836)
AUTHORS Alper M, Aydemir AT and Kockar F.
TITLE Induction of human ADAMTS-2 gene expression by IL-1alpha is mediated by a multiple crosstalk of MEK/JNK and PI3K pathways in osteoblast like cells
JOURNAL Gene 573 (2), 321-327 (2015)
PUBMED [26232334](#)
REFERENCE 2 (bases 1 to 5836)
AUTHORS Akyol S, Comertoglu I, Firat R, Cakmak O, Yukselten Y, Erden G, Ugurcu V and Demircan K.
TITLE Effect of insulin on the mRNA expression of procollagen N-proteinases in chondrosarcoma OUMS-27 cells
JOURNAL Oncol Lett 10 (2), 1091-1096 (2015)
PUBMED [26622631](#)
REFERENCE 3 (bases 1 to 5836)
AUTHORS Bekhouche M and Colige A.
TITLE The procollagen N-proteinases ADAMTS2, 3 and 14 in pathophysiology
JOURNAL Matrix Biol. 44-46, 46-53 (2015)
PUBMED [25863161](#)
REMARK GeneRIF: Data indicate that ADAMTS2 and 3 cleave the amino-propeptide of fibrillar collagens and regulate blood vessels homeostasis and lymphangiogenesis. [review]
Review article
REFERENCE 4 (bases 1 to 5836)
AUTHORS Alper M and Kockar F.
TITLE IL-6 upregulates a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 2 (ADAMTS-2) in human osteosarcoma cells mediated by JNK pathway
JOURNAL Mol. Cell. Biochem. 393 (1-2), 165-175 (2014)
PUBMED [24752352](#)
REFERENCE 5 (bases 1 to 5836)
AUTHORS Acar M, Ocak Z, Erdogan K, Cetin EN, Hatipoglu OF, Uyeturk U, Gunduz E and Gunduz M.

TITLE The effects of hypericin on ADAMTS and p53 gene expression in MCF-7 breast cancer cells
JOURNAL J BUON 19 (3), 627-632 (2014)
PUBMED [25261644](#)
REFERENCE 6 (bases 1 to 5836)
AUTHORS Colige A, Vandenberghe I, Thiry M, Lambert CA, Van Beeumen J, Li SW, Prockop DJ, Lapiere CM and Nusgens BV.

TITLE Cloning and characterization of ADAMTS-14, a novel ADAMTS displaying high homology with ADAMTS-2 and ADAMTS-3
JOURNAL J. Biol. Chem. 277 (8), 5756-5766 (2002)
PUBMED [11741898](#)
REFERENCE 7 (bases 1 to 5836)
AUTHORS Fernandes RJ, Hirohata S, Engle JM, Colige A, Cohn DH, Eyre DR and Apte SS.

TITLE Procollagen II amino propeptide processing by ADAMTS-3. Insights on dermatosparaxis
JOURNAL J. Biol. Chem. 276 (34), 31502-31509 (2001)
PUBMED [11408482](#)
REFERENCE 8 (bases 1 to 5836)
AUTHORS Tang BL.

TITLE ADAMTS: a novel family of extracellular matrix proteases
JOURNAL Int. J. Biochem. Cell Biol. 33 (1), 33-44 (2001)
PUBMED [11167130](#)
REMARK Review article
REFERENCE 9 (bases 1 to 5836)
AUTHORS Hurskainen TL, Hirohata S, Seldin MF and Apte SS.

TITLE ADAM-TS5, ADAM-TS6, and ADAM-TS7, novel members of a new family of zinc metalloproteases. General features and genomic distribution of the ADAM-TS family
JOURNAL J. Biol. Chem. 274 (36), 25555-25563 (1999)
PUBMED [10464288](#)
REFERENCE 10 (bases 1 to 5836)
AUTHORS Tang BL and Hong W.

TITLE ADAMTS: a novel family of proteases with an ADAM protease domain and thrombospondin 1 repeats
JOURNAL FEBS Lett. 445 (2-3), 223-225 (1999)
PUBMED [10094461](#)
REMARK Review article

COMMENT REVIEWED [REFSEQ](#): This record has been curated by NCBI staff. The reference sequence was derived from [AF247668.1](#), [AK295131.1](#), [BC130287.1](#), [AB002364.1](#) and [BC016451.1](#).
This sequence is a reference standard in the [RefSeqGene](#) project.
On May 18, 2011 this sequence version replaced gi:[21265036](#).

Summary: This gene encodes a member of the ADAMTS (a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs) protein family. Members of the family share several distinct protein modules, including a propeptide region, a metalloproteinase domain, a disintegrin-like domain, and a thrombospondin type 1 (TS) motif. Individual members of this family differ in the number of C-terminal TS motifs, and some have unique C-terminal domains. The encoded preproprotein is proteolytically processed to generate the mature protease. This protease, a member of the procollagen aminopropeptidase subfamily of proteins, may play a role in the processing of type II fibrillar collagen in articular cartilage. [provided by RefSeq, Feb 2016].

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

##Evidence-Data-START##

Transcript exon combination :: AB002364.1, BC130287.1 [ECO:0000332]

RNAseq introns :: mixed/partial sample support

SAMEA1965299, SAMEA1966682

[ECO:0000350]

##Evidence-Data-END##

COMPLETENESS: full length.

PRIMARY	REFSEQ_SPAN	PRIMARY_IDENTIFIER	PRIMARY_SPAN	COMP
1-449	AF247668.1	1-449		
450-541	AK295131.1	370-461		
542-4750	BC130287.1	539-4747		
4751-4975	AB002364.1	4703-4927		
4976-5821	AB002364.1	4929-5774		
5822-5836	BC016451.1	3264-3278		

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..5836

/organism="Homo sapiens"

/mol_type="mRNA"

/db_xref="taxon:9606"

/chromosome="4"

/map="4q13.3"

gene 1..5836

/gene="ADAMTS3"

/gene_synonym="ADAMTS-4"

/note="ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif 3"

/db_xref="GeneID:9508"

/db_xref="HGNC:HGNC:219"

/db_xref="MIM:605011"

exon 1..106

/gene="ADAMTS3"

/gene_synonym="ADAMTS-4"
 /inference="alignment:Splign:2.0.8"
 misc feature 23..25
 /gene="ADAMTS3"
 /gene_synonym="ADAMTS-4"
 /note="upstream in-frame stop codon"
 CDS 38..3655
 /gene="ADAMTS3"
 /gene_synonym="ADAMTS-4"
 /EC_number="3.4.24.-"
 /note="zinc metalloendopeptidase; a disintegrin-like and metalloprotease (reprolysin type) with thrombospondin type 1 motif, 3; a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 3; ADAM-TS3; ADAMTS-3; PC II-NP; ADAM-TS 3; procollagen II N-proteinase; procollagen II amino propeptide-processing enzyme"
 /codon_start=1
 /product="A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 3 preproprotein"
 /protein_id="NP_055058.2"
 /db_xref="CCDS:CCDS3553.1"
 /db_xref="GeneID:9508"
 /db_xref="HGNC:HGNC:219"
 /db_xref="MIM:605011"
 /translation="MVL LSLWLI A AALVEVRTSADGQAGNEEMVQIDLPIKRYREYEL VTPVSTNLEGRYLSHTLSASHKKRSARDVSSNPEQLFFNITAFGKDFHLRLKPNLQLV APGAVVEWHETSLVPGNITDPI NNHQPGSATYRIRRT EPLQTNCA YVGDIVDIPGTSV AISNCDGLAGMIKSDNEEYFIEPLER GKQMEE EKGR IHVYKRS AVEQAPIDMSKDFH YRES DLEGLDDLGT VYGN IHQQLNETMRRRRRHAGENDYNI EVLLGVDDSVVRFHGKEH VQNYLLTLMNIVNEIYHDESLGVHINVVLRMIMLG YAKSISLIERGNPSRSL ENVCR WASQQQRSDLNHSEHHDHAI FLTRQDFGPAGMQGYAPVTGMCHPVR SCTLNHEDGFSS AFVVAHETGHV LGM EHDGQGNRCGDE TAMGSVMAPLVQA AFHRYHWSRCSGQELKRYI HSYDCLDDPFDHDWPKLPELPGINYSMDEQCRFDG VGYKMC TAFRTFD PCKQLWCS HPDNPFCKTKKGPPLDGTECAAGKWCYKGHCMWKNANQQQDGNWGSWTKFGSCSRT CGTGVRFRTRQCNNMPINGGQDCPGVNF EYQLCNT EECQKH FEDFRAQQCQQRNSHF EYQNTKHHWLPYEHPDPK KRCHLYCQSKETGDVAYMKQLVHDGTHCSYKDPYSICVRG ECVKVGCDKEIGSNKVEDKCGVCGGDNSHCRTVKGTFTRTPRKLGYLKMFDIPPGARH VLIQEDEASPHILAIKNQATGHYIILNGKGEEAKSRTFIDLGV EWDYNI EDDIESLHTD GPLHDPVIVLII PQENDTRSSLTYKYI IHEDSVPTINSNNV IQEELDTFEWALKSWSQ CSKPCGGGFQYTKYGCRRKSDNKMVHR SFCEANKKPKPI RRM CNIQECTHPLWVAEEW EHCTKTCGSSGYQLRTV RCLQPLLDGTNRSVH SKYCMGDRPESRRPCNRVPCPAQWKT GPWSECSVTCGEGTEVRQVLCRAGDHC DGEKPE SVRACQLPPCNDEPCLGDKSIFCQM EVLARYCSIPGYNKLCCE SCSKRSSTLPPPYLLEAAETHDDVISNPSDLPRSLVMPTS LVPYHSETPAKKMSLSSISSVGGPNAYAAF RPNSKPDGANLRQ RSAQQAGSKTVRLVT VPSSPPTKRVHLSSASQMAAASFFAASDSIGASSQARTSKKDGKI IDNRRPTRSSTLE R"
 sig peptide 38..103
 /gene="ADAMTS3"
 /gene_synonym="ADAMTS-4"
 /inference="COORDINATES: ab initio prediction:SignalP:4.0"
 proprotein 98..3652
 /gene="ADAMTS3"
 /gene_synonym="ADAMTS-4"

```

/product="A disintegrin and metalloproteinase with
thrombospondin motifs 3 proprotein"
mat_peptide      785..3652
/gene="ADAMTS3"
/gene_synonym="ADAMTS-4"
/product="A disintegrin and metalloproteinase with
thrombospondin motifs 3"
/experiment="experimental evidence, no additional details
recorded"
/note="propagated from UniProtKB/Swiss-Prot (O15072.4)"
misc_feature     2174..2569
/gene="ADAMTS3"
/gene_synonym="ADAMTS-4"
/experiment="experimental evidence, no additional details
recorded"
/note="propagated from UniProtKB/Swiss-Prot (O15072.4);
Region: Spacer"
exon             107..134
/gene="ADAMTS3"
/gene_synonym="ADAMTS-4"
/inference="alignment:Splign:2.0.8"
exon             135..541
/gene="ADAMTS3"
/gene_synonym="ADAMTS-4"
/inference="alignment:Splign:2.0.8"
exon             542..698
/gene="ADAMTS3"
/gene_synonym="ADAMTS-4"
/inference="alignment:Splign:2.0.8"
exon             699..898
/gene="ADAMTS3"
/gene_synonym="ADAMTS-4"
/inference="alignment:Splign:2.0.8"
exon             899..982
/gene="ADAMTS3"
/gene_synonym="ADAMTS-4"
/inference="alignment:Splign:2.0.8"
exon             983..1139
/gene="ADAMTS3"
/gene_synonym="ADAMTS-4"
/inference="alignment:Splign:2.0.8"
exon             1140..1245
/gene="ADAMTS3"
/gene_synonym="ADAMTS-4"

```

/inference="alignment:Splign:2.0.8"
exon 1246..1389
/gene="ADAMTS3"
/gene_synonym="ADAMTS-4"
/inference="alignment:Splign:2.0.8"
exon 1390..1522
/gene="ADAMTS3"
/gene_synonym="ADAMTS-4"
/inference="alignment:Splign:2.0.8"
exon 1523..1636
/gene="ADAMTS3"
/gene_synonym="ADAMTS-4"
/inference="alignment:Splign:2.0.8"
exon 1637..1782
/gene="ADAMTS3"
/gene_synonym="ADAMTS-4"
/inference="alignment:Splign:2.0.8"
exon 1783..1958
/gene="ADAMTS3"
/gene_synonym="ADAMTS-4"
/inference="alignment:Splign:2.0.8"
exon 1959..2092
/gene="ADAMTS3"
/gene_synonym="ADAMTS-4"
/inference="alignment:Splign:2.0.8"
exon 2093..2216
/gene="ADAMTS3"
/gene_synonym="ADAMTS-4"
/inference="alignment:Splign:2.0.8"
exon 2217..2297
/gene="ADAMTS3"
/gene_synonym="ADAMTS-4"
/inference="alignment:Splign:2.0.8"
exon 2298..2461
/gene="ADAMTS3"
/gene_synonym="ADAMTS-4"
/inference="alignment:Splign:2.0.8"
exon 2462..2627
/gene="ADAMTS3"
/gene_synonym="ADAMTS-4"
/inference="alignment:Splign:2.0.8"
exon 2628..2760
/gene="ADAMTS3"
/gene_synonym="ADAMTS-4"

```

/inference="alignment:Splign:2.0.8"
exon          2761..2968
/gene="ADAMTS3"
/gene_synonym="ADAMTS-4"
/inference="alignment:Splign:2.0.8"
exon          2969..3086
/gene="ADAMTS3"
/gene_synonym="ADAMTS-4"
/inference="alignment:Splign:2.0.8"
exon          3087..5822
/gene="ADAMTS3"
/gene_synonym="ADAMTS-4"
/inference="alignment:Splign:2.0.8"
STS          3631..3780
/gene="ADAMTS3"
/gene_synonym="ADAMTS-4"
/standard_name="SHGC-59735"
/db_xref="UniSTS:3967"
STS          5413..5540
/gene="ADAMTS3"
/gene_synonym="ADAMTS-4"
/standard_name="SHGC-67364"
/db_xref="UniSTS:38700"
STS          5568..5679
/gene="ADAMTS3"
/gene_synonym="ADAMTS-4"
/standard_name="G33602"
/db_xref="UniSTS:72731"
STS          5614..5815
/gene="ADAMTS3"
/gene_synonym="ADAMTS-4"
/standard_name="HSC2JD032"
/db_xref="UniSTS:75668"

```

ORIGIN

```

1  gctttgccca gtagttggaa agtgaactcg actcgtgatg gttctcctgt cactttggtt
61  gatagcagcc gctctggtag aggttaggac ttcagctgat ggacaagctg gtaatgaaga
121 aatggtgcaa atagatttac caataaagag atatagagag tatgagctgg tgactccagt
181 cagcacaaat ctagaaggac gctatctctc ccatactctt tctgcgagtc acaaaaagag
241 gtcagcgagg gacgtgtctt ccaacctga gcagttgttc ttaacatca cggcatttgg
301 aaaagathtt catctgcgac taaagcccaa cactcaacta gtagctcctg gggctgttgt
361 ggagtggcat gagacatctc tgggtgcctg gaataaacc gatcccatta acaaccatca
421 accaggaagt gctacgtata gaatccggag aacagagcct ttgcagacta actgtgctta
481 tgttggtgac atcgtggaca ttccaggaac ctctgttgcc atcagcaact gtgatggtct
541 ggctggaatg ataaaaagtg ataataaaga gtatttcatt gaacccttgg aaagaggtaa

```

601 acagatggag gaagaaaaag gaaggattca tgttgctac aagagatcag ctgtagaaca
661 ggctcccata gacatgtcca aagacttcca ctacagagag tgggacctgg aaggccttga
721 tgatctaggt actgtttatg gcaacatcca ccagcagctg aatgaaaca tgagacgccg
781 cagacacgcg ggagaaaacg attacaatat cgaggactg ctgggagtgg atgactctgt
841 ggtccgtttc catggcaaag agcacgtcca aaactacctc ctgaccctaa tgaacattgt
901 gaatgaaatt taccatgatg agtccctcgg agtgcatata aatgtggtcc tggtgcgcat
961 gataatgctg ggatatgcaa agtccatcag cctcatagaa aggggaaacc catccagaag
1021 cttggagaat gtgtgtcgtc gggcgtccca acagcaaaga tctgatctca accactctga
1081 acacatgac catgcaattt ttttaaccag gcaagacttt ggacctgctg gaatgcaagg
1141 atatgctcca gtcaccgga tgtgtcatcc agtgagaagt tgtaccctga atcatgagga
1201 tggtttttca tctgcttttg tagtagccca tgaaacgggc catgtgttgg gaatggagca
1261 tgatggacia ggcaacaggt gtggtgatga gactgctatg ggaagtgtca tggctccctt
1321 ggtacaagca gcattccatc gttaccactg gtcccgatgc agtggtcaag aactgaaaag
1381 atatatccat tcctatgact gtctccttga tgaccctttt gatcatgatt ggcctaaact
1441 cccagaactt cctggaatca attattctat ggatgagcaa tgtcgttttg attttgggtg
1501 tggctataaa atgtgcaccg cgttccgaac ctttgaccca tgtaaacagc tgtggtgtag
1561 ccctcctgat aatccctact tttgtaagac taaaaagga cctccacttg atgggactga
1621 atgtgctgct ggaaaatggt gctataaggg tcattgcatg tggagaatg ctaatcagca
1681 aaaacaagat ggcaattggg ggtcatggac taaatttggc tcctgttctc ggacatgtgg
1741 aactggtgtt cgtttcagaa cacgccagtg caataatccc atgccatca atggtgtgca
1801 ggattgtcct ggtgttaatt ttgagtacca gctttgtaac acagaagaat gccaaaaaca
1861 ctttgaggac ttcagagcac agcagtgtca gcagcgaac tcccactttg aataccagaa
1921 taccaaacac cactggttgc catatgaaca tcctgacccc aagaaaagat gccaccttta
1981 ctgtcagtcc aaggagactg gagatgttgc ttacatgaaa caactggtgc atgatggaac
2041 gcactgttct tacaagatc catatagcat atgtgtgcga ggagagtgtg tgaagtggg
2101 ctgtgataaa gaaattggtt ctaataagggt tgaggataag tgtggtgtct gtggaggaga
2161 taattcccac tgccgaaccg tgaaggggac atttaccaga actcccagga agcttgggta
2221 ccttaagatg tttgatatac cccctggggc tagacatgtg ttaatccaag aagacgaggc
2281 ttctcctcat attcttgcta ttaagaacca ggctacaggc cattatatt taaatggcaa
2341 aggggaggaa gccaaagtcg ggacctcat agatcttggg gtggagtggg attataacat
2401 tgaagatgac attgaaagtc ttcacaccga tggaccttta catgatcctg ttattgtttt
2461 gattatacct caagaaaatg ataccgctc tagcctgaca tataagtaca tcatccatga
2521 agactctgta cctacaatca acagcaaca tgtcatccag gaagaattag atacttttga
2581 gtgggctttg aagagctggt ctcagtgttc caaacctgt ggtggaggtt tccagtacac
2641 taaatatgga tgccgtagga aaagtataa taaaatggtc catcgagct tctgtgaggc
2701 caacaaaaag ccgaaacctt ttagacgaat gtgcaatatt caagagtgtg cacatccact
2761 ctgggtagca gaagaatggg aacctgcac caaacctgt ggaagtctg gctatcagct
2821 tcgactgta cgctgccttc agccactcct tgatggcacc aaccgctctg tgcacagcaa
2881 atactgcatg ggtgaccgtc ccgagagccg ccggccctgt aacagagtgc cctgcctgc
2941 acagtggaaa acaggacctt ggagtgagtg ttcagtgacc tgcggtgaag gaacggaggt
3001 gaggcaggtc ctctgcaggg ctggggacca ctgtgatggt gaaaagcctg agtcggtcag
3061 agcctgtcaa ctgcctcctt gtaatgatga accatgtttg ggagacaagt ccatattctg
3121 tcaaatggaa gtgttggcac gatactgctc cataccagggt tataacaagt tatgtgtgga
3181 gtctgcagc aagcgcagta gcacctgcc accaccatac cttctagaag ctgctgaaac

3241 tcatgatgat gtcacatccta accctagtga cctccctaga tctctagtga tgcctacatc
3301 tttggttctt tatcattcag agaccctgc aaagaagatg tctttgagta gcacatctctc
3361 agtgggaggt ccaaagcat atgctgcttt caggccaac agtaaactg atggtgctaa
3421 tttacgccag aggagtgtc agcaagcagg aagtaagact gtgagactgg tcaccgtacc
3481 atcctcccca cccaccaaga ggggccacct cagttcagct tcacaaatgg ctgctgcttc
3541 cttctttgca gccagtgtt caataggtgc ttcttctcag gcaagaacct caaagaaga
3601 tggaaagatc attgacaaca gacgtccgac aagatcatcc acctagaaa gatgagaaa
3661 tgaacaaaa aggctagaaa ccagaggaaa acctggacaa cctctctctt cccatggtgc
3721 atatgcttgt ttaaagtga aatctctata gatcgtcagc tcattttatc tgtaattgga
3781 agaacagaaa gtgctggctc actttctagt tgctttcatc ctcttttgt tctgattga
3841 ctcatctacc agaattcatt ggaagaaatc accaaagatt attacaaaag aaaaatgt
3901 tgctaagatt gtgttggtcg ctctctgaaag cagaaaaggg actggaacca attgtgcata
3961 tcagctgact tttgtttgt tttagaaaag ttacagtaaa aattaaaaag agataccaat
4021 ggtttacact ttaacaagaa attttgata tggacaaaag aattcttaga cttgtattcc
4081 tttttatcta tattagaat attgtatgag caaatttgca gctgttgtgt aaatactgta
4141 tattgcaaaa atcagtatta ttttaagaga tgtgttctca aatgattgtt tactatatta
4201 ctttctgga tgttctaggt gcctgtcgtt gagtattgcc ttgtttgaca ttctataggt
4261 taattttcaa agcagagtat tacaaaagag aagttagaat tacagctact gacaataaa
4321 agggttttgt tgaatcaaca atgtgatacg taaattatag aaaaagaaaa gaaacacaaa
4381 agctatagat atacagatat cagcttacct attgccttct atacttataa tttaaaggat
4441 tgggtgtctta gtacacttgt ggtcacaggg atcaacgaat agtaataat gaactcgtgc
4501 aagacaaaac tgaaccctc tttccaggac cttagtaggc accgttgagg tgcctttgt
4561 tttgtgtgt gtgtgttctt ttttaatttt cgcattgttg acagatacaa acagttatac
4621 tcaatgtact gtaataatcg caaagaaaa agttttggga taacttatt gtatgttgg
4681 agctgagaaa aatatcatca gtctagaatt gatatttgag tatagtagag ctttggggct
4741 ttgaaggcag gttcaagaaa gcatatgtcg atggttgaga ttttatttt ccatatgggt
4801 catgttcaaa tgttcacaac cacaatgcat ctgactgcaa taatgtgcta ataatttatg
4861 tcagtagtca ccttgctcac agcaaagcca gaaatgctct ctccaggag tagatgtaaa
4921 gtactgttac atagaattca gaactgaaga ttttattaa aagttgatt ttttcttga
4981 tagtatttt atgtactaaa ttttacct aatatcaatt acatatttg gtaaactaga
5041 gagacataat tagagatgca tgctttgttc tgtgcataga gaccttaag caaactacta
5101 cagccaactc aaaagctaaa actgaacaaa tttgatgtta tgcaaacatc ttgcattttt
5161 agtagttgat attaagtga tgactgttt ccctcaagg aacattaaa ttgtatggac
5221 tcagctagct gttcaatgaa attgtgaatt agaaacatt ttaaaagtt ttgaaagaga
5281 taagtgcac atgaattaca tgtacatgag aggagatagt gatatcagca taatgatttt
5341 gaggtcagta cctgagctgt ctaaaaatat attatacaaa ctaaaatgta gatgaattaa
5401 cctctcaaag cacagaatgt gcaagaactt ttgcatttta atcgttgtaa actaacagct
5461 taaactattg actctatacc tctaaagaat tgctgtact ttgtgcaaga actttgaagg
5521 tcaaattagg caaattccag atagtaaac aatccctaag ctttaagtct ttttttttc
5581 ctaaaaattc ccatagaata aaattctctc tagtttactt gtgtgtgcat acatctcatc
5641 cacaggggaa gataaagatg gtcacacaaa cagtttccat aaagatgtac atattcatta
5701 tacttctgac ctttgggctt tctttctac taagctaaaa attccttttt atcaaagtgt
5761 aactactga tgctgtttgt tgtactgaga gcacgtacca ataaaaatgt taacaaaata
5821 taaaaaaaa aaaaaa

EK-D ADAMTS-3 Restriksiyon Haritasi

Noncutters: AarI, AatII, AbsI, AclI, AflIII, AflIII, AlfI, AloI, AlwNI, ApaLI, ArsiI, AscI, AsuII, BaeI, BalI, BamHI, BarI, BccI, BciVI, BclI, BdaI, BglI, BsaAI, BsaBI, BsePI, Bsp1407I, BspHI, BspMI, BsrDI, BstEII, BstXI, BtgZI, BtsI, CfrI, ClaI, CspCI, DrdI, Eam1105I, Eco47III, Eco57I, EcoRV, Fall, FseI, FspAI, HindII, HindIII, HpaI, Hpy99I, KpnI, MauBI, MfeI, MluI, NcoI, NdeI, NheI, NmeAIII, NotI, NruI, NspI, OliI, PacI, PasI, PfoI, PmaCI, PmeI, PpiI, PpuMI, PshAI, PsiI, PI-PspI, PspXI, PsrI, PvuI, PvuII, RsrII, Sall, SanDI, SapI, ScaI, PI-SceI, SexAI, SfiI, SgfI, SgrAI, SgrDI, SmlI, SnaBI, SpeI, SphI, Sse8387I, SspI, SwaI, TaqII, Tth111I, VspI, XbaI, XcmI, XhoI, XmnI

Name	Sequence	Site Length	Overhang	Frequency	Cut Positions
MslI	CAYNNNN RTG	6	blunt	1	1118
NaeI	GCCGGC	6	blunt	1	567
SmaI	CCCGGG	6	blunt	1	747
SrfI	GCCCGGG C	8	blunt	1	747
StuI	AGGCCT	6	blunt	1	1150
AvrII	CCTAGG	6	five_prime	1	785
BbvCI	CCTCAGC	7	five_prime	1	1152
BglII	AGATCT	6	five_prime	1	972
Bpu10 I	CCTNAGC	6	five_prime	1	1152
BseYI	CCCAGC	6	five_prime	1	929
DraII	RGGNCCY	6	five_prime	1	683
Eco3II	GGTCTC	6	five_prime	1	715
EcoRI	GAATTC	6	five_prime	1	939
Esp3I	CGTCTC	6	five_prime	1	427
FokI	GGATG	5	five_prime	1	1132
SfaNI	GCATC	5	five_prime	1	1110
StyI	CCWWGG	6	five_prime	1	785

TatI	WGTACW	6	five_prime	1	1141
TfiI	GAWTC	5	five_prime	1	1256
Tsp45I	GTSAC	5	five_prime	1	1009
XhoII	RGATCY	6	five_prime	1	972
AgsI	TTSAA	5	three_prime	1	150
ApaI	GGGCCC	6	three_prime	1	687
BfiI	ACTGGG	6	three_prime	1	39
BsgI	GTGCAG	6	three_prime	1	264
BsmI	GAATGC	6	three_prime	1	392
PstI	CTGCAG	6	three_prime	1	197
SacII	CCGCGG	6	three_prime	1	616
TsoI	TARCCA	6	three_prime	1	994
TspGI	ACGGA	5	three_prime	1	1116
BtrI	CACGTC	6	blunt	2	674, 1098
AccI	GTMKAC	6	five_prime	2	1286, 1376
AgeI	ACCGGT	6	five_prime	2	820, 1352
AvaI	CYCGRG	6	five_prime	2	728, 745
EcoNI	CCTNNNN NAGG	6	five_prime	2	288, 1264
HgaI	GACGC	5	five_prime	2	620, 847
NarI	GGCGCC	6	five_prime	2	667, 815
AjuI	GAANNNN NNNTTGG	7	three_prime	2	64, 96
BcgI	CGANNNN NNTGC	6	three_prime	2	323, 357

BpII	GAGNNNN NCTC	6	three_prime	2	461, 493
BsaXI	ACNNNNN CTCC	6	three_prime	2	639, 669
BseSI	GKGCMC	6	three_prime	2	274, 687
DraIII	CACNNNG TG	6	three_prime	2	240, 987
Eco57 MI	CTGRAG	6	three_prime	2	786, 953
GsuI	CTGGAG	6	three_prime	2	786, 953
HaeIV	GAYNNNN NRTC	6	three_prime	2	1081, 1115
PfiMI	CCANNNN NTGG	6	three_prime	2	29, 1024
SacI	GAGCTC	6	three_prime	2	171, 642
TspDI	ATGAA	5	three_prime	2	167, 173
TspRI	CASTG	5	three_prime	2	926, 1353
AcyI	GRCGYC	6	five_prime	3	631, 667, 815
ApoI	RAATTY	6	five_prime	3	161, 899, 939
BbvI	GCAGC	5	five_prime	3	346, 588, 594
BsmAI	GTCTC	5	five_prime	3	168, 427, 715
Cfr10I	RCCGGY	6	five_prime	3	565, 820, 1352
EcoPI 5I	CAGCAG	6	five_prime	3	439, 567, 574
TseI	GCWGC	5	five_prime	3	334, 582, 601
EciI	GGCGGA	6	three_prime	3	469, 551, 771
MboII	GAAGA	5	three_prime	3	125, 962, 1153
TauI	GCSGC	5	three_prime	3	485, 561, 590

BsrBI	CCGCTC	6	blunt	4	444, 450, 561, 727
PleI	GAGTC	5	five_prime	4	15, 470, 1104, 1152
BseMI I	CTCAG	5	three_prime	4	163, 1166, 1212, 1233
BsrI	ACTGG	5	three_prime	4	34, 182, 835, 1007
HaeII	RGCGCY	6	three_prime	4	623, 670, 818, 1217
MmeI	TCCRAC	6	three_prime	4	47, 339, 936, 1363
TstI	CACNNNN NNTCC	6	three_prime	4	349, 381, 1087, 1119
AvaII	GGWCC	5	five_prime	6	365, 806, 823, 871, 883, 1355
HphI	GGTGA	5	three_prime	6	202, 210, 895, 999, 1003, 1105
BseRI	GAGGAG	6	three_prime	7	522, 535, 538, 554, 564, 810, 898
SduI	GDGCHC	6	three_prime	7	171, 274, 359, 408, 642, 687, 752
Hin4I	GAYNNNN NVTC	6	three_prime	8	639, 671, 867, 899, 1082, 1114, 1149, 1181
EcoRII	CCWGG	5	five_prime	10	283, 763, 808, 885, 959, 999, 1209, 1265, 1278, 1364
FauI	CCCGC	5	five_prime	13	74, 261, 437, 443, 496, 608, 620, 666, 673, 700, 709, 827, 1208

EK-E ADAMTS-3 Promotoruna Ait Transkripsiyon Faktörü Bağlanma Analizi

Detailed Family Information	Anchor position	Sequence
MYT1 C2HC zinc finger protein	12	gtcGAGTtcactt
Interferon regulatory factors	14	gttgGAAAgtggaactcgactc
MYT1 C2HC zinc finger protein	15	ggaAAGTgaactc
Nuclear receptor subfamily 2 factors	34	aactactgggCAAAGcaaatgccca
Twist subfamily of class B bHLH transcription factors	40	ggcaaagCAAATgcccagagc
Human muscle-specific Mt binding site	41	gggcATTTg
Nucleoside diphosphate kinase	55	ggGGGGtggtttgctc
Testis-specific bHLH-Zip transcription factors	55	gGGTGggtttg
Spalt-like transcription factor 2	57	ggggGTGGgtt
GC-Box factors SP1/GC	57	ggggggGGTGggtttgc
Krueppel like transcription factors	58	cgggggGGGTggtttg
GC-Box factors SP1/GC	59	gcggGGGGggtggttt
Testis-specific bHLH-Zip transcription factors	59	gGGGGggtggg
C2H2 zinc finger transcription factors 2	59	agcaaaCCCAccccccccccca
EGR/nerve growth factor induced protein C & related factors	60	ggcggggGGGGtgggtt
Krueppel like transcription factors	60	ggcgggGGGGggtgggtt
Nucleoside diphosphate kinase	60	ggCGGGgggggtgggtt
Ras-responsive element binding protein	60	aCCCAccccccccgc
GLI zinc finger family	61	ccaCCCCccccgc
Myc associated zinc fingers	61	gcggggGGGGtgg
C2H2 zinc finger transcription factors 2	61	caaaccaCCCCccccgccaaa
EGR/nerve growth factor induced protein C & related factors	63	ttggcgGGGGggtggg
Nucleoside diphosphate kinase	64	ttTGGGcggggggggtg
EGR/nerve growth factor induced protein C & related factors	65	ttttggCGGGgggggt
C2H2 zinc finger transcription factors 2	65	cccaccCCCCcgcccaataa
GC-Box factors SP1/GC	66	atTTGGGCgggggggg
Krueppel like transcription factors	67	tattttGGCGgggggg
Fork head domain factors	72	ccgccAAAAtaagttt
MYT1 C2HC zinc finger protein	78	aatAAGTttcttt
NKX homeodomain factors	78	caaaatAAGTttctttaag
Interferon regulatory factors	81	ttttctaaaGAAActtattt
Abdominal-B type homeodomain transcription factors	85	tttttctTAAAgaaac
Krueppel like transcription factors	94	agaaaaaaaggaaAAGG
Barbiturate-inducible element box from pro-eukaryotic genes	95	aaaaAAAGgaaaagg
Human and murine ETS1 factors	97	gaaaaaaGGAAaaggaaaa
SOX/SRY-sex/testis determinig and related HMG box factors	97	aagaaaAAAAGgaaaaggaaaaa
Interferon regulatory factors	103	aaggaaaaggGAAAaatgcg
Human and murine ETS1 factors	104	aggaaaagGGAAaaaatgcca
CAS interating zinc finger protein	107	ggAAAAaatgc
Octamer binding protein	113	aaAATGcgaataga
Interferon regulatory factors	119	atgcgaaataGAAAaaaatga
DM domain-containing transcription factors	146	gtgcTTTGcttcaatgaaat
Signal transducer and activator of transcription	148	cattTTCAttgaagcaaaag
Signal transducer and activator of transcription	150	ttgcTTCAatgaaaatgaa
Octamer binding protein	153	tcaATGAaatgaaa

SOX/SRY-sex/testis determinig and related HMG box factors	153	ttgcttcAATGaaaatgaaattga
Brn POU domain factors	156	tcaaatttcATTTcattg
Interferon regulatory factors	157	caatGAAAatgaaattgagc
MYT1 C2HC zinc finger protein	159	tcaAATTTcattt
Positive regulatory domain I binding factor	160	gaaaatGAAAtttgagctc
Nuclear receptor subfamily 2 factors	162	tctcagagcTCAAatttcatttca
RXR heterodimer binding sites	164	agtctcagaGCTCaaatttcattt
Nuclear receptor subfamily 2 factors	169	gggccagtcTCAGagctcaaatttc
RXR heterodimer binding sites	171	ggggccagctctcagaGCTCaaatt
Pleomorphic adenoma gene	174	gaGGGGgccagctctcagagctca
Y-box binding transcription factors, multifunctional proteins involved in transcriptional and translational regulation, mRNA splicing, DNA replication and repair	177	gagacTGGCcccc
Cellular and viral myb-like transcriptional regulators	194	aaaaAACTgcagagc
Nuclear factor of activated T-cells	197	agtGGAaaaaactgcagag
CAS interating zinc finger protein	198	ggAAAAaactg
Nuclear factor of activated T-cells	199	gaagtGGAaaaaactgcag
Interferon regulatory factors	202	aggtGAAgtggaaaaaactgc
NKX homeodomain factors	204	aaggtgaAGTGgaaaaaac
Human and murine ETS1 factors	207	tgagaaggTGAAgtggaaaaa
GLI zinc finger family	227	ccgtcctCCCAaac
Glucocorticoid responsive and related elements	237	cctGCACactctgtgttg
GA-boxes	242	aacacAGAGtgtgcaggagcgagaa
Heat shock factors	251	tgtgcaggagCGAGaaggtgctgta
Peroxisome proliferator-activated receptor	270	ctgtaagcgggcacAGGCTaagc
RXR heterodimer binding sites	270	gctgtaagcgggcacAGGCTaagc
CP2-erythrocyte Factor related to drosophila Elf1	279	cACAGgctaagcctgggag
Bicoid-like homeodomain transcription factors	280	caggCTAAgcctgggag
Ikaros zinc finger family	286	gccTGGGagaggg
GA-boxes	294	ctgggAGAGggggaagggacgaggg
Myeloid zinc finger 1 factors	294	agGGGgaaggg
Human and murine ETS1 factors	295	ggagagggGGAaggacgaggg
Pleomorphic adenoma gene	299	gaGGGGgaagggacgagggcct
Nuclear factor of activated T-cells	307	gttGGAaagcccctcgcc
Nuclear factor kappa B/c-rel	309	gaggggctTTCCAac
MYT1 C2HC zinc finger protein	315	agatAGTTggaaa
CAS interating zinc finger protein	337	cgAAAAagctg
E2F-myc activator/cell cycle regulator	342	aaaagcctcGAAAaagc
Heat shock factors	342	ctcgaaaagcctCGAAAaagctgct
E2F-myc activator/cell cycle regulator	352	atggtgctcGAAAagcc
SOX/SRY-sex/testis determinig and related HMG box factors	356	agggacCAATggtgctcgaagcc
CLOX and CLOX homology (CDP) factors	359	agggacCAATggtgctcga
CCAAT binding factors	360	gggaCCAATggtgct
C2H2 zinc finger transcription factors 10	366	accTTAGggaccaat
PRDI-BF1 and RIZ homologous (PR) domain proteins (PRDM)	374	ttggtccctAAGGttagcgcggagaatgc
E2F-myc activator/cell cycle regulator	376	tctccGCGCtaacctta
E2F-myc activator/cell cycle regulator	379	ggttaGCGCggagaatg
AHR-arnt heterodimers and AHR-related factors	389	cgcgagaatGCTTgggttccccgg
C2H2 zinc finger transcription factors 3	389	GAATgcttgggtt

Neuron-specific olfactory factor	400	ttgggtTCCCcggagcacagcag
Neuron-restrictive silencer factor	402	gcttgggtcccCGGAgcacagcagggggaa
Retinoblastoma-binding proteins with demethylase activity	407	GCACagcag
Members of ZIC-family, zinc finger protein of the cerebellum	408	gagcaCAGCaggggg
Twist subfamily of class B bHLH transcription factors	409	cggagcaCAGCagggggaagt
CTCF and BORIS gene family, transcriptional regulators with 11 highly conserved zinc finger domains	410	cccggagcacagcAGGGggaagtatta
Myeloid zinc finger 1 factors	415	agGGGGaagta
Human and murine ETS1 factors	416	cagcagggGGAAtattagcg
Hepatic Nuclear Factor 1	418	cgcTAATacttcccct
Pleomorphic adenoma gene	420	caGGGGaagattatagcgagaga
E2F-myc activator/cell cycle regulator	424	ctctcTCGCTaatactt
E2F-myc activator/cell cycle regulator	427	tattaGCGAgagagacg
PAX-3 binding sites	428	cTCGTctctctcgtaata
Core promoter motif ten elements	439	agagacgAGCGagcgggagcg
Core promoter motif ten elements	443	acgagcgAGCGggagcgggag
Activator-, mediator- and TBP-dependent core promoter element for RNA polymerase II transcription from TATA-less promoters	444	gaGCGGgagcg
GA-boxes	445	acgagCGAGcgggagcgggagaaag
PAX-2/5/8 binding sites	446	gacgagcggagcgggAGCGggagaaagagg
GA-boxes	447	gagcgAGCGggagcgggagaaagag
Activator-, mediator- and TBP-dependent core promoter element for RNA polymerase II transcription from TATA-less promoters	450	gaGCGGgagaa
E2F-myc activator/cell cycle regulator	450	cgggagcggGAGAAaga
GA-boxes	453	gcgggAGCGggagaaagagcaggg
Positive regulatory domain I binding factor	456	gcgggaGAAAgagcaggg
Calcium-response elements	457	agaaaGAGGca
GA-boxes	459	gcgggAGAAagagcagggagaggg
GA-boxes	463	gagaaAGAGgcagggagagggcgac
Myc-interacting Zn finger protein 1	470	gtcgcCCTCtc
EGR/nerve growth factor induced protein C & related factors	479	gtgtgcggcGGAGtcgc
EGR/nerve growth factor induced protein C & related factors	485	ctctGCGTgtgcggcgg
PAX-9 binding sites	488	ccCACCTctgcgtgtgcggcg
C2H2 zinc finger transcription factors 2	493	cccgcCCCCacctctgcgtgtgc
EGR/nerve growth factor induced protein C & related factors	496	gcagaggTGGGggcggg
C2H2 zinc finger transcription factors 2	497	tcctcccgCCCCacctctgcgt
EGR/nerve growth factor induced protein C & related factors	498	agaggtggGGGCgggag
Krueppel like transcription factors	500	aggtgGGGGcgggagga
GC-Box factors SP1/GC	501	ggtggGGGCgggaggag
Activator-, mediator- and TBP-dependent core promoter element for RNA polymerase II transcription from TATA-less promoters	503	ggGCGGgagga
E2F-myc activator/cell cycle regulator	503	tggggGCGGgagagcgg
Nucleoside diphosphate kinase	503	tgGGGGcgggagagcgg
EGR/nerve growth factor induced protein C & related factors	504	gggggcGGGAggagcga
Myc associated zinc fingers	506	gcggGAGGagcga
Krueppel like transcription factors	508	gcgggaggagcgaAGGG

Krueppel like transcription factors	517	gcgaaGGGGaggaggag
Myeloid zinc finger 1 factors	517	aaGGGGaggag
C2H2 zinc finger transcription factors 7	517	tcctcCTCCccttcg
PRDI-BF1 and RIZ homologous (PR) domain proteins (PRDM)	518	gaggagcgaAGGGgaggaggagaaggcag
C2H2 zinc finger transcription factors 7	520	ttctcCTCCtccct
Myc associated zinc fingers	522	ggagGAGGagaag
Myoblast determining factors	532	agaaGGCAggcggagga
EGR/nerve growth factor induced protein C & related factors	537	gcagGCGGaggaggtgg
C2H2 zinc finger transcription factors 7	539	cccacCTCCtccgcc
C2H2 zinc finger transcription factors 2	541	actcctCCCActcctccgcctg
EGR/nerve growth factor induced protein C & related factors	546	ggaggtGGGAggagtg
Myc associated zinc fingers	548	gtggGAGGagtgg
PAX-2/5/8 binding sites	560	aacaggagccggcgAGCGgccactcctc
Huntington's disease gene regulatory region binding proteins	566	cgctcgCCGtctctgtg
Vertebrate SMAD family of transcription factors	567	gccggCTCCtg
ZF5 POZ domain zinc finger	582	tgcCGCGctgcgagc
KRAB domain zinc finger protein 57	586	gacTGCCgcgctg
CTCF and BORIS gene family, transcriptional regulators with 11 highly conserved zinc finger domains	610	ttagcggccccgggtcGCCAgcagcc
C2H2 zinc finger transcription factors 10	619	ttaTTAGcgccccgc
Homeodomain transcription factors	620	cgcggggCGCTaataaggc
PREB core-binding element	621	ccttaTTAGcgcccc
Paralog hox genes 1-8 from the four hox clusters A, B, C, D	622	acgccTTATtagcgccccg
Homeobox transcription factors	623	gacgccttATTAgcgcccc
Lim homeodomain factors	623	gcgggggcgcTAATAaggcgtccg
Brn-5 POU domain factors	624	ccggacgccttATTAgcgccccg
Homeobox transcription factors	624	ggcgctataATAaggcgtcc
Lim homeodomain factors	624	ccggacgcctTATtagcgccccg
Serum response element binding factor	624	ggcgctAATAaggcgtcc
Paralog hox genes 1-8 from the four hox clusters A, B, C, D	625	ggcgcTAATAaggcgtccg
Cart-1 (cartilage homeoprotein 1)	626	ggcgcTAATAaggcgtccgga
Winged helix binding sites	629	cggACGCctta
Human and murine ETS1 factors	631	ggagctCCGGacgccttatta
Human and murine ETS1 factors	636	aggcgtcCGGAgctccccgga
Homolog to deformed epidermal autoregulatory factor-1 from D. melanogaster	639	agtCCGGggagctccggac
Neuron-restrictive silencer factor	646	tccggagctcccCGGActgccctcccgcg
Pleomorphic adenoma gene	646	ggGAGGggcagtcggggagctc
GLI zinc finger family	650	cggactgCCCCtccc
Krueppel like transcription factors	651	gcgggaGGGGcagtcg
Nucleoside diphosphate kinase	652	ggCGGGaggggcagtc
Myc associated zinc fingers	653	gcgggaGGGGcag
CTCF and BORIS gene family, transcriptional regulators with 11 highly conserved zinc finger domains	654	gcgccacggcggaGGGGcagtcggg
GC-Box factors SP1/GC	654	acggcgGGAGgggagtc
EGR/nerve growth factor induced protein C & related factors	655	cacggcGGAGggggcag
C2H2 zinc finger transcription factors 7	655	tgcccCTCCcgccgt
C2H2 zinc finger transcription factors 2	656	gactgCCCCtcccggcgtggcgc

PRDI-BF1 and RIZ homologous (PR) domain proteins (PRDM)	657	gtggcgcccACGGcgggaggggcagtccg
Selenocysteine tRNA activating factor	657	ccggactgccccTCCCgccgtggcgccacg
CTCF and BORIS gene family, transcriptional regulators with 11 highly conserved zinc finger domains	659	cgtggcgccacggCGGGaggggcagt
E-box binding factors	660	ggcgCCACggcgggagg
Pleomorphic adenoma gene	661	cgtggGCGCcacggcgggagggg
E2F-myc activator/cell cycle regulator	664	cgtggGCGCcacggcgg
ZF5 POZ domain zinc finger	666	acgtggGCGCcacgg
E2F-myc activator/cell cycle regulator	667	ccgtgGCGCccacgtca
EGR/nerve growth factor induced protein C & related factors	669	catgACGTgggcgccac
Pleomorphic adenoma gene	670	ccgtgGCGCccacgtcatgcggg
cAMP-responsive element binding proteins	671	cccgcGACGTgggcgccac
Hypoxia inducible factor, bHLH/PAS protein family	672	ccgcataCGTGggcg
cAMP-responsive element binding proteins	674	ggccccgcaTGACgtggcg
Cyclin D binding myb-like transcription factor	677	gccccGCATgacg
Chorion-specific transcription factors with a GCM DNA binding domain	679	cgggcCCCGcatgac
General transcription factor IIIC, GTF3C	685	GGTTcgggccc
Pleomorphic adenoma gene	689	ggGGGGcgcgggttcgggccccg
Cell cycle regulators: Cell cycle dependent element	692	ggggCGCGggttc
RNA polymerase II transcription factor II B	693	ccgCGCC
ZF5 POZ domain zinc finger	693	gaaccCGCGcccc
GC-Box factors SP1/GC	694	gcggggGGCGcgggttc
ZF5 POZ domain zinc finger	694	cgggggGCGCgggtt
C2H2 zinc finger transcription factors 2	695	ccgaacCCGCccccccgcaccg
EGR/nerve growth factor induced protein C & related factors	698	cgtgctgGGGGcgcggg
GLI zinc finger family	698	cgcgCCCCccgcacc
C2H2 zinc finger transcription factors 2	698	aaccgcgCCCCccgcaccgtgt
EGR/nerve growth factor induced protein C & related factors	700	cacggtgCGGGggcg
Chorion-specific transcription factors with a GCM DNA binding domain	700	cgcccCCCGcaccgt
C2H2 zinc finger transcription factors 2	701	ccgcgCCCCccgcaccgtgtcag
Core promoter motif ten elements	723	gccccgAGCGgtctccaatc
CTCF and BORIS gene family, transcriptional regulators with 11 highly conserved zinc finger domains	727	attggagaccgtcgggGGCTggtgtg
C2H2 zinc finger transcription factors 4	751	ggGCTCgacctcc
EGR/nerve growth factor induced protein C & related factors	756	cagggtGGGAggtcgag
GLI zinc finger family	756	tcgacctCCCAcct
Nucleoside diphosphate kinase	757	ccAGGtgggaggtcga
EGR/nerve growth factor induced protein C & related factors	758	tccaggTGGGaggtcg
Spalt-like transcription factor 2	759	caggGTGGgag
Pleomorphic adenoma gene	762	gaGAGGtccagggtgggaggtc
Vertebrate SMAD family of transcription factors	767	agaggCTCCag
snRNA-activating protein complex	783	ctcgcCCTAggcggagaag
Activator protein 2	785	tccGCCTaggcgag
Activator protein 2	785	ctcGCCtaggcgga
C2H2 zinc finger transcription factors 2	794	accctCCCtctctgcacctag

C2H2 zinc finger transcription factors 7	795	ctcccCTCCtctcgc
Krueppel like transcription factors	796	gcgagaggaggggAGGG
Myc associated zinc fingers	797	agagGAGGggagg
C2H2 zinc finger transcription factors 2	798	ctggacCCTCccctctctcgc
EGR/nerve growth factor induced protein C & related factors	800	gaggagGGGAgggtcca
Krueppel like transcription factors	800	gaggaGGGgagggtcca
Myeloid zinc finger 1 factors	800	gaGGGgagggt
Pur-alpha binds both single-stranded and double-stranded DNA in a sequence-specific manner	800	ggAGGGgagggtc
C2H2 zinc finger transcription factors 7	800	ggaccCTCCcctct
GC-Box factors SP1/GC	801	aggaggGGAGggtccag
Nucleoside diphosphate kinase	803	gaGGGgagggtccagg
Nuclear factor kappa B/c-rel	803	agGGGAgggtccagg
Testis-specific bHLH-Zip transcription factors	803	gGGAGggtcca
PAX-4/PAX-6 paired domain binding sites	806	ggggaggggtCCAGgggagc
Pleomorphic adenoma gene	809	cgggtGCCGccctggacctccc
E2F-myc activator/cell cycle regulator	812	cgggtGCCGccctggac
E2F-myc activator/cell cycle regulator	815	cagggGCCGccaccggtc
Pleomorphic adenoma gene	818	cagggGCCGccaccggtcccact
PAX-2/5/8 binding sites	824	gggagCCACcgggtcccactggcgggagc
PAX-2/5/8 binding sites	830	caccggtcccactGGCGggagcgcggt
GC-Box factors SP1/GC	832	ccgactggcgGGACgcg
E2F-myc activator/cell cycle regulator	834	gactGGCGggagcgcg
E2F-myc activator/cell cycle regulator	838	tcaacGCCGgtcccgc
Winged helix binding sites	838	gggACGCgct
ZF5 POZ domain zinc finger	838	caacCGCGtcccgc
Cell cycle regulators: Cell cycle dependent element	841	gacgCGCGttgag
AP1, Activating protein 1	847	cggtGAGTtaatt
Hepatic Nuclear Factor 1	847	cgcggtgaGTTAattat
Lim homeodomain factors	847	acgcggttgagtTAATtatagg
Brn POU domain factors	848	ctataaTTAActcaacg
Lim homeodomain factors	848	tcctataaTTAActcaacg
Cart-1 (cartilage homeoprotein 1)	849	tcctaTAATtaactcaacg
Distal-less homeodomain transcription factors	849	gcggttgagtAATTtatagg
Pancreatic and intestinal homeodomain transcription factor	849	gcggttgagtTAATtatagg
GHF-1 pituitary specific pou domain transcription factor	849	tataaTTAActcaac
Paralog hox genes 1-8 from the four hox clusters A, B, C, D	850	tcctatAATTaactcaacg
Octamer binding protein	850	ttgagttaATTatag
GHF-1 pituitary specific pou domain transcription factor	850	ttgagTTAAttatag
Abdominal-B type homeodomain transcription factors	851	tcctataaTTAActcaa
Brn POU domain factors	851	ggttgagtTAATtataggaa
Homeobox transcription factors	851	ttcctatAATTaactcaac
Homeodomain transcription factors	851	ggttgagtAATTataggaa
Lim homeodomain factors	851	gcggttgagtTAATtatagggaagg
NK1 homeobox transcription factors	851	tcctatAATTaactcaa
NK6 homeobox transcription factors	851	tgagTTAAttatagg
PAX homeodomain binding sites	851	cctatAATTaactca
Brn POU domain factors	852	cttcctaTAATtaactcaa
Homeobox transcription factors	852	ttgagttAATTataggaa
Hepatic Nuclear Factor 1	852	ttcctataATTAActca

Homeodomain transcription factors	852	cttcctatAATTaactcaa
Lim homeodomain factors	852	cccttctaTAATtaactcaacg
NK1 homeobox transcription factors	852	tgagttAATTataggaa
NK6 homeobox transcription factors	852	tcctaTAATtaactc
PAX homeodomain binding sites	852	gagttAATTatagga
Paralog hox genes 1-8 from the four hox clusters A, B, C, D	853	tgagttaATTAtaggaagg
MEF2, myocyte-specific enhancer binding factor	853	ccccttcCTATAaattaactcaac
NKX homeodomain factors	853	tgagtTAATtataggaagg
Octamer binding protein	853	ttcctataATTAact
Cart-1 (cartilage homeoprotein 1)	854	tgagtTAATtataggaagggg
Distal-less homeodomain transcription factors	854	cccttctatAATTaactc
Hepatic Nuclear Factor 1	854	aGTTAattataggaagg
Pancreatic and intestinal homeodomain transcription factor	854	cccttctaTAATtaactc
Signal transducer and activator of transcription	857	ttaattataGGAAGggggga
snRNA-activating protein complex	858	cTCCCcttcctataatta
Human and murine ETS1 factors	859	taattatAGGAaggggggaggg
C2H2 zinc finger transcription factors 2	859	accctCCCccttcctataattaa
C2H2 zinc finger transcription factors 2	862	cggaccctCCCCcttcctataat
Kruppel like transcription factors	863	taggaaGGGGgaggggtc
C2H2 zinc finger transcription factors 2	864	ctcggACCCcccccttcctata
EGR/nerve growth factor induced protein C & related factors	865	ggaaggGGGAGgggtccg
C2H2 zinc finger transcription factors 7	865	ggaccCTCCccttc
GC-Box factors SP1/GC	866	gaagggGGAGggtccga
Nucleoside diphosphate kinase	868	agGGGGaggggtccgagg
Testis-specific bHLH-Zip transcription factors	868	gGGAGggtccg
Pleomorphic adenoma gene	870	aaGGGGgaggggtccgagggctgg
RXR heterodimer binding sites	872	agggGGAGggtccgagggctggtcc
Myc-interacting Zn finger protein 1	876	ccagcCTCg
SOX/SRY-sex/testis determinig and related HMG box factors	894	gaggtgAATTtcttacagcccagga
Nuclear factor kappa B/c-rel	898	aggtgaatTTCctac
Farnesoid X - activated receptor response elements	899	AGGAaattcacct
Farnesoid X - activated receptor response elements	899	AGGTgaatttct
FAST-1 SMAD interacting proteins	901	gaggaggtgAATTtct
SOX/SRY-sex/testis determinig and related HMG box factors	903	gtaggaAATTcacctctccaacct
C2H2 zinc finger transcription factors 7	906	ttcacCTCCtccaac
RXR heterodimer binding sites	908	agtgGAGGttggaggaggtgaattt
C2H2 zinc finger transcription factors 3	918	GAACagtggaggt
Heat shock factors	935	tctcccagccagAGAAAttctccccg
C2H2 zinc finger transcription factors 3	935	GAATtctctggct
Heat shock factors	942	ttctctcggggAGAAAttctctggc
SOX/SRY-sex/testis determinig and related HMG box factors	943	ccagagAATTtccccgaagagaag
"Negative" glucocorticoid response elements	946	ttCTCCccaagaga
Signal transducer and activator of transcription	958	gaggTTCCagggcttctct
X-box binding factors	958	agagaagccctGGAacctc
Nuclear factor kappa B/c-rel	964	tctggaggTTCcagg
GATA binding factors	972	tccAGATcttaac
Hepatic Nuclear Factor 1	978	accgcgtgGTTAagatc

snRNA-activating protein complex	980	aTCACcgctggttaagat
E-box binding factors	981	atcaccgCGTGgtaag
E-box binding factors	982	ttaaccaCGCGgtgac
RXR heterodimer binding sites	983	agggagatcaccgcgTGGTtaagat
Homeodomain transcription factors	985	aaccacgCGGTgatctccc
Neuron-restrictive silencer factor	986	atcttaaccacgCGGTgatctcccttcagg
Homolog to deformed epidermal autoregulatory factor-1 from <i>D. melanogaster</i>	988	cacGCGGtgatctcccttc
Human and murine ETS1 factors	996	tggtgcctGGAAGggagatca
Signal transducer and activator of transcription	998	ctggtgcctGGAAGggaga
Signal transducer and activator of transcription	1000	tcccTTCCaggcaccagtc
GLI zinc finger family	1014	gtcaCCTCccacggt
RBPJ - kappa	1015	aacgTGGGaggtg
EGR/nerve growth factor induced protein C & related factors	1016	caaaACGTgggaggtga
Hypoxia inducible factor, bHLH/PAS protein family	1019	tgccaaaaCGTGggagg
C2H2 zinc finger transcription factors 2	1026	ggacaCCCCctgccaaaacgtgg
Myoblast determining factors	1028	ttttGGCAGggggtgct
Insulinoma associated factors	1029	ttggcaGGGGgtgt
Kruppel like transcription factors	1030	ttggcaGGGGgtgtcct
Glucocorticoid responsive and related elements	1031	ttggcaggggtGTCCttc
Pleomorphic adenoma gene	1037	caGGGGgtgtccttctttgtaag
SOX/SRY-sex/testis determinig and related HMG box factors	1038	agcttACAAagaaggacaccccctg
Fork head domain factors	1056	aaagccTAAAcagagc
PAX-4/PAX-6 paired domain binding sites	1062	tgtttAGGCtttatcgtt
Homeodomain-leucine zipper transcription factors	1068	ctttaTTCGttata
Vertebrate TATA binding protein factor	1070	taataTAAAcgaataaa
AT rich interactive domain factor	1071	aactaATATAaacgaataaag
Fork head domain factors	1071	ctaataTAAAcgaataa
Homeodomain transcription factors	1071	actaatataAACgaataaa
Plant TATA binding protein factor	1072	ctaaTATAaacgaat
Cart-1 (cartilage homeoprotein 1)	1073	aaaacTAATataaacgaataa
Special AT-rich sequence binding protein	1073	actAATAtaacgaa
Vertebrate TATA binding protein factor	1077	gtttataTTAGttttaa
Abdominal-B type homeodomain transcription factors	1084	gtatctttTAAActaa
GATA binding factors	1090	aaaaGATAccacg
Human muscle-specific Mt binding site	1090	tggtATCTt
cAMP-responsive element binding proteins	1095	aggaaaggACGTggtatctt
E-box binding factors	1095	gaaagGACGTggtatct
HIF-1 ancillary sequence family	1095	tacCACGtctt
Hypoxia inducible factor, bHLH/PAS protein family	1096	ggaaaggaCGTGgtatc
p53 tumor suppressor	1099	gagtCAAGgaaaggacgtggtatct
Mouse Kruppel like factor	1100	taccacgtcctttCCTTgact
POZ domain zinc finger expressed in B-Cells	1106	cctTTCCTtgactcacc
MAF and AP1 related factors	1108	tccgggTGAGTcaaggaaagg
RXR heterodimer binding sites	1108	catccgggtgagtcAAGGaaaggac
AP1, Activating protein 1	1109	cctTGACTcacc
AP1, Activating protein 1	1109	gggTGAGTcaagg
Chorion-specific transcription factors with a GCM DNA binding domain	1115	actcaCCCGgatgct

Cyclin D binding myb-like transcription factor	1117	caccGGATgctt
Human and murine ETS1 factors	1118	actcaccCGGAtgctccgtt
Homolog to deformed epidermal autoregulatory factor-1 from <i>D. melanogaster</i>	1120	cacCCGGatgctccgtt
Human and murine ETS1 factors	1123	tgataaacGGAAGcatccggg
Heat shock factors	1125	ctagtataaacgGAAGcatccggg
Cellular and viral myb-like transcriptional regulators	1125	gataAACGgaagcat
Vertebrate caudal related homeodomain protein	1129	gcttccgtTTATcactaga
Abdominal-B type homeodomain transcription factors	1130	tctagtgaTAAAcgga
GATA binding factors	1130	tagtGATAaacgg
Fork head domain factors	1142	ctagagtaCACAggcct
Human and murine ETS1 factors	1161	gggtgtgaGGAAGagtcgctg
Brachyury gene, mesoderm developmental factor	1169	actaatctgggTGTGaggaaga
Bicoid-like homeodomain transcription factors	1174	taactTAATctgggtg
Lim homeodomain factors	1175	ttgataactTAATctgggtgga
HOX - MEIS1 heterodimers	1178	TGATAacttaactctg
Hepatic Nuclear Factor 1	1179	cagattaaGTTAtcaaa
Lim homeodomain factors	1179	tcatttgataactTAATctgggt
Sine oculis (SIX) homeodomain factors	1181	attaagtTATCaaat
GATA binding factors	1182	atttGATAactta
LEF1/TCF	1185	aagttatCAAAtgattt
EVI1-myleoid transforming protein	1188	cagaaatcatttGATAa
Brn-5 POU domain factors	1191	agcgggCAGAAatcatttgataa
HOX - PBX complexes	1192	caaaTGATttctgccc
Members of ZIC-family, zinc finger protein of the cerebellum	1201	ggccaCAGCgggcag
CTCF and BORIS gene family, transcriptional regulators with 11 highly conserved zinc finger domains	1202	agcggcaggccacAGCGggcagaaatc
Zfx and Zfy - transcription factors implicated in mammalian sex determination	1208	gtGGCCtggcg
Human and murine ETS1 factors	1216	tcccctcaGGAAGcggcaggc
Activator protein 2	1220	gcttctgAGGGgaa
Chorion-specific transcription factors with a GCM DNA binding domain	1222	atttCCCTcaggaa
Myeloid zinc finger 1 factors	1225	gaGGGgaaatg
Human and murine ETS1 factors	1226	tcctgaggGGAAtgacacca
Core promoter initiator elements	1228	tgTCATttccc
TCF11 transcription factor	1229	GTCAtt
Sine oculis (SIX) homeodomain factors	1233	aggttgGTGTcattt
Brachyury gene, mesoderm developmental factor	1234	ctctcaggtTGGTgtcatttccc
MEF3 binding sites	1239	ctcTCAGgttggt
MYT1 C2HC zinc finger protein	1246	tgagAGTTtgctg
Signal transducer and activator of transcription	1250	aggattccaGCAActctc
Signal transducer and activator of transcription	1252	gagtttgctGGAAtctag
Zfx and Zfy - transcription factors implicated in mammalian sex determination	1266	tgGGCCtgggc
RXR heterodimer binding sites	1267	ctggGAGGtgggcctgggctaggat
Myc associated zinc fingers	1273	ctggGAGGtgggc
GLI zinc finger family	1275	cccacctCCCAggcg

"Negative" glucocorticoid response elements	1278	acCTCCcaggcgtag
Brachyury gene, mesoderm developmental factor	1289	agcaccacaGGTGtctacgcct
PAX-4/PAX-6 paired domain binding sites	1289	cacCCACaggtgtctacgc
Two-handed zinc finger homeodomain transcription factors	1289	tagaCACCTgtgg
Myoblast determining factors	1290	caccACAGgtgtctac
Olfactory associated zinc finger protein	1292	agACACctgtgggtgtct
Olfactory associated zinc finger protein	1293	aaGCACccacaggtgtc
Human acute myelogenous leukemia factors	1295	acctGTGGgtgtcttt
PAX-9 binding sites	1295	gaCACCTgtgggtgtcttcca
POZ domain zinc finger expressed in B-Cells	1304	tgctttcTGGAaagcac
Heat shock factors	1304	tgctgtcttctGGAAagcaccac
Signal transducer and activator of transcription	1304	ctgctttctGGAAagcacc
Heat shock factors	1305	tgggtgctttccAGAAagcagacag
Signal transducer and activator of transcription	1305	gtgctttccAGAAagcaga
Nuclear factor of activated T-cells	1324	caggaGGAAaaggaaatag
Interferon regulatory factors	1327	ggaggaaaagGAAAtagctcc
Human and murine ETS1 factors	1328	gaggaaaaGGAAatagctcca
Peroxisome proliferator-activated receptor	1329	gaggaaaaggaaATAGctccaac
Nuclear factor of activated T-cells	1330	gaaaaGGAAatagctccaa
Nuclear receptor subfamily 2 factors	1331	aggaaaAGGAAatagctccaacctc
Calsenilin, presenilin binding protein, EF hand transcription factor	1347	cgGTCAgtgga
Homeodomain transcription factors	1350	cgtggacCGGTcagtggag
Grainyhead-like transcription factors	1352	ctgaccGGTCcac
HOX - MEIS1 heterodimers	1354	TGACcgggtccacgag