

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



**İNSAN ADAMTS-1 GENİNİN  
TRANSKRİPSİYONEL REGÜLASYONU**

**DOKTORA TEZİ**

**SÜMEYYE AYDOĞAN TÜRKOĞLU**

**BALIKESİR, ŞUBAT 2012**

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



**İNSAN ADAMTS-1 GENİNİN  
TRANSKRİPSİYONEL REGÜLASYONU**

**DOKTORA TEZİ**

**SÜMEYYE AYDOĞAN TÜRKOĞLU**

**BALIKESİR, ŞUBAT- 2012**

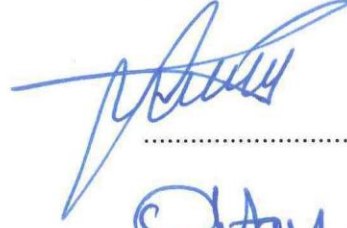
## KABUL VE ONAY SAYFASI

Sümeyye AYDOĞAN TÜRKOĞLU tarafından hazırlanan “İNSAN ADAMTS-1 GENİNİN TRANSKRİPSİYONEL REGÜLASYONU” adlı tez çalışmasının savunma sınavı 29.02.2012 tarihinde yapılmış olup aşağıda verilen jüri tarafından oy birliği ile Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

İmza

Danışman  
Prof. Dr. Feray KÖÇKAR



Üye  
Prof. Dr. Oktay ARSLAN



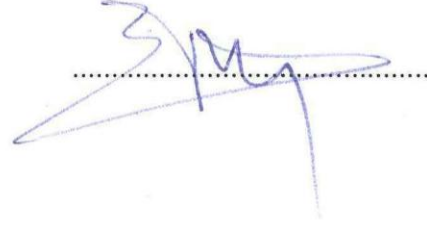
Üye  
Prof. Dr. Sezai TÜRKEK



Üye  
Prof. Dr. Kemal Sami KORKMAZ



Üye  
Doç. Dr. Ekrem DÜNDAR



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

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Doç. Dr. Hilmi NAMLI

.....

**Bu tez çalışması TÜBİTAK tarafından TBAG 110T574 nolu proje ile desteklenmiştir.**

**Bu tez çalışması Balıkesir Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından 2009-18 nolu proje ile desteklenmiştir.**

## ÖZET

**İNSAN ADAMTS-1 GENİNİN  
TRANSKRİPSİYONEL REGÜLASYONU  
DOKTORA TEZİ  
SÜMEYYE AYDOĞAN TÜRKOĞLU  
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**(TEZ DANIŞMANI: PROF. DR. FERAY KÖÇKAR)**

**BALIKESİR, ŞUBAT - 2012**

ADAMTS'ler (A Disintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin Motifs) hem memelilerde hem de omurgasızlarda bulunan bir ekstrasellular, proteaz ailesidir. ADAMTS'ler ilk olarak, ADAMTS-1 ile Kuno ve arkadaşları tarafından 1997 yılında tanımlanmıştır, daha sonra ise ailenin diğer 18 üyesi tanımlanmıştır. Hem anti-anjiyogenetik etkisi hem de agrekanaz aktivitesi bulunan ADAMTS-1 geninin ekspresyonu birçok patofizyolojik durumda değişmektedir. Ancak, literatür incelendiğinde ADAMTS-1 geninin transkripsiyonel regülasyonu ile ilgili bilginin sınırlı olduğu görülmektedir.

Çalışmamızda ADAMTS-1'in Hep3B hücre hattında transkripsiyonel regülasyonu aydınlatılmaya çalışılmıştır. İlk olarak Hep3B hücrelerinde,  $CoCl_2$  ile indüklenen hipoksik modeli oluşturulmuş ve hipoksik durumun ADAMTS-1 mRNA'sının seviyesini arttırdığı belirlenmiştir. Yedi farklı promotor parçası transfekte edilerek ADAMTS-1 transkripsiyonel aktivitesi belirlenmiştir. Ektopik olarak SP1, C/EBP $\alpha$  ve USF transkripsiyon faktörleri hücrelere verilerek (i) Transkripsiyonel aktiviteye etkileri (ii) ADAMTS-1 mRNA seviyesi (iii) ADAMTS-1 protein seviyesine etkileri incelenmiştir. Bu etki hem normal oksijen koşullarında hemde hipoksik koşullarda, 24, 48 ve 72 saatlerde araştırılmıştır. Normal oksijen koşullarında, SP1 ve USF genel anlamda promotor parçalarında transkripsiyonel aktiviteyi azaltırken, bu etki mRNA ve protein düzeyinde de sürmüştür. C/EBP $\alpha$  da ise transkripsiyonel, mRNA ve protein düzeyinde istatistiki olarak anlamlı olacak bir etki görülmemiştir.

**ANAHTAR KELİMELER:** ADAMTS, ADAMTS-1, anjiyogenez, kanser, transkripsiyonel regülasyon

## **ABSTRACT**

**THE FUNCTIONAL ANALYSIS OF HUMAN ADAMTS-1 GENE  
PH.D THESIS  
SÜMEYYE AYDOGAN TÜRKOĞLU  
BALIKESİR UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE  
BIOLOGY**

**(SUPERVISOR: PROF. DR. FERAY KÖÇKAR )**

**BALIKESİR, FEBRUARY 2012**

ADAMTS (A Disintegrin and Metalloprotease with Thrombospondin Motifs) is a novel family of extracellular proteases found in both mammals and invertebrates. ADAMTS-1, identified by Kuno at all in 1997, is the first member of ADAMTS family. Subsequently, the other 18 members of the family have been isolated. It has been shown that the expression of ADAMTS-1 that has both anti-angiogenic and aggrecanase activity was dysregulated in many pathophysiologic circumstances. However, there is limited information available on transcriptional regulation of ADAMTS-1 gene in the literature.

In this study, the transcriptional regulation of ADAMTS-1 is elucidated in HEP3B cells. Firstly, CoCl<sub>2</sub>-induced hypoxic model was performed in Hep3B cells and the hypoxic condition led to the induced ADAMTS-1 mRNA expression. Transcriptional activity was determined by transfecting seven different ADAMTS-1 promoter constructs into the Hep3B cells. The effect of ectopic expression of SP1, C/EBP $\alpha$  and USF on ADAMTS-1 gene expression was analysed in (i) transcription activity of promoter constructs (ii) ADAMTS-1 mRNA level (iii) ADAMTS-1 protein level. The study was performed in both hypoxic and normoxic conditions with different time points namely, 24h, 48h and 72h. In normoxic conditions, SP1 and USF transcription factors resulted in the decrease in ADAMTS-1 transcriptional activity consistent with mRNA and protein level. On the other hand, C/EBP $\alpha$  transcription factor didn't show any statistically significant effect on ADAMTS-1 gene expression.

**KEYWORDS:** ADAMTS, ADAMTS-1, angiogenesis, cancer, transcriptional regulation.

# İÇİNDEKİLER

## Sayfa

ÖZET.....	i
ABSTRACT .....	ii
İÇİNDEKİLER .....	iii
ŞEKİL LİSTESİ.....	vii
TABLO LİSTESİ .....	x
SEMBOL ve KISALTMALAR LİSTESİ .....	xi
ÖNSÖZ.....	xii
<b>1. GİRİŞ.....</b>	<b>1</b>
1.1 ADAMTS Protein Ailesi .....	2
1.2 ADAMTS Proteinlerinin Bilinen Fonksiyonları .....	3
1.2.1 Anti-anjiyogenetik olanlar; ADAMTS 1 ve 8 .....	3
1.2.2 Agrekanazlar; ADAMTS-1, -4, -5, -8, -9 ve -15 .....	4
1.2.3 Prokollajen N-proteinazlar; ADAMTS-2, -3 ve -14.....	5
1.2.4 von Willebrand Faktörünü Parçalayan Proteaz (von Willebrand factor-Cleaving Protease, vWFCP); ADAMTS-13 .....	5
1.3 ADAMTS Proteinlerinin Yapısı.....	6
1.4 ADAMTS Proteinlerinin Ekspresyonu .....	7
1.5 ADAMTS Proteinlerinin İnhibisyonu .....	9
1.6 ADAMTS Proteinleri ve Hastalıklarla İlişkisi .....	9
1.6.1 ADAMTS-2 ve Ehler-Danlos Sendromu tip VIIc .....	9
1.6.2 ADAMT-4 ve ADAMTS-5 ve Osteoartrit.....	10
1.6.3 ADAMTS-10 ve Weill-Marchesani Sendromu .....	11
1.6.4 ADAMTS-13 ve Trombotik Trombositopenik Purpura .....	11
1.7 ADAMTS Proteinlerinin Kanser ve Anjiyogenezle İlişkisi.....	12
1.7.1 Kanser ve anjiyogenez .....	12
1.7.1.1 Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü (VEGF).....	15
1.7.1.2 Trombospondin-1 .....	15
1.7.2 ADAMTS'lerin ilk üyesi: Anti- Anjiyogenetik ADAMTS-1.....	17
1.7.3 ADAMTS-1'in Kanserle İlişkisi.....	19
1.8 ADAMTS-1 ve Transkripsiyonel Olarak Regülasyonu .....	21
1.8.1 Transkripsiyonel Regülasyon .....	21
1.8.2 ADAMTS-1 ve Transkripsiyonel Regülasyonu .....	23
1.9 Çalışmanın Amacı .....	24
<b>2. MATERYAL VE METOT .....</b>	<b>28</b>
2.1 MATERYAL.....	28
2.1.1 Çalışmada Kullanılan Kimyasallar .....	28
2.1.2 Çalışmada Kullanılan Laboratuvar Gereçleri .....	29
2.1.3 Stok Solusyonlar .....	31
2.1.3.1 Kandan DNA izolasyonu Çözeltileri .....	31
2.1.3.2 Agaroz Jel Elektroforezi Çözeltileri.....	32
2.1.3.3 Formaldehit Jel Elektroforezi (RNA Jeli).....	32
2.1.3.4 Çalışmada kullanılan vektörler .....	33
2.1.3.5 <i>Ecoli</i> için Bakteriyel Kültür Ortamları.....	35
2.1.3.6 Antibiyotik Hazırlanması .....	35
2.1.3.7 Transformasyon İçin Kompetent Hücre Hazırlama Çözeltisi.....	35



2.1.3.8	Transfeksiyon Çözeltileri .....	36
2.1.3.9	Lusiferaz ve SEAP (Secreted Alkaline Fosfatase-Salınan Alkalın Fosfataz) Çözeltileri .....	36
2.1.3.10	Western Blot Çözeltileri .....	37
2.1.3.11	Laemli Çözeltisi .....	37
2.1.3.12	SDS PAGE Çözeltileri .....	38
2.2	METOT .....	39
2.2.1	Çalışmada kullanılan ortamın ve malzemenin Temizliği ve Sterilizasyonu .....	39
2.2.2	Bakteriyel Çalışmalar .....	39
2.2.2.1	Çalışmada Kullanılan Bakteri Soyları .....	39
2.2.2.2	Bakteriyel Kültür Ortamı .....	39
2.2.2.3	Antibiyotikler .....	40
2.2.2.4	Kompetent Hücre Hazırlanması .....	40
2.2.2.5	Transformasyon .....	40
2.2.2.6	Plazmit DNA izolasyonu (Küçük ölçekte-Miniprep) .....	41
2.2.2.7	Plazmit DNA izolasyonu (Büyük ölçekte-Maxiprep) .....	41
2.2.2.7.1	Qiagene maxiprep plazmit DNA izolasyonu .....	41
2.2.2.7.2	Roche maxiprep plazmit DNA izolasyonu .....	41
2.2.3	DNA ile ilgili teknikler .....	42
2.2.3.1	Primer Tasarımı .....	42
2.2.3.2	Kandan Genomik DNA İzolasyonu .....	42
2.2.3.3	Polimeraz Zincir Reaksiyonları (PZR) .....	43
2.2.3.4	DNA Agaroz Jel Elektroforezi .....	43
2.2.3.5	Agaroz Jelden DNA Saflaştırılması .....	43
2.2.3.6	DNA miktar tayini .....	43
2.2.3.7	PZR Ürünlerinin T:A Klonlaması .....	44
2.2.4	Hücre Kültürü .....	44
2.2.4.1	Hücre Kültüründe Kullanılacak Malzemelerin Hazırlığı .....	44
2.2.4.1.1	Hücre Kültürü Medyumunun Hazırlanması .....	44
2.2.4.1.2	FCS Hazırlanması .....	45
2.2.4.1.3	PBS Tampon Çözeltisinin Hazırlanması .....	45
2.2.4.2	Çalışmada Kullanılan Hücre Soyları .....	45
2.2.4.3	Hücre Soyunun Başlatılması .....	45
2.2.4.4	Hücrelerin Büyütülmesi .....	46
2.2.4.5	Hücrelerin Pasajlanması .....	46
2.2.4.6	Canlı Hücrelerin Belirlenmesi (Trypan Blue Exclusion) ve Hücre Sayımı .....	46
2.2.4.7	Hücrelerin -80 <sup>0</sup> C’de Saklanması .....	47
2.2.4.8	Kalsiyum-Fosfat Presipitasyon Metoduyla Geçici Transfeksiyon .....	47
2.2.4.9	Lusiferaz Aktivitesinin Ölçülmesi .....	48
2.2.4.10	SEAP (Salınan Alkalın Fosfataz) Aktivitesinin Ölçümü .....	49
2.2.5	RNA ile ilgili Teknikler .....	50
2.2.5.1	Deney dizaynının kurulması .....	50
2.2.5.1.1	Normal koşullar .....	50
2.2.5.1.2	Hipoksik Koşullar .....	50
2.2.5.2	Hücre pelletlerinden RNA izolasyonu .....	51
2.2.5.3	RNA Miktar Tayini .....	51
2.2.5.4	RNA Jel Elektroforezi .....	51
2.2.5.5	Reverse Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonları (RT-PZR) .....	52

2.2.5.5.1	cDNA Eldesi .....	52
2.2.5.5.2	Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR).....	53
2.2.5.6	Gerçek Zamanlı PZR (Q-PZR) .....	56
2.2.6	Protein İle İlgili Teknikler .....	57
2.2.6.1	Western İçin Deney Kurulması .....	57
2.2.6.1.1	Normal koşullar .....	57
2.2.6.1.2	Hipoksik Koşullar .....	57
2.2.6.1.3	Laemli Buffer Kullanılarak Protein Örneklerinin Hazırlanması.....	58
2.2.6.2	SDS PAGE.....	58
2.2.6.3	SDS jelinin Blotlanması.....	58
2.2.6.4	Proteinlerin Belirlenmesi .....	59
2.2.7	İstatistiksel Analiz.....	59
<b>3.</b>	<b>BULGULAR .....</b>	<b>60</b>
3.1	Farklı Hücre Hatlarında ADAMTS-1 Ekspresyonunun Belirlenmesi.....	60
3.2	Hep3B Hücrelerinde Kimyasal İndüklenmiş Hipoksik Koşulların Oluşturulması ve ADAMTS-1 mRNA Seviyesinin Belirlenmesi.....	63
3.2.1	Kimyasal Hipoksi Oluşturulması.....	63
3.2.1.1	Hep3B hücrelerinde kimyasal indüklenmiş hipoksik koşulun doğrulanması .....	65
3.2.2	Normal ve Hipoksik Koşullarda Kullanılacak İnternal Kontrolün Seçimi .....	66
3.2.3	Hep3B Hücrelerinde Hipoksik Koşullarda ADAMTS-1 Ekspresyonu.....	69
3.3	İnsan ADAMTS-1 Geninin Transkripsiyonel Regülasyonu .....	71
3.3.1	ADAMTS-1 Promotorunun Klonlanması.....	72
3.3.1.1	Primerlerin Tasarlanması .....	72
3.3.1.2	İnsan ADAMTS-1 Promotorunun pGEMT Vektörüne Klonlanması .....	73
3.3.1.3	İnsan ADAMTS-1 Promotorunun Dizi Analizi.....	80
3.3.1.4	İnsan ADAMTS-1 Promotorunun pGEMT Easy Vektörüne Alt Klonlama Yapılması.....	82
3.3.1.5	İnsan ADAMTS-1 Promotorunun pMetLuc Reporter Lusiferaz Vektörüne Alt Klonla Yapılması .....	83
3.4	Farklı Uzunluklarda Promotor Parçalarının Kontrolü.....	84
3.5	İnsan ADAMTS-1 Geni Promotorunun Karakterizasyonu .....	86
3.6	İnsan ADAMTS-1 Geni Promotor Bölgesinin Fonksiyonel Analizi .....	90
3.6.1	Lusiferaz/SEAP optimizasyonları.....	91
3.6.2	Bazal Promotor Aktivitesinin Belirlenmesi.....	93
3.6.3	SP1 Transkripsiyon Faktörünün ADAMTS-1 üzerindeki Etkisinin Belirlenmesi.....	96
3.6.3.1	SP1 Transkripsiyon Faktörünün ADAMTS-1 promotor parçaları üzerindeki Etkisinin Belirlenmesi .....	96
3.6.3.2	SP1 Transkripsiyon Faktörünün ADAMTS-1 mRNA Düzeyine Olan Etkilerinin Gerçek Zamanlı PZR (Q-PZR) ile Belirlenmesi.....	103
3.6.3.3	SP1 Transkripsiyon Faktörünün ADAMTS-1 Protein Seviyesine Etkilerinin Belirlenmesi .....	104
3.6.4	USF Transkripsiyon Faktörünün ADAMTS-1 üzerindeki Etkisinin Belirlenmesi.....	107

3.6.4.1	USF Transkripsiyon Faktörünün ADAMTS-1 promotor parçaları üzerindeki Etkisinin Belirlenmesi .....	107
3.6.4.2	USF Transkripsiyon Faktörünün ADAMTS-1 mRNA Düzeyine Olan Etkilerinin Gerçek Zamanlı PZR (Q-PZR) ile Belirlenmesi .....	113
3.6.5	C/EBP $\alpha$ Transkripsiyon Faktörünün ADAMTS-1 üzerindeki Etkisinin Belirlenmesi .....	115
3.6.5.1	C/EBP $\alpha$ Transkripsiyon Faktörünün ADAMTS-1 promotor parçaları üzerindeki Etkisinin Belirlenmesi .....	115
3.6.5.2	C/EBP $\alpha$ Transkripsiyon Faktörünün ADAMTS-1 mRNA Düzeyine Olan Etkilerinin Gerçek Zamanlı PZR (Q-PZR) ile Belirlenmesi .....	119
3.6.5.3	USF ve C/EBP $\alpha$ Transkripsiyon Faktörünün ADAMTS-1 Protein Seviyesine Etkilerinin Belirlenmesi .....	120
<b>4.</b>	<b>SONUÇ VE ÖNERİLER .....</b>	<b>123</b>
<b>5.</b>	<b>KAYNAKLAR.....</b>	<b>132</b>
<b>6.</b>	<b>EKLER.....</b>	<b>145</b>
	EK A Kullanılan Büyüklük Belirteçleri .....	145
	EK B ADAMTS-1 Promotor Bilgileri .....	147
	Ek C Tez Çalışması Kapsamında Yapılan Bilimsel Çalışmalar.....	162

## ŞEKİL LİSTESİ

### Sayfa

Şekil 1.1: ADAMTS ailesi ve sınıflandırılması.....	3
Şekil 1.2: ADAMTS ailesi üyelerinin domain organizasyon farklılıkları .....	7
Şekil 1.3: Genetik dengesizlik ve kanserin oluşum mekanizması.....	13
Şekil 1.4: ADAMTS-1 proteininin üç boyutlu yapısı.....	17
Şekil 1.5: ADAMTS1 proteinin domain yapısı .....	18
Şekil 1.6: Gen İfadesi ve Kontrol Basamakları .....	22
Şekil 1.7: Çalışmanın planlanan basamakları .....	27
Şekil 2.1: pGEMT Vektör Haritası.....	33
Şekil 2.2: pGEMT Easy Vektör Haritası .....	33
Şekil 2.3: pMetLuc Reporter Vektör Haritası.....	34
Şekil 2.4: pMetLuc Kontrol Vektör.....	34
Şekil 2.5: SEAP-2 Kontrol Vektör .....	35
Şekil 2.6: Hemositometre .....	47
Şekil 2.7: Salınan Lusiferaz sisteminin genel çalışma stratejisi.....	49
Şekil 3.1: İnsan ADAMTS-1 geninin ekspresyonu belirlemek amacıyla kullanılan hücre hatlarının resimleri. ....	61
Şekil 3.2: RNA agaroz jel elektroforez görüntüsü.....	62
Şekil 3.3: Farklı hücre hatlarında ADAMTS-1 ekspresyon analizi agaroz jel elektroforez görüntüsü.....	62
Şekil 3.4: CoCl <sub>2</sub> ile kimyasal hipoksi modeli.....	64
Şekil 3.5: HIF-1 için PCR optimizasyonları.....	65
Şekil 3.6: CoCl <sub>2</sub> ile hipoksik koşul oluşumunun HIF-1 seviyesi ile kontrolü için yapılan PZR sonucu .....	66
Şekil 3.7: Hep3B hücre hattında normal ve hipoksik koşullarda GAPDH ekspresyonu .....	68
Şekil 3.8: Hep3B ve PC-3 hücre hattında normal ve hipoksik koşullarda β- aktin ekspresyonu .....	68
Şekil 3.9: Hep3B ve PC-3 hücre hattında normal ve hipoksik koşullarda β-2 Mikroglobulin ekspresyonu.....	69
Şekil 3.10: Hep3B hücre hattında normal ve hipoksik koşullarda β-2 Mikroglobulin ekspresyonu gerçek zamanlı PZR analizi .....	69
Şekil 3.11: CoCl <sub>2</sub> ile oluşturulan hipoksik koşullarda ADAMTS-1 ekspresyonu	70
Şekil 3.12: Normal ve hipoksik koşullar semi kantitatif RT-PZR analizi ile ADAMTS-1 mRNA ifadesi densitometrik analizi.....	71
Şekil 3.13: Normal ve hipoksik koşullar gerçek zamanlı PZR analizi ile ADAMTS-1 mRNA ifadesi densitometrik analizi.....	71
Şekil 3.14: İnsan ADAMTS-1 promotörünün klonlanmasında kullanılan primerlerin bağlanma yerlerinin şematik gösterimi .....	73
Şekil 3.15: Genomik DNA izolasyon sonucu jel görüntüsü.....	74
Şekil 3.16: Spesifik ADAMTS-1 primerleri ile farklı MgCl <sub>2</sub> kullanılarak yapılan PZR Sonucu.....	76

<b>Şekil 3.17:</b> Yeni Primerler Kullanılarak Farklı MgCl <sub>2</sub> konsantrasyonlarında Yapılan PZR Sonucu .....	77
<b>Şekil 3.18:</b> Yeni primerler ile 2mM MgCl <sub>2</sub> kullanılarak yapılan PZR sonucu .....	78
<b>Şekil 3.19:</b> 1596 bç ADAMTS-1 Promotor Bölgesi İçin Yapılan Koloni PZR Sonucu .....	78
<b>Şekil 3.20:</b> Taranan Kolonilerin Restriksiyon Enzimi Kesim Sonuçları .....	79
<b>Şekil 3.21:</b> Koloni PZR sonucu tespit edilen plazmidin KpnI/NotI ve StyI/NotI kesimleri agaroz jel elektroforez sonuçları .....	80
<b>Şekil 3.22:</b> ADAMTS1 promotor bölgesi ve koromozom 21 deki blast sonucu .....	82
<b>Şekil 3.23:</b> KpnI/MluI Restriksiyon enzimleri ile pGEMT Easy Kontrol Kesimi	83
<b>Şekil 3.24:</b> pGEMT Easy vektörüne klonlanan ADAMTS-1 Promotorunun pMetLuc Lusiferaz Vektörüne Klonlama Stratejisinin Şematik Gösterimi .....	84
<b>Şekil 3.25:</b> Transformasyon sonucu taranan 6 koloninin XhoI/MluI restriksiyon enzimleri ile kesim sonucu .....	84
<b>Şekil 3.26:</b> Promotor Parçalarının temsili şekli .....	85
<b>Şekil 3.27:</b> Fare ve İnsan ADAMTS-1 Promotorlarının karşılaştırılması .....	88
<b>Şekil 3.28:</b> -1415/+419 insan ADAMTS-1 promotoru üzerinde yer alan muhtemel transkripsiyon Faktörlerinin bağlanma dizileri ve lokalizasyonları .....	90
<b>Şekil 3.29:</b> pmetluc kontrol vektörünün lusiferaz sonuçları .....	92
<b>Şekil 3.30:</b> SEAP kontrol vektörünün seap sonuçları .....	92
<b>Şekil 3.31:</b> SEAP kontrol ve promotor içermeyen pmetluc reporter vektörlerin lusiferaz aktivite sonuçları .....	92
<b>Şekil 3.32:</b> 2 µg, 1 µg ve 0,5 µg 1834bç (-1415/+419) promotor parçasının Lusiferaz/SEAP aktivitesi optimizasyon sonuçları .....	93
<b>Şekil 3.33:</b> Promotor parçalarının 48 saat bazal aktivitelerinin istatistiksel analizi .....	94
<b>Şekil 3.34:</b> Promotor parçalarının 72 saat bazal aktivitelerinin istatistiksel analizi .....	95
<b>Şekil 3.35:</b> P8 1596 bç (-1545/+51) promotor parçasının bazal aktivitesi .....	95
<b>Şekil 3.36:</b> İki büyük promotor parçasının temsili şekli .....	96
<b>Şekil 3.37:</b> İki büyük promotor parçasının bazal aktivitelerinin karşılaştırılması .....	96
<b>Şekil 3.38:</b> Promotor Parçaları üzerinde SP1 bağlanma bölgelerinin gösterilmesi .....	98
<b>Şekil 3.39:</b> Ektopik olarak üretilen SP1'in mRNA ifedsinin gerçek zamanlı PZR ile gösterilmesi .....	100
<b>Şekil 3.40:</b> P1 (1834 bç) ADAMTS-1 promotor parçasına SP1 transkripsiyon faktörünün 48 ve 72 saatteki etkisi .....	100
<b>Şekil 3.41:</b> P2 (1699 bç) ADAMTS-1 promotor parçasına SP1 transkripsiyon faktörünün 48 ve 72 saatteki etkisi .....	101
<b>Şekil 3.42:</b> P3 (1477 bç) ADAMTS-1 promotor parçasına SP1 transkripsiyon faktörünün 48 ve 72 saatteki etkisi .....	101
<b>Şekil 3.43:</b> P4 (1166 bç) ADAMTS-1 promotor parçasına SP1 transkripsiyon faktörünün 48 ve 72 saatteki etkisi .....	101
<b>Şekil 3.44:</b> P5 (912 bç) ADAMTS-1 promotor parçasına SP1 transkripsiyon faktörünün 48 saatteki etkisi .....	102
<b>Şekil 3.45:</b> P6 (657 bç) ADAMTS-1 promotor parçasına SP1 transkripsiyon faktörünün 48 saatteki etkisi .....	102

<b>Şekil 3.46:</b> P7 (548 bç) ADAMTS-1 promotor parçasına SP1 transkripsiyon faktörünün 48 saatteki etkisi .....	102
<b>Şekil 3.47:</b> SP1'in ADAMTS-1 ekspresyonuna olan etkisi .....	104
<b>Şekil 3.48:</b> SP1'in ADAMTS-1 ekspresyonuna olan etkisi .....	104
<b>Şekil 3.49:</b> SP1 transkripsiyon faktörünün normal oksijen koşullarında ADAMTS-1 Protein Seviyesine Etkisi .....	106
<b>Şekil 3.50:</b> SP1 transkripsiyon faktörünün hipoksik koşullarda ADAMTS-1 Protein Seviyesine Etkisi.....	107
<b>Şekil 3.51:</b> Ektopik olarak üretilen USF'nin mRNA ifadesinin gerçek zamanlı PZR ile gösterilmesi .....	108
<b>Şekil 3.52:</b> USF transkripsiyon faktörü bağlanma bölgesi .....	110
<b>Şekil 3.53:</b> P1 (1834 bç) ADAMTS-1 promotor parçasına USF transkripsiyon faktörünün 48 ve 72 saatteki etkisi.....	111
<b>Şekil 3.54:</b> P2 (1699 bç) ADAMTS-1 promotor parçasına USF transkripsiyon faktörünün 48 ve 72 saatteki etkisi.....	111
<b>Şekil 3.55:</b> P3 (1477 bç) ADAMTS-1 promotor parçasına USF transkripsiyon faktörünün 48 ve 72 saatteki etkisi.....	111
<b>Şekil 3.56:</b> P4 (1166 bç) ADAMTS-1 promotor parçasına USF transkripsiyon faktörünün 48 ve 72 saatteki etkisi.....	112
<b>Şekil 3.57:</b> P5 (912 bç) ADAMTS-1 promotor parçasına USF transkripsiyon faktörünün 48 ve 72 saatteki etkisi.....	112
<b>Şekil 3.58:</b> P6 (657 bç) ADAMTS-1 promotor parçasına USF transkripsiyon faktörünün 48 ve 72 saatteki etkisi.....	112
<b>Şekil 3.59:</b> P7 (548 bç) ADAMTS-1 promotor parçasına USF transkripsiyon faktörünün 48 ve saatteki etkisi.....	113
<b>Şekil 3.60:</b> USF'in ADAMTS-1 ekspresyonuna olan etkisi.....	114
<b>Şekil 3.61:</b> USF'in ADAMTS-1 ekspresyonuna olan etkisi.....	114
<b>Şekil 3.62:</b> Ektopik olarak üretilen C/EBP $\alpha$ 'nın mRNA ifesdisinin gerçek zamanlı PZR ile gösterilmesi .....	115
<b>Şekil 3.63:</b> C/EBP $\alpha$ transkripsiyon faktörünün bağlanma bölgeleri.....	117
<b>Şekil 3.64:</b> Promotor parçalarına C/EBP $\alpha$ transkripsiyon faktörünün 48 saatteki etkisi .....	118
<b>Şekil 3.65:</b> Promotor parçalarına C/EBP $\alpha$ transkripsiyon faktörünün 72 saatteki etkisi .....	118
<b>Şekil 3.66:</b> C/EBP $\alpha$ 'in ADAMTS-1 ekspresyonuna olan etkisi .....	119
<b>Şekil 3.67:</b> C/EBP $\alpha$ 'in ADAMTS-1 ekspresyonuna olan etkisi.....	120
<b>Şekil 3.68:</b> USF ve C/EBP $\alpha$ transkripsiyon faktörünün normal oksijen koşullarında ADAMTS-1 Protein Seviyesine Etkisi.....	121
<b>Şekil 3.69:</b> USF ve C/EBP $\alpha$ transkripsiyon faktörünün hipoksik koşullarda ADAMTS-1 Protein Seviyesine Etkisi .....	122
<b>Şekil 6.1:</b> Fermentas 1 kb DNA büyüklük belirteci .....	145
<b>Şekil 6.2:</b> PageRuler Prestained Protein büyüklük belirteci.....	146

## TABLO LİSTESİ

### Sayfa

<b>Tablo 1.1:</b> ADAMTS üyelerinin alternatif isimleri, kromozom lokalizasyonları ve bilinen substratları .....	6
<b>Tablo 1.2:</b> ADAMTS üyelerinin doku dağılımları.....	8
<b>Tablo 2.1:</b> Çalışmada kullanılan kimyasallar ve üreticileri.....	28
<b>Tablo 2.2:</b> Çalışmada kullanılan laboratuvar gereçleri .....	29
<b>Tablo 2.3:</b> Kandan DNA İzolasyon Çözeltileri.....	31
<b>Tablo 2.4:</b> Agaroz Jel Elektroforezi Çözeltileri .....	32
<b>Tablo 2.5:</b> Formaldehit Jel Elektroforez Çözeltileri.....	32
<b>Tablo 2.6:</b> DEPC'li dH <sub>2</sub> O .....	33
<b>Tablo 2.7:</b> Kompetan Hücre için Kullanılan Çözeltiler .....	35
<b>Tablo 2.8:</b> Transfeksiyon Çözeltileri.....	36
<b>Tablo 2.9:</b> Lusiferaz Aktivite Ölçüm Çözeltileri .....	36
<b>Tablo 2.10:</b> SEAP Aktivite Ölçüm Çözeltileri.....	36
<b>Tablo 2.11:</b> Western Blot Çözeltileri .....	37
<b>Tablo 2.12:</b> Laemli Tamponu.....	37
<b>Tablo 2.13:</b> SDS PAGE Çözeltileri.....	38
<b>Tablo 2.14:</b> cDNA Eldesi İçin Uygun PZR Bileşenleri .....	52
<b>Tablo 2.15:</b> ADAMTS-1 için Optimum Döngü ve PZR Bileşenleri .....	53
<b>Tablo 2.16:</b> VEGF ve HIF1 için Optimum Döngü ve PZR Bileşenleri .....	53
<b>Tablo 2.17:</b> GAPDH, $\beta$ -AKTİN VE $\beta$ -2-Mikroglobulin için PZR Koşulları .....	54
<b>Tablo 2.18:</b> PZR Bileşenleri.....	55
<b>Tablo 2.19:</b> Çalışmada Kullanılan Primer Bilgileri .....	55
<b>Tablo 2.20:</b> Gerçek Zamanlı PZR Bileşenleri.....	56
<b>Tablo 2.21:</b> Gerçek Zamanlı PZR Koşulları .....	56
<b>Tablo 3.1:</b> ADAMTS-1 Promotorunun -1545/+51 Bölgesinin Çoğaltılmasında Kullanılan İlk Primer Bilgileri .....	75
<b>Tablo 3.2:</b> ADAMTS-1 Promotorunun Çoğaltılmasında Kullanılan PZR Koşulları .....	75
<b>Tablo 3.3:</b> ADAMTS-1 Promotorunun -1545/+51 bç Bölgesinin Çoğaltılmasında Kullanılan İkinci Primer Bilgileri .....	77
<b>Tablo 3.4:</b> -1415/+419 insan ADAMTS-1 promotörü üzerinde yer alan muhtemel transkripsiyon Faktörlerinin bağlanma dizileri ve lokalizasyonları .....	86

## SEMBOL ve KISALTMALAR LİSTESİ

<b>ADAMTS</b>	A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs
<b>ADAMTS-1</b>	A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs type 1
<b>BSA</b>	Sığır Serum Albumin
<b>C/EBP<math>\alpha</math></b>	CCAAT/enhancer-binding protein
<b>DNA</b>	Deoksiribonükleik Asit
<b>DMSO</b>	Dimetil Sulfoksit
<b>DEPC</b>	Dietilpirokarbonat
<b><i>E.coli</i></b>	Escherichia coli
<b>EDTA</b>	Ethylendiamintetrasedik asit
<b>FA</b>	Formaldehit Agaroz
<b>FCS</b>	Fetal Sığır Serumu
<b>LB</b>	Luria Broth
<b>mRNA</b>	Mesajcı Ribonükleik Asit
<b>USF</b>	Upstream stimulatory factor 1
<b>UV</b>	Ultra-viyole
<b>P</b>	Promotor
<b>PAGE</b>	Poliakrilamid jel elektroforezi
<b>PZR</b>	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
<b>RPM</b>	Dakikadaki Dönüş Sayısı
<b>RT-PZR</b>	Reverse Transkripsiyon Polimeraz Zincir Reaksiyonu
<b>SDS</b>	Sodyum Dodesil Sülfat
<b>SP1</b>	Specificity protein 1alpha
<b>QRT-PZR</b>	Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu



## ÖNSÖZ

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

Tez çalışması sürecinde çalışmanın her aşamasında yardımlarını esirgemeyen, tüm deneysel zorluklarda bilgi ve tecrübesiyle hep yanımda olan, özel hayatımda da desteğini hep hissettiğim biricik hocam Prof. Dr. Feray KÖÇKAR'a,

Tez izleme komitesinde yer alarak bilimsel yaklaşımlarıyla katkı sağlayan Prof. Dr. Kemal Sami KORKMAZ'a ve Doç. Dr. Ekrem DÜNDAR'a,

Zorlu laboratuvar günlerinde güzel enerjileriyle yanımda olan Yrd. Doç. Dr. F. Bahar Sunay, Yrd. Doç. Dr. Hatice Yıldırım, Dr. Ayla Solmaz, Araş. Gör. Meltem Aydın'a ve ortamı hep neşelendiren Tuğşen Aydemir, Derya Okuyan, Esra Solmaz ve diğer grup arkadaşlarıma,

Hayattaki amacım doğrultusunda hep yanımda olan, beni güçlendiren ve bana inanan hayat arkadaşım sevgili eşim Melih Türkoğlu'na ve ailesine,

Hep en yakın arkadaşlarım olan tüm sıkıntılarımı paylaşan sevgili kız kardeşlerim Yasemin, Ayşenur ve Ferhan'a,

Bu çalışmanın ortaya çıkmasında en fazla katkısı olan annem Ayşen Aydoğan ve babam İbrahim Aydoğan'a

Teşekkürlerimi sunarım.

# 1. GİRİŞ

Hücrelerin hücre dışı ortamla olan etkileşimlerini sağlayan hücre dışı matriks hücrelere mekanik destek sağlamanın yanında embriyogenez, hücre göçü, yara tamiri ve programlanmış hücre ölümü gibi pek çok fizyolojik olayda da önemlidir. Bu fizyolojik olayların dışında, tümör metastazından AIDS'e kadar pek çok patolojik durumda da aynı etkileşimler son derece önemlidir. Hücre yüzeyi ve ekstraselüler matriksdeki proteazlar bu fizyolojik ve patolojik olaylarda oldukça önemli rollere sahiptirler [1-12].

Ekstraselüler matriksin proteolitik yıkımında proteaz aktivitesine sahip çok sayıda molekül görev alır. Bu moleküller domain yapılarına göre çok sayıda protein ailesi olarak gruplandırılır. İlk grup trombin, doku plazminojen aktivatörü, urokinaz ve plazmini içeren serin proteazlardır. İkinci grup olan matriks metalloproteinazlar (MMP) 23 üyeden oluşan yüksek oranda korunmuş Zn-bağımlı endopeptidazlardır. Bu ilk iki grup ECM yıkımında ve kanser metazasında görev alan geniş spektrumlu proteazlardır. Üçüncü grup kemik farklılaşma protein 1/tolloid ailesi metalloproteinazlarıdır. Son grup ise hücre-hücre adezyonu ve proteolizde görev alan ADAM (bir disintegrin ve metalloproteaz) veya MDC (metalloproteaz/disintegrin/sistein) olarak adlandırılan transmembran glikoproteinlerdir [1-12]. ADAM ailesinde yer alan proteinler, hücre membranında bulunan ve çok sayıda domeyne sahip olan çinko bağımlı metalloproteinazlardır. "ADAM" terimi "bir disintegrin ve metalloproteinaz" anlamına gelmektedir. Disintegrin ve metalloproteinaz domeynleri sayesinde ADAM'lar, hem adezyon proteinlerinin hem de proteinazların özelliklerine sahiptirler. Bu özellikleri ADAM'ları diğer hücre yüzey proteinlerinden ayırır ve hücre-hücre etkileşimleri ile hücre-matriks etkileşimlerinde önemli rollere sahiptirler [9-12]. Bugüne kadar ADAM ailesine ait 30'a yakın protein tanımlanmıştır ve bazılarının fonksiyonları tanımlanmıştır.

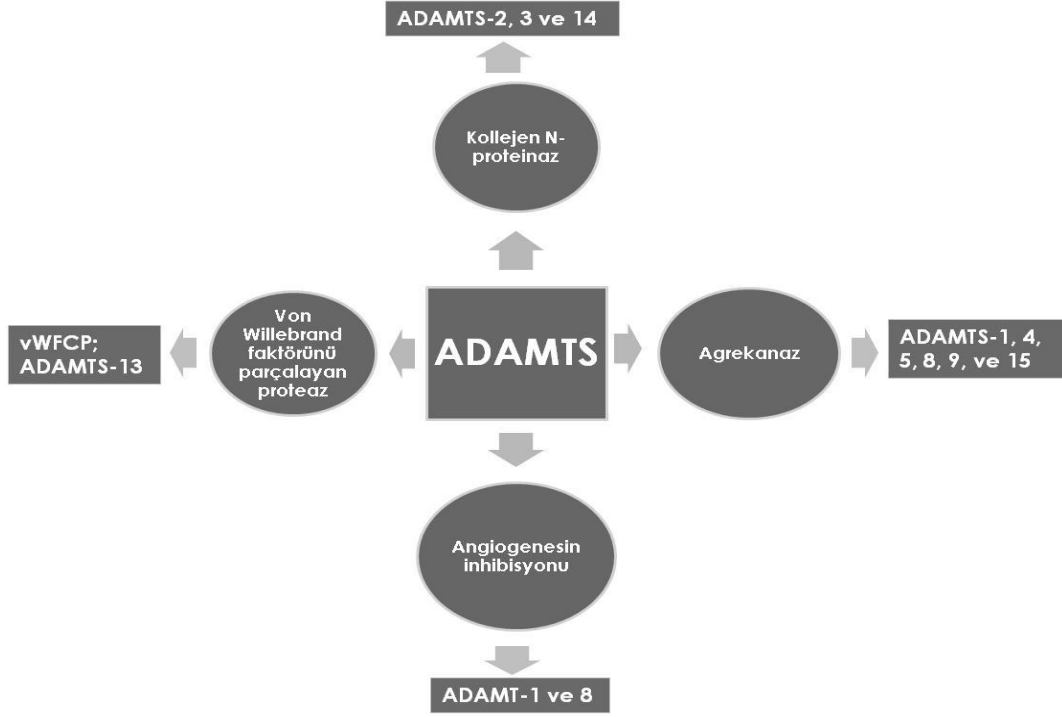
ADAM ailesi proteinlerinin geniş ölçüde tanımlanmasının ardından ADAM-ilişkili yeni bir grup proteinin varlığı Kuno ve arkadaşları [3] tarafından 1997 yılında gösterilmiştir. Kuno ve arkadaşları farelere, enjekte ettikleri bir hücre hattıyla kaşeksik kolon kanseri modeli oluşturmuşlar ve bu kanser türünde ifade olan genleri belirlemişlerdir. Bu çalışmada, ADAM protein ailesinin üyelerine çok benzeyen, trombospondin tip 1 (TSP1) motifleri taşıyan ve inflamasyonla ilişkili olan bir protein klonlanmıştır. Araştırmacılar, bu yeni üyeyi tanımlamak için ADAMTS (a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs) adını kullanmışlardır. ADAM ailesi üyelerinin aksine, hücre membranında yer almayıp, ekstrasellüler matrikse salgılanan ADAMTS'ler; ADAM ailesi üyelerinin sahip oldukları tüm domainleri içermelerine rağmen, kendilerine özgü TSP1 motifleri de buldukları için ADAM üyeleri olarak kabul edilmemiştir ve yeni bir aileyi oluşturmuşlardır [3].

### **1.1 ADAMTS Protein Ailesi**

1997 de bulunan ilk üyeyi takiben, ADAMTS ailesine üye yeni proteinler tanımlanmıştır. Bugün, ADAMTS'ler ile benzer domainlere sahip yeni tanımlanmış ADAMTSL (ADAMTS-like) olarak isimlendirilen 3 gen ile birlikte insanda 19 ADAMTS geni tanımlanmıştır. Daha sonra, hücre dışı matriksin şekillenmesi, organogenez ve hemostaz gibi pek çok önemli olayda rol oynayan ADAMTS'ler, domainlerin organizasyonu, protein dizisi, gen dizisi korunmuşluğuna ve substrat tercihine göre gruplandırılmıştır [9-14].

Buna göre bu alt gruplardan bahsetmek gerekirse: (Şekil 1) (i) Kollajen N-proteinazlar; ADAMTS-2, 3 ve 14. Prokollajenin N-ucundaki propeptitleri uzaklaştırarak kollajene dönüşmesinde rol oynarlar. (ii) Agrekanazlar; ADAMTS-1, 4, 5, 8, 9, ve 15. Matriks proteoglikanı olan agrekanın parçalanmasında agrekanaz aktivitesine sahiptirler. Daha sonra bu grubun, merkezi sinir sisteminde yoğun şekilde ifade olan brevikan ile kan damarlarında bulunan versikanı da parçaladığı bulunmuştur. (iii) Anjiogenezin inhibisyonunda görev alanlar; ADAMT1 ve 8. (iv) Kan pıhtılaşması homeoostasta von Willebrand Faktörünü Parçalayan Proteaz olarak bilinen ; ADAMTS-13 (vWFCP) dir. Bu görevlerinin dışında ayrıca ADAMTS'ler organogenez, inflamasyon ve fertilitate da görev almaktadırlar. Ayrıca son çalışmalar

göstermektedir ki artritde ve pekçok kanserde bazı ADAMTS genlerinin ekspresyonları değişmektedir [13,14].



Şekil 1.1: ADAMTS ailesi ve sınıflandırılması

## 1.2 ADAMTS Proteinlerinin Bilinen Fonksiyonları

### 1.2.1 Anti-anjiyogenetik olanlar; ADAMTS 1 ve 8

Vázquez ve arkadaşları tarafından 1999 yılında anti-anjiyogenetik etkiye sahip olan ADAMTS proteinleri tanımlanmıştır [15]. 1999 yılında yapılan bu çalışmada ADAMTS-1 ve ADAMTS8'in; Vasküler Endotelial Büyüme Faktörünün (VEGF) uyardığı anjiyogenezi inhibe ettikleri ve Fibroblast Büyüme Faktörü 2'nin uyardığı vaskülarizasyonu baskıladıklarını bulmuşlardır.

### 1.2.2 Agrekanazlar; ADAMTS-1, -4, -5, -8, -9 ve -15

Agrekan kıkırdak dokusunda bulunan ve kıkırdak dokusunu basınç ve sıkıştırmalara karşı koruyan en önemli moleküldür [16]. Ayrıca agrekanın bir diğer görevi kıkırdak dokusunda bulunan kolajeni degrede olmaktan korumasıdır [17]. Agrekanaz fonksiyonuna sahip olan ADAMTS üyelerinden, enzimatik etkinliği en güçlü olanlar ADAMTS-4 ve ADAMTS-5'dir. Bu iki enzimin, güçlü etkileri nedeniyle, osteoartritte kıkırdak yıkımında, son derece önemli bir role sahip oldukları düşünülmektedir. Ailenin bu iki üyesinin, agrekanın yanı sıra, merkezi sinir sisteminde yoğun şekilde eksprese olan brevikan ile kan damarlarında bulunan versikanı da parçaladığı bulunmuştur [18, 19].

Agrekanaz aktivitesine sahip olan bir diğer proteaz ADAMTS-1'dir. ADAMTS-1'in de agrekanın yanı sıra versikanı parçalayabildiğini bilinmektedir. Yapılan bazı çalışmalar ADAMTS-1'in ekstrasellüler matriks üzerindeki etkisinin follikül üretilmesi için, versikanı degrede edici etkisinin ise ovulasyonun gerçekleşebilmesi için zorunlu olduğunu düşündürmektedir [20-22].

Son yıllarda ADAMTS-9'un da agrekanaz ve versikanaz aktivitelere sahip olduğu bulunmuştur [23]. Yine, çok zayıf da olsa ADAMTS-8'in agrekanaz aktivitesine sahip olduğu gösterilmiştir [24].

Kıkırdak metabolizmasındaki olası rollerinin dışında, agrekanazların fizyolojik ve patolojik olaylarda başka fonksiyonlara da sahip olabilecekleri düşünülmektedir. ADAMTS-1 inaktive farelerle yapılan çalışmalarda; büyüme geriliği, yağ dokusu malformasyonu, uterus ve over histolojisinde değişikliklerle beraber seyreden azalmış fertilitate ve insanda, konjenital bir hastalık olan ureteropelvik birleşme obstrüksiyonunda izlenen renal fenotipe benzer böbrek değişiklikleri bulunmuştur [25]. Ayrıca ADAMTS-1, ovülasyon sırasında progesteron reseptörünün transkripsiyonel bir hedefidir [26] ve kemik ve osteoblastlardaki ekspresyonu paratiroid hormon ve benzeri ajanlarla artar [27].

Bazı kaynaklar, ADAMTS-1, -4, -5, -8, -9, -15 ve -20'yi hiyalektanları (hiyaluronana bağlanan agrekan, brevikan, versikan vb. proteoglikanları) yıktıkları için hiyalektanazlar olarak sınıflandırmaktadır [14]. Yakın zamanda ADAMTS-

4'ün, hiyalektanların yanı sıra, COMP (Cartilage Oligomeric Matriks Proteini), fibromodulin ve dekorin gibi proteinleri de yıktığı gösterilmiştir [28]. ADAMTS-20'nin hiyalektanaz aktivitesini bildiren yayın bulunmamasıyla beraber bu proteinin katalitik domayninin proteolitik aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir [29].

### **1.2.3 Prokollajen N-proteinazlar; ADAMTS-2, -3 ve -14**

Bu grup ADAMTS üyeleri prokollajenin N-ucundaki propeptitleri uzaklaştırarak kollajene dönüşmesinde rol oynarlar [11, 13, 14, 30]. ADAMTS2 geninde meydana gelen mutasyonlar otozomal resesif bir hastalık olan Ehler-Danlos Sendromu (EDS) tip VIIc'ye neden olur [3, 11]. Adamts2-inaktive farelerde ise, doğumda normal olmalarına rağmen, 1-2 ay sonra ciddi deri kırılabilirliği gelişir. Yine, dişi fareler normal fertiliteye sahipken, erkek farelerin steril olduğu belirlenmiştir. Deride meydana gelen anormalliklerin tip I kollajen liflerinin anormal morfolojisiyle birlikte kollajen liflerinin çaplarını arttıramamalarına da bağlı olduğu düşünülmektedir. Sonuç olarak deride kollajen liflerinin olgunlaşması için ADAMTS-2'nin fonksiyon göstermesi zorunludur. Kollajen olgunlaşmasında görev alan diğer ADAMTS üyeleri olan ADAMTS-3 ve ADAMTS-14'ün normal fonksiyon göstermesi; ADAMTS-2 yetersizliğinden kaynaklanan anormallikleri engelleyememektedir [31].

### **1.2.4 von Willebrand Faktörünü Parçalayan Proteaz (von Willebrand factor-Cleaving Protease, vWFPC); ADAMTS-13**

vonWillebrand Faktörü (vWF) plazmada, trombositlerde ve vasküler endotel hücrelerde bulunan büyük, multimerik bir glikoproteindir. Pıhtılaşma faktörlerinden birisi olan faktör VIII'in taşıyıcı proteindir ve trombosit agregasyonuna destek olur. Ayrıca, damar hasarı oluştuğunda, hem trombositlerin yüzeyinde bulunan glikoproteine hem de ortaya çıkan ekstraselüler matriks bileşenlerine bağlanarak trombosit adezyonunu sağlar [11].

vWF'ü multimerik bir protein olarak sentezlenir ve ADAMTS-13 tarafından parçalanarak daha küçük bir moleküle dönüşür. ADAMTS-13'ün bu işlevini yerine

getirememesi durumunda vWF'ü plazmada birikir ve mikrodolaşım boyunca trombosit agregasyonuna neden olur. Bu durum da vWF'den ve trombositlerden zengin mikrovasküler trombusların oluşumu ile karakterize olan anemi, böbrek yetmezliği ve nörolojik fonksiyon bozukluklarının eşlik ettiği Trombotik Trombositopenik Purpura (TTP)'nin oluşumuna neden olur [11].

**Tablo 1.1** ADAMTS üyelerinin alternatif isimleri, kromozom lokalizasyonları ve bilinen substratları [12]

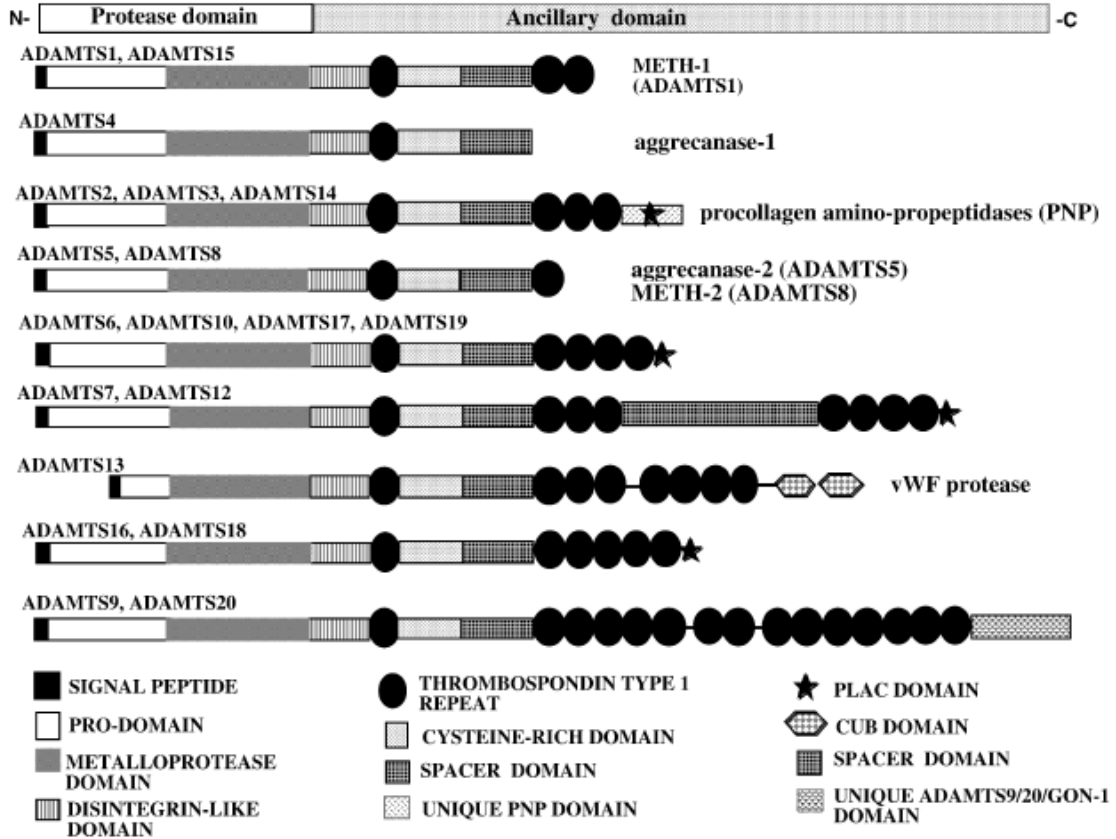
Gen İsmi	Protein İsmi	Alternatif İsmi	Kromozom Lokalizasyonu	Bilinen Substratları
ADAMTS1	ADAMTS1	METH-1; agrekanaaz-3	21q21	Agrekan; versikan V1
ADAMTS2	ADAMTS2	PCINP	5q35	Prokollojen I, II and III N-propeptitler
ADAMTS3	ADAMTS3	KIAA0366	4q21	Prokollojen II N-propeptit
ADAMTS4	ADAMTS4	agrekanaaz-1; KIAA0688	1q23	Agrekan; brevikan; versikan V1; fibromodulin; a decorin; karboksimetillenmiş transferin
ADAMTS5	ADAMTS5	agrekanaaz-2; ADAMTS11	21q21	Agrekan
ADAMTS6	ADAMTS6	-	5q12	-
ADAMTS7	ADAMTS7	-	15q24	-
ADAMTS8	ADAMTS8	METH-2	11q25	-
ADAMTS9	ADAMTS9	KIAA1312	3p14	Agrekan; versikan
ADAMTS10	ADAMTS10	-	19p13	-
ADAMTS12	ADAMTS12	-	5q35	-
ADAMTS13	ADAMTS13	vWFCP	9q34	von Willebrand faktor
ADAMTS14	ADAMTS14	-	10q21	Prokollojen I N-propeptit
ADAMTS15	ADAMTS15	-	11q25	Agrekan
ADAMTS16	ADAMTS16	-	5p15	-
ADAMTS17	ADAMTS17	-	15q24	-
ADAMTS18	ADAMTS18	-	16q23	-
ADAMTS19	ADAMTS19	-	5q31	-
ADAMTS20	ADAMTS20	-	12q12	-

### 1.3 ADAMTS Proteinlerinin Yapısı

ADAMTS proteinlerinin moleküler yapısı incelendiğinde domeynler, modüller ve motifler alt kategorilerinden bahsedilebilir. ADAMTS'ların çok sayıda izoformunun, alternatif splicing ile oluşuyor olması ihtimali son derece yüksektir. ADAMTS üyeleri incelendiğinde N-uçlarının hemen hemen aynı olduğu ve C-uçlarındaki değişkenliğin daha belirgin olduğu dikkat çeker [11].

ADAMTS proteinlerinin tümü başlangıçta inaktif formda, pre-proenzim formunda sentezlenirler ve N-terminalinden C-terminaline doğru; bir sinyal peptide,

bir pro-domain, bir metalloproteinaz katalitik domain, bir disintegrin benzeri domain, merkezi, bir TS (trombospondin tip 1) motifi, sisteinden zengin bir domain, bir spacer bölgesi ve değişen sayılarda TS motifi tekrarları içerir. ADAMTS ailesi üyelerinin tümünde bulunan sekiz domeynden başka, ailenin bazı üyelerinin farklı farklı domeynlerden birine veya birkaçına sahip oldukları ve bu ek domeynlerin daima molekülün karboksi uçlarında yerleşmiş olduğu görülür [10, 12-14].



**Şekil 1.2:** ADAMTS ailesi üyelerinin domain organizasyon farklılıkları [13]

#### 1.4 ADAMTS Proteinlerinin Ekspresyonu

ADAMTS proteinlerinin mRNA ekspresyonu kalp, plasenta, karaciğer, iskelet kası, böbrek, tiroid bezi, adrenal medulla, adrenal korteks, mide, uterus, mesane, serviks, aorta, kolon, özefagus, overler, prostat, medulla spinalis, kıkırdak gibi çok geniş normal erişkin dokusu dağılımı göstermektedir. Farklı ADAMTS üyelerine farklı erişkin ve fetal dokularda rastlanabilmektedir. Fetal dokulardaki



ekspresyonu ise erişkin dokuya kıyasla daha sınırlıdır. ADAMTS'lerin ekspresyonlarının özeti tablo 1.2'de görülmektedir.

**Tablo 1.2:** ADAMTS üyelerinin doku dağılımları [11]

Genin ismi	Fötal dokular	Normal erişkin dokusu	Malignant erişkin dokusu
<i>ADAMTS1</i>	Böbrekler, Akciğerler	Kalp, plasenta, karaciğer, iskelet kası, böbrek, tiroid bezi, adrenal medulla, adrenal korteks, mide, uterus, mesane, serviks, aorta, kolon, özefagus, overler, prostat, medulla spinalis, kıkırdak	Sadece hücre hatları
<i>ADAMTS2</i>	Çalışılmamış	Aort, kemik, deri, tendon, mesane, retina, böbrekler, akciğerler, bağırsaklar, karaciğer, iskelet kası	Test edilmemiş
<i>ADAMTS3</i>	Çalışılmamış	Plasenta, akciğerler, beyin, kalp, deri	Test edilmemiş
<i>ADAMTS4</i>	Çalışılmamış	Mesane, beyin, over, kalp, iskelet kası, uterus, mide, medulla spinalis, kıkırdak	Test edilmemiş
<i>ADAMTS5</i>	Çalışılmamış	Mesane, serviks, özefagus, plasenta, uterus, kıkırdak	Test edilmemiş
<i>ADAMTS6</i>	Çalışılmamış	Plasenta	Test edilmemiş
<i>ADAMTS7</i>	Çalışılmamış	Kalp, iskelet kası, böbrek, pankreas, beyin, karaciğer	Test edilmemiş
<i>ADAMTS8</i>	Beyin, akciğer, böbrek	Akciğer, kalp, plasenta, beyin	Sadece hücre hatları
<i>ADAMTS9</i>	Beyin, kalp, böbrek, karaciğer, akciğer, iskelet kası, dalak, timus	Kalp, plasenta, akciğer, iskelet kası, böbrek, pankreas, over, kolon, kıkırdak	Test edilmemiş
<i>ADAMTS10</i>	Çalışılmamış	Pankreas, kalp, beyin, akciğer, plasenta, karaciğer, böbrek	Sadece hücre hatları
<i>ADAMTS12</i>	Akciğerler	Belirlenmemiş	Mide kanseri
<i>ADAMTS13</i>	Karaciğer	Prostat, beyin, karaciğer, plasenta, kalp, iskelet kası	İncelenmiş dokularda tespit edilememiş
<i>ADAMTS14</i>	Akciğer	Prostat, beyin, karaciğer, retina, akciğer, plasenta, uterus	Böbrek ve göğüs kanseri
<i>ADAMTS15</i>	Karaciğer, böbrek	Belirlenmemiş	İncelenmiş dokularda tespit edilememiş
<i>ADAMTS16</i>	Akciğer, böbrek	Beyin, over, prostat, uterus	İncelenmiş dokularda tespit edilememiş
<i>ADAMTS17</i>	Akciğer	Over, prostat, beyin, karaciğer	İncelenmiş dokularda tespit edilememiş
<i>ADAMTS18</i>	Akciğer, böbrek	Prostat, beyin, endotel, submaksiller bez	İncelenmiş dokularda tespit edilememiş
<i>ADAMTS19</i>	Akciğer	Belirlenmemiş	Osteosarkom
<i>ADAMTS20</i>	Çalışılmamış	Testis, prostat, over, kalp, plasenta, akciğer, pankreas, beyin	Beyin, kolon ve göğüs kanseri

## 1.5 ADAMTS Proteinlerinin İnhibisyonu

ADAMTS'lerin gen ifadelerinin seviyeleri farklı basamaklarda kontrol edilmektedir. TIMP (Tissue inhibitor of metalloproteinases)'ler diğer matris proteazlarda olduğu gibi ADAMTS'lerin aktivitesinin kontrolünde de anahtar rol oynarlar. TIMP'ler hem ADAM proteinlerine hem de ADAMTS proteinlerine karşı çok daha fazla seçici davranırlar [32-34]. Örneğin, agrekanazlardan ADAMTS-4 ve ADAMTS-5 TIMP-3 tarafından güçlü bir şekilde inhibe edilirken, TIMP-1, -2 ve -4'e karşı duyarsızdırlar [35-37]. Yine, TIMP-2 ve TIMP-3'ün ADAMTS-1'i 500 nM'lık konsantrasyonlarda kısmi olarak inhibe ettiği gözlenirken aynı konsantrasyonlardaki TIMP-1 ve TIPM-4'ün ADAMTS-1 üzerinde inhibitör etkisinin bulunmadığı görülmektedir [38]. Özellikle artritlerde aktivitelerinin arttığı bilinen ADAMTS-1, -4 ve -5'in agrekanolitik aktivitesi yeşil çayda bulunan katekin galat esterleri tarafından da etkin bir biçimde inhibe edilmektedir [39].

ADAMTS'lerin sentetik inhibitörlerinin etkileri ile ilgili az sayıda çalışma mevcuttur. ADAMTS-1, EDTA, 1,10-phenanthroline [40], BB-94 [21] ve MMP inhibitör 2 tarafından [41], ADAMTS-12 ise BB-94 [42] tarafından inhibe edilmektedir.

## 1.6 ADAMTS Proteinleri ve Hastalıklarla İlişkisi

### 1.6.1 ADAMTS-2 ve Ehler-Danlos Sendromu tip VIIc

Ehler Danlos Sendromları (EDS), kollajen sentezi veya yapısındaki bozukluklarla karakterize genetik geçişli hastalıklardır. Kollajen biyosentezi karmaşık bir olaydır. Kollajenin sentezinde rol oynayan birçok yapısal kollajen geninin herhangi birini veya kollajen lifleri arasındaki çapraz bağlanma gibi, transkripsiyon sonrası olaylar için gereken enzimleri kodlayan genleri etkileyen genetik hatalar EDS'ye neden olabilir. Tüm EDS'ler tek gen hastalıkları olmakla beraber, farklı sendrom tiplerinin kalıtım şekilleri farklı Mendeliyen Kalıtım tipi göstermektedir [43].

EDS'nin en az 10 klinik ve genetik çeşidi bilinmektedir. Bunların hepsinde de defektif kollajen mevcut olduğundan bazı klinik bulgular tüm tiplerde görülmektedir. EDS'nin en belirgin belirti ve bulguları; ciltte hiperekstansibilite, elastikiyet, frajilite, eklemlerde hipermobilitedir. Bunun yanı sıra bazı tiplerinde, kolon ve büyük arterlerde rüptür, gözde frajilite, kornea rüptürü ve retina dekolmanı, diyafram hernisi gibi patolojilerin gelişimine de sık olarak rastlanmaktadır [43].

Prokolajen tip I, II ve III'ün N-terminalindeki propeptitleri uzaklaştırarak kolajene dönüşmelerini sağlayan bir proteaz olan ADAMTS-2, klinik bir hastalık ile ilişkisi belirlenmiş olan ADAMTS proteinlerinden birisidir. Colige ve arkadaşları 1999 yılında yayınladıkları çalışmalarında [30], insanda görülen Ehlers-Danlos sendromu tip VIIc ile sığırdaki görülen dermatosparaksisin ADAMTS2 geninde oluşan mutasyonlara bağlı olarak geliştiğini bildirmişlerdir. Adamts2 inaktive farelerle yapılan çalışmalardan da destekleyici sonuçlar elde edilmiştir [44].

### **1.6.2 ADAMT-4 ve ADAMTS-5 ve Osteoartrit**

Osteoartrit (OA) özellikle yaşlı popülasyonda gözlenen; ana karakteri kıkırdak hasarı, kıkırdak altında yeniden kemikleşme, bağlantı alanlarında sınırlandırma, sinoviyal sıvıda inflamasyon ve osteofit oluşumu ile ortaya çıkan bir hastalıktır [45].

Normalde kemiklerin ucuna yerleşmiş olan eklem kıkırdağı son derece önemli iki işleve sahiptir; i) eklem sıvısı ile yıkanarak eklem içerisinde tam anlamıyla sürtünmesiz hareketi sağlamak, ii) ağırlık taşıyan eklemlerde ağırlığın eklem yüzeyinden kemiğe geçişinde yükü yayarak kemiğin zedelenmeksizin ağırlığı ve şoku absorbe etmesine imkan sağlamak. Bu işlevler kıkırdağın elastik olmasını ve gerilime olağan üstü direnç göstermesini gerektirir. Elastikiyet ve direnç de kıkırdak dokusunun kondrositler tarafından salgılanan iki ana bileşeni tarafından; tip II kollajen ve proteoglikanlar tarafından sağlanır [46].

Eklem kıkırdağı dinamik bir yapıdır ve matriks bileşenleri sürekli yapıp yıkılarak yenilenir. Bu olaylarda, matriks proteinlerinin yanı sıra yıkıcı proteinleri de salgılayan kondrositlerin çalışma dengesi son derece önemlidir. Bu nedenle de

kondrositlerin sağlığı ve kıkırdak matriksinin temel özelliklerini devam ettirebilmeleri eklem bütünlüğünü sağlar. Hastalığın nedeni tam olarak bilinmemekteyse de mevcut bilgiler, yaşlanma ve mekanik etkilerin, hormonların ve genetik etkenlerin osteoartrit oluşumunda rol oynadığını akla getirmektedir [30].

Son yıllarda yapılan çalışmalarda belirgin agrekanaz aktivitesine sahip olan ADAMTS-4 ve özellikle de ADAMTS-5'in osteoartritte kıkırdak dokusunda fazla miktarlarda bulunduğu ve doku agrekanını son derece etkin bir biçimde yıktığı görülmüş, bu nedenle de hastalığın oluşumunda bu artmış agrekanaz aktivitesinin rol oynayabileceği düşünülmüştür [47-50].

### **1.6.3 ADAMTS-10 ve Weill-Marchesani Sendromu**

Marchesani Sendromu, Spherophakia-brachymorphia Sendromu, mesodermal dysmorphodystrophy adlarıyla da bilinen ve son derece nadir görülen genetik bir sistemik bağ dokusu hastalığıdır. Küçük ve dar göz çukurları, hafif maksiler hipoplazi, dar damak, küçük, sferik ve kristalize lensler, glukomla beraber veya tek başına bulunan miyopi, sık görülen lens ektopisi, nadiren körlük, deforme ve yanlış yerleşimli dişler ve kalp defektleri ile karakterizedir. Epifiz plaklarının geç kemikleşmesi daima rastlanan bir bulgudur [51].

RT-PZR, Northern blot ve dot-blot analizi gibi teknikler kullanılarak ADAMTS-10'un normal ekspresyonunu inceleyen çalışmalar, bu proteinin deride, ftal kondrositlerde ve ftal ve erişkin kalbinde eksprese olduğunu göstermiştir. Bu da ADAMTS-10'un büyümede, deri, lens ve kalp gelişiminde majör role sahip olduğunu düşündürmüştür [52, 53].

### **1.6.4 ADAMTS-13 ve Trombotik Trombositopenik Purpura**

Trombotik trombositopenik purpura (TTP), sıklıkla yetişkin kadınlarda görülen, yüksek ateş, trombositopeni, mikroanjiyopatik hemolitik anemi, geçici nörolojik problemler ve böbrek yetmezliği beşlisi ile karakterize klinik bir sendromdur. Son yıllarda vakaların büyük bir kısmında vWF'ünün çok büyük

moleküler ağırlığa sahip multimerlerini parçalayan bir enzim olan ADAMTS-13'ün eksik olduğu saptanmıştır. ADAMTS-13 eksikliği durumunda vWF'ü plazmada birikir ve bazı durumlarda mikrodolaşım boyunca trombosit agregasyonunu sağlayarak hastalığın semptomlarının ortaya çıkmasına yol açar. vWF faktörünü parçalayan ADAMTS-13'ün eksikliği, proteinin sentezlenmesine engel olan genetik bir bozukluğa bağlı olabileceği gibi proteine karşı oluşan otoantikorlara bağlı da olabilir [54].

## **1.7 ADAMTS Proteinlerinin Kansere ve Anjiyogenezle İlişkisi**

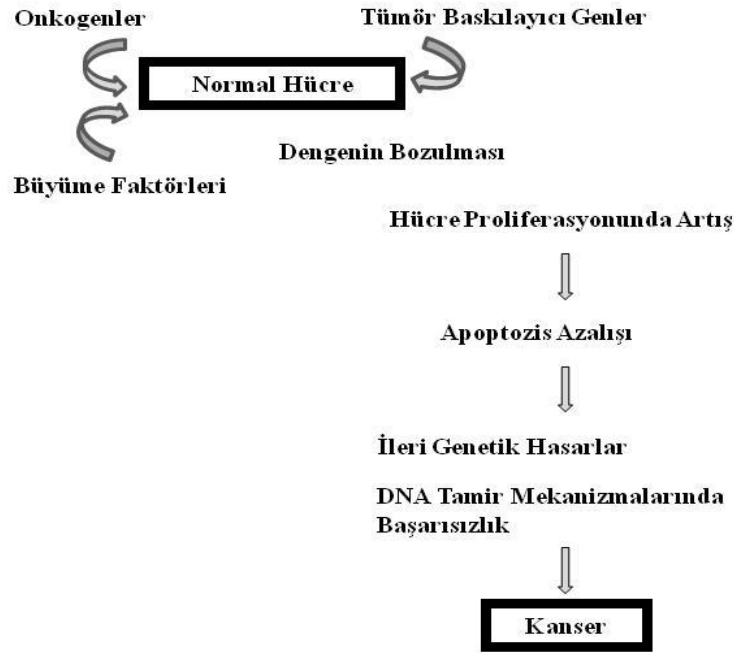
### **1.7.1 Kansere ve Anjiyogenez**

Kansere; normal hücrelerin çoğalması, olgunlaşması ve diğer fonksiyonlarındaki bütünlüğün kaybolması ile karakterize olan bir hastalıktır. Kanserde temel sorun hücre çoğalmasındaki kontrolün kaybolmasıdır. Sağlıklı vücut hücreleri bölünebilme yeteneğine sahiptirler. Ölen hücrelerin yenilenmesi ve yaralanan dokuların onarılması amacıyla bu yeteneklerini kullanırlar. Fakat bu yetenekleri de sınırlıdır. Sonsuz bölünemezler. Hücre siklusu, çoğalmak üzere uyarılmış bir hücrede gerçekleşen ve bir dizi geçici biyokimyasal aktivitelerin ve morfolojik değişikliklerin görüldüğü bir süreçtir. Genel olarak, hücreler bir bölünme sinyali almadıkları sürece hücre siklusunun aktif (G1, G2, S ve M) fazlarına girmezler ve istirahat fazı denilen G0 fazında beklerler. [55, 56].

Buna karşın kansere hücreleri bu özelliklerini kaybeder, kontrolsüz bölünmeye başlar ve çoğalırlar. Çoğalma ya da büyüme genlerinin kontrolü altında olduğuna göre genetik faktörler tüm kansere türlerinde etkilidir. Genlerdeki bozukluklar doğuştan olabileceği gibi, sonradan meydana gelen mutasyon adı verilen değişikliklerle de oluşabilir. Genlerde mutasyonlarla meydana gelen yapısal değişiklikler sonucu hücre normal kontrol mekanizmalarını kaybederek, kontrolsüz çoğalma yeteneği kazanır [55].

Kansere gelişiminden sorumlu pekçok gen bulunmaktadır. Bu genleri kısaca gruplarsak; (i) onkogenler, (ii) tümör supresör ve apoptozis ilişkili genler, (iii) hücre

döngüsü kontrol genleri, (iv) hücre adezyonu ve hareketinde görev alan genler, (v) ekstraselüler matriksi bozan enzimler ve (vi) anjiyogenik faktörler [55].



**Şekil 1.3:** Genetik dengesizlik ve kanserin oluşum mekanizması

Kanser hücreleri toplanarak tümörleri oluştururlar, tümörler normal dokuları sıkıştırabilirler, içine sızabilirler yada tahrip edebilirler. Eğer kanser hücreleri oluştukları tümörden ayrılırsa, kan yada lenf dolaşımı aracılığı ile vücudun diğer bölgelerine gidebilirler. Gittikleri yerlerde tümör kolonileri oluşturur ve büyümeye devam ederler. Kanser bu şekilde vücudun diğer bölgelerine yayılması olayına metastaz adı verilir. Metastaz olayı anjiyogeneze bağımlı olarak gerçekleşmektedir. Bir tümör hücrelerinin metastaz yapabilmesi için damar içerisine girebilmesi, dolaşımda yaşamını sürdürebilmesi, hedef organda damar dışına çıkabilmesi, organ stromasına yerleşebilmesi ve burada anjiyogenezi uyarabilmesi gereklidir. Yani, metastazın başlangıcı ve sonu için de anjiyogenezin gerçekleşmesi şarttır [55-57].

Anjiyogenez, fizyolojik bir süreç olup, yeni damarların oluşması, gelişmesi anlamına gelir. Önceden mevcut olan kapillerlerden, endotel hücrelerinin ilerleyici invazyonu ve filizlenmesi sonucunda, yeni kan damarlarının oluşması olayına anjiyogenez adı verilir. Anjiyogenez, büyüme ve gelişme ile yara iyileşmesi gibi süreçlerde olması beklenen bir olaydır. Bununla beraber bazı durumlarda patolojik de

olabilmektedir. Kanselerde; artrit, inflamatuvar bağırsak hastalıkları gibi inflamatuvar hastalıklarda; ve çeşitli göz hastalıklarında (maküler dejenerasyon gibi) anjiyogenez patolojik olarak meydana gelmektedir. Periferik arter hastalıkları, gecikmiş yara iyileşmesi gibi durumlarda ise anjiyogenezin patolojik yetersizliği vardır.

Özellikle kanserli hücrelerin büyümesi için gerekli olan besinleri alabilmek için tümör hücreleri tarafından salgılanan maddelerle anjiyogenez uyarılmaktadır. Nitekim günümüzde pek çok antianjiyogenik ajan, insan tümörleri üzerindeki antitümör aktivitelerinin belirlenmesi amacıyla klinik deneylerde kullanılmaktadır [55].

Damar büyümesinin uyarılması son derece kompleks bir işlemdir. İlk olarak damar bazal membranı yıkılır. Ardından endotel hücreleri çevre stromaya göç ederler ve oluşturdukları göç kolonlarının uç kısımlarında bölünüp çoğalmaya başlarlar [28, 55]. Bazı integrinler anjiyogenezin bu başlangıç aşamasında son derece önemli roller üstlenirler. Çünkü migrasyon esnasında ekstrasellüler matrikse bağlanma, hem matrikse sıkıca tutunmayı hem de invaziv endotel hücrelerinin yaşamını sürdürmesine destek olmayı sağlar. Lümen oluşumu tamamlandıktan sonra, endotel hücreleri tarafından geçici bir bazal membran salgılanır ve böylece primitif ve fonksiyonel kan damarı oluşumunu tamamlamış olur. Bazal membranın yapısını oluşturan tip IV kolajen, tenascin, laminin ve trombospondin-1 gibi pek çok proteinin, endotel hücrelerinin bağlanmasında, çoğalmasında ve hayatını sürdürmesinde etkisi olduğu bulunmuştur [28].

Anjiyogenezin tümör büyümesi ve metastazı üzerindeki önemi anlaşıldıktan sonra, tümör damarlanmasının yoğunluğunun hastalığın prognozunu etkileyip etkilemediği merak edilmiştir. Weidner ve arkadaşları [59] yayınladıkları çalışmalarında insan meme kanserinde primer tümörün mikrovasküler yoğunluğunun son derece önemli bir prognostik belirteç olduğunu ortaya koymuşlardır. Bunu, prostat kanseri, NSCLC, kolorektal kanserler ve malign melanomlar gibi çok sayıda farklı tümör tiplerinde gerçekleştirilen ve aynı sonuca ulaşan diğer çalışmalar takip etmiştir [57-59].

Anjiyogenik denge; endotel hücre büyümesi üzerinde etkisi olan birçok endojen stimülatör ve inhibitör tarafından sürdürülmektedir. Tümör dokularında ise

anjyogenik dengenin vasküler büyümenin uyarılması yönünde bozulduğu görülmektedir. Yani, tümör anjiyogenezi veya patolojik anjiyogenezler, endotel hücre büyümesi üzerindeki normal kontrollerin bozulması olarak anlaşılabilir. Son yıllarda, anjiyogenezi etkileyen çeşitli endojen stimülatörler veya inhibitörler tanımlanmıştır.

### **1.7.1.1 Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü (VEGF)**

VEGF tümör anjiyogenezinin en spesifik mediatörlerinden birisidir. VEGF geni alternatif kesim ile kapiller morfogenez ve tümör anjiyogenezi için kritik öneme sahip birkaç farklı ürün oluşturmaktadır [60, 61]. VEGF'ün izoformları düz kas hücreleri, fibroblastlar ve epitel hücrelerini de içeren değişik hücreler tarafından salgılanmaktadır. Bu proteinlerin tümü iki tirozin kinaz reseptörünün, VEGFR1 ve VEGFR2'nin aktivasyonu ile fonksiyon gösterir. Bunun yanı sıra, endotel hücrelerinde bulunan nörofilin 1 ve 2 gibi reseptör olmayan tirozin kinaz ko-reseptörlerine bağlanarak da çalışırlar [62, 63].

VEGF165 tümör anjiyogenezinin en spesifik mediatörlerinden birisidir. VEGF165'in oluşturduğu sinyalin baskılanması anjiyogenezi inhibe eder ve aynı zamanda tümör şiddetini azaltır. Daha da önemlisi, insan kanserlerinde VEGF ve VEGFR2'nin artmış ekspresyonu invazyon ve metastaz ile ilişkilidir. Bu da VEGF'ün tümör biyolojisindeki önemini ortaya koymaktadır [64].

VEGF'ün oluşturduğu sinyalde, hız sınırlayıcı olaylardan birisi de hedef hücreye ulaşma yeteneğidir. VEGF'ün difüzyon hızı karboksi ucunda bulunan ve heparine bağlanan domeynden ciddi biçimde etkilenmektedir. Nitekim molekülün bu domeyne sahip olmayan izoformlarının (VEGF121 gibi) difüzyonunun daha hızlı gerçekleştiği gösterilmiştir [64].

### **1.7.1.2 Trombospondin-1**

Trombospondinler embriyonik gelişim sırasında çok sayıda farklı dokuda ve oldukça fazla miktarlarda salgılanan bir glikoprotein ailesini oluşturur. Erişkin



hayatta da anjiyogenez, yara iyileşmesi ve kolajen fibril oluşumu gibi çok sayıda olayın düzenlenmesinde rol oynarlar [15, 65, 66].

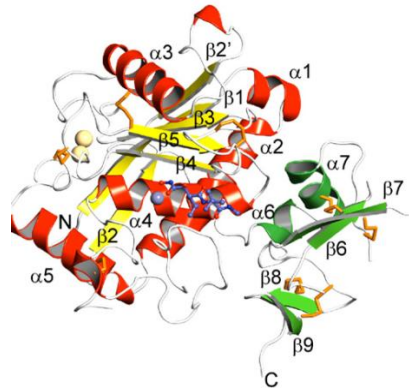
Trombospondin ailesi, son derece spesifik modüler bir organizasyona sahip beş üyeden oluşur. Bu beş üyeden Trombospondin-1 (TSP1) ve Trombospondin-2, (TSP2) yapı benzerliği ve amino asit aynılığı açısından birbirilerine en fazla benzeyenlerdir. Her ne kadar primer dizilimleri birbirine benzemekteyse de, TSP1 ve TSP2'nin ekspresyon paterni hem gelişim sırasında hem de erişkinlik döneminde önemli derecede farklılık gösterir. TSP1, daha çok mezokimal yerleşimli olan TSP2'ye oranla daha epitelyal/endotelyal yerleşim gösterir. Yine, TSP1 doku hasarı ve inflamasyon mediyatörlerin tarafından hızla uyarılırken TSP2'nin ekspresyonunda aynı inflamatuvar sitokinlerin etkili olmadığı görülmektedir. Ailenin beş üyesinden sadece TSP1 ve TSP2'nin endotel hücre davranışı ve anjiyogenez üzerinde etkisi olduğu gösterilmiştir [66].

TSP1'in oluşturduğu etkiler pek çok *in vivo* ve *in vitro* modelde gösterilmiştir. *In vivo* olarak, TSP1, FGF-2'nin oluşturduğu anjiyogenezi baskılar ve kan damarlarının büyümesini inhibe eder [67, 68]. Pek çok laboratuvar tarafından gerçekleştirilen *in vitro* çalışmalarda; adezyonu ayarladığı, migrasyonu baskıladığı, proliferasyonu inhibe ettiği ve CD36 aktivasyonu yoluyla endotel hücrelerinde apoptozisi başlattığı gösterilmiştir [67]. Tüm bu çalışmalardan ve transgenik hayvanlarda gerçekleştirilen çalışmalardan [69, 70] elde edilen sonuç, TSP1'in damarların ve epitel hücrelerinin morfogenezi ile homeostazını etkileyen pleiotropik bir büyüme düzenleyicisi gibi çalıştığıdır.

Sonuç olarak, TSP1 ve TSP2 endotele çeşitli sinyaller sağlar. Olgun/dinlenme halindeki vasküler yataklarda, bazal membranda bulunan TSP1, muhtemelen yapıya süreklilik sinyalleri sağlamaktadır. Anjiyogenez sırasında ise ortamda bazal membrana bağlı olmayan fazla miktarlarda TSP1'in bulunması migrasyonu durdurur, CD36 aktivasyonu ile apoptozisi uyarır, TGF $\beta$  aktivasyonunu düzenler ve plazmin ve MMP'lerin aktivitesini ayarlar ve bu etkilerin sonucunda kapiller filizlenme baskılanır ve anjiyogenez inhibe edilir [66].

### 1.7.2 ADAMTS'lerin ilk üyesi: Anti- Anjiogenetik ADAMTS-1

İlk olarak Kuno ve arkadaşları tarafından 1997 yılında tanımlanmış olan ADAMTS-1 ilk üyesi olması nedeniyle diğer üyelere göre nispeten daha fazla çalışmalar yapılmıştır. 1999 yılında ADAMTS-1 vasküler endotelial büyüme faktörünün (VEGF) uyardığı anjiyogenezi inhibe ettiği ve fibroblast büyüme faktörü 2'nin uyardığı vaskülarizasyonu baskıladığı bulunmuştur. Bu özelliği nedeniyle antianjiogenetik üyesi olarak tanımlanmıştır. Daha sonra ADAMTS8'inde bu aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir. Özellikle 2007 yılında aydınlatılan üç boyutlu yapısı ADAM'lerden farkları önemli fonksiyonel domainleri ortaya konmuştur. Katalitik bölgenin tüm katlanması, matriks metalloproteinazları ve ADAM'lar ile benzerlik göstermektedir. Yapıda beklenmeyen bir şekilde çifte kalsiyum bağlanma bölgesi açığa çıkartılmıştır. Bu çalışmada şaşırtıcı olarak daha önceleri disintegrin benzeri domain olarak isimlendirilen domainin, ADAM10 gibi diğer ADAM'ların disintegrin domainleri ile yapısal bir benzerlik göstermediği, aksine diğer metalloproteinazların sisteince zengin domainleri ile benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir. Aktif bölgeye karşı duran ADAMTS-1'in sisteince zengin domaininin olası bir regulator bölge olduğu düşünülmektedir [71].



Şekil 1.4: ADAMTS-1 proteininin üç boyutlu yapısı [71] (*ADAMTS-1 proteininin marimastat ile interaksyonu. Kırmızı ve sarı renkler katalitik metalloproteinaz domaini, yeşil renk ise sisteince zengin domini göstermektedir. Katalitik çinko iyonu mor ve kalsiyum bağlanma bölgesine bağlandığı düşünülen 2 kadmiyum iyonu turuncu renkte gösterilmiştir. Marimastat ligandı yapışan yuvarlaklar olarak gösterilmiştir. Disülfid bağları gösterilmiştir.*)

ADAMTS-1'in yapısal domainlerinin aydınlatılması tüm ADAMTS'ler için model olmuştur. ADAMTS-1 proteini 8 domain içermektedir; 1) pre-domain, 2) pro-domain, 3) metalloproteinaz domain, 4) disintegrin benzeri domain, 5) TSP-1 motifi içeren trombospondin homolog domain, 6) Sisteince zengin domain, 7) Spacer bölge ve 8) Karboksi terminal TSP motifleridir (Şekil 1.5). ADAM'lar transmembran protein değil salgılanan proteinlerdir [3, 39].



**Şekil 1.5:** ADAMTS1 proteinin domain yapısı (Pre: sinyal peptit, Pro; prodomain; metalloproteinaz domain; katalitik domain, Dis; disintegrin benzeri domain, Sis; sisteince zengin domain, TS; trombospondin tip I tekrarı, ara domain)

Ayrıca ADAMTS-1 in yapısı ve görevleri arasındaki ilişki bazı çalışmalarla ortaya konmuştur. ADAMTS-1 proteinin Anti-anjiyogenetik etki ve Agrekanaz aktivitesine sahip olduğu çeşitli araştırmacılar tarafından gösterilmiştir.

Bunlar arasında öne çıkan, Vazquez ve arkadaşları tarafından 1999 yılında ADAMTS-1 vasküler endotelial büyüme faktörünün (VEGF) uyardığı anjiyogenezi inhibe ettiği ve fibroblast büyüme faktörü 2'nin uyardığı vaskülarizasyonu baskılaması ile anti-anjiyogenetik etkidir. Aynı çalışma, ADAMTS-1 ve ADAMTS-8'in oluşturdukları anti-anjiyogenetik cevabın TSP-1 veya endostatinin oluşturduğundan daha güçlü olduğunu ve ADAMTS-1'in inhibitör kapasitesinin de ADAMTS-8'den daha fazla olduğu ortaya konulmuştur. ADAMTS-1 ve -8'in anti-anjiyogenetik aktivitelerine TS motiflerinin aracılık ettiği düşünülmektedir. Bu tekrar motifleri, trombospondin ailesinin beş üyesinden sadece TSP1 ve TSP2'de mevcut olan özel motiflerdir ve trombospondin ailesinin TS motifleri içermeyen diğer üç üyesi anti-anjiyogenetik etkiye sahip değildir. ADAMTS-1'in C-terminalindeki iki TS motifi tekrarı sayesinde VEGF165'e bağlandığını göstermiştir [15, 66]. Yine, ADAMTS-1 ve -8'in birinci C-terminal TS tekrarı bulunan ve ADAMTS-1 ile -8 dışındaki ADAMTS'ların hiçbirinde mevcut olmayan GWQRRL/TVECRD motifinin önemli bir role sahip olması olasılığı son derece yüksektir [12].

ADAMTS-1'in de agrekanın yanı sıra versikanı parçalayabildiğini bilinmektedir [19]. Yapılan bazı çalışmalar ADAMTS-1'in ekstrasellüler matriks üzerindeki etkisinin follikül üretilmesi için, versikanı degrede edici etkisinin ise ovülasyonun gerçekleşebilmesi için zorunlu olduğunu düşündürmektedir [20, 21, 22]. Nitekim ADAMTS-1 devre dışı bırakılmış farelerle yapılan çalışmalarda; büyüme geriliği, yağ dokusu malformasyonu, uterus ve yumurtalık histolojisinde değişikliklerle beraber seyreden azalmış fertilité bulunmuştur [25]. Yayınlanan diğer çalışmalar ise nidogenin-1'in substratları olduğunu ortaya koymuştur [72, 73]. Ayrıca, Ovülasyon sırasında progesteron reseptörünün ADAMTS-1 mRNA'sını arttırdığı tespit edilmiştir [26].

ADAMTS-1'in kemik ve osteoblastlardaki ekspresyonu paratiroid hormon ve benzeri ajanlarla artmaktadır. Bazı kaynaklar, ADAMTS-1'i, -4, -5, -8, -9, -15 ve -20 ile birlikte hiyalektanları (hiyaluronana bağlanan agrekan, brevikan, versikan vb. proteoglikanları) yıktıkları için hiyalektanazlar olarak sınıflandırmaktadır [27].

### **1.7.3 ADAMTS-1'in Kanserle İlişkisi**

Antianjiogenetik aktivitesi olan bu üyenin Kanser tiplerindeki rolünün araştırılması gerekliliğini ortaya çıkmıştır. Malign tümörlerin en önemli özellikleri, çevre dokulara invaze olabilmeleri, vasküler ve lenfatik sisteme girebilmeleri ve metastatik yayılımla uzaklardaki organlara dağılabilmeleridir. Bu patolojik olayların tümünün gerçekleşmesinde, kuşkusuz doku matriksinin yıkımının önemi vardır. Bu nedenle de kanser gelişimi ve yayılımında, hem domeynlerinin yapısı hem de işlevleri düşünüldüğünde, MMP'ler, ADAM'lar ve ADAMTS'lar gibi matriks metaloproteazlar önemli rollere sahiptirler. [1].

ADAMTS-1'in kanserdeki rolleri ile yapılan çalışmaların çoğu bu üyenin farklı hücrelerde mRNA ya da protein düzeyinde ifadesinin belirlenmesine odaklanmıştır. Yapılan bu çalışmalarla, ADAMTS-1'in antioanjiogenetik etkisi ve rolü de gösterilmiştir. 2006 yılında yayınladıkları çalışmalarında, Rocks ve arkadaşları, insan küçük hücreli olmayan akciğer kanserlerinde (non-small-cell lung carcinomas, NSCLC) ADAMTS-1 ekspresyonunu, sağlıklı dokulara oranla, anlamlı olarak daha az bulduklarını bildirmişlerdir [74].

Prostat stroma hücreleri ile LNCaP, PC3, DU145 gibi prostat kanseri hücre hatlarında ADAMTS-1, -4, -5, -9, -15 ve TIMP-3 ekspresyonlarının incelendiği bir çalışmada stroma hücrelerinin bu proteinleri sürekli olarak eksprese ettikleri ancak hücre hatlarındaki ekspresyonunun değişimini göstermişlerdir [75]. Gustavsson ve arkadaşlarının deneysel androjen-bağımsız ve bağımlı prostat kanserlerinde angiogenezi regüle eden genlerin ekspresyonunu araştırdıkları ve 2008’de yayınladıkları çalışma ise ADAMTS-1 ekspresyonunun azaldığı bulunmuştur [76]. Ayrıca bizim yaptığımız bir çalışma ile androjen bağımsız prostat kanser modelleri olan PC3 ve DU145’de ADAMTS-1 ve substratı olan VEGF’in mRNA düzeyinde ifadeleri araştırılmış ve her iki hücre hattında VEGF ekspresyonu görülürken ADAMTS-1 ekspresyonu sadece PC3 hücre hattında tespit edilmiştir [77]. Porter ve arkadaşları insan meme kanserinde, neoplastik olmayan meme dokusunda ve meme kanseri hücre hatlarında gerçekleştirdikleri ve ADAMTS-1-20’nin ekspresyon profilini inceledikleri çalışmada; meme karsinomu vakalarında, tümörün heterojenitesinden, tipinden ve derecesinden bağımsız olarak, ADAMTS genlerinden yedi tanesinin (ADAMTS-1, 3, 5, 8, 9, 10 ve 18) sürekli olarak ekspresyonun azaldığını buldular [78].

Literatürde karaciğer kanserlerinde ADAMTS proteinlerinin ekspresyonunun incelendiği tek çalışma Masui ve arkadaşlarının hepatoselüler karsinomalarda (HCC) ADAMTS-1’in mRNA ekspresyonunu araştırdıkları çalışmadır. Araştırmacılar inceledikleri 16 HCC vakasında kanser dokusunda ADAMTS-1 ekspresyonu düzeylerini belirlemişler ve bunu siroz hastalarından elde edilen karaciğer dokusundaki ADAMTS-1 ekspresyonu ile karşılaştırdıklarında, HCC’da ADAMTS-1 ekspresyonunun anlamlı olarak azaldığını tespit etmişlerdir [7]. Ayrıca yine grubumuz tarafında ADAMTS-1 mRNA sının ifade olduğu karaciğer hücre hattı olan Hep3B hücrelerinde gösterilmiştir [79].

ADAMTS proteinlerinin mide ve bağırsak kanserlerinde ekspresyonu ile ilgili çok fazla bilgi mevcut değildir. Yapılan bir çalışmada kolorektal tümörlerde ADAMTS-1’in promotor hipermetilasyonu yoluyla inaktive edildiği ortaya konulmuştur [2].

Masui ve arkadaşları pankreas kanserlerinde ADAMTS-1 ve ADAMTS-8’in mRNA ekspresyonunu araştırdıkları çalışmalarında; pankreas tümörlerinde, sağlıklı

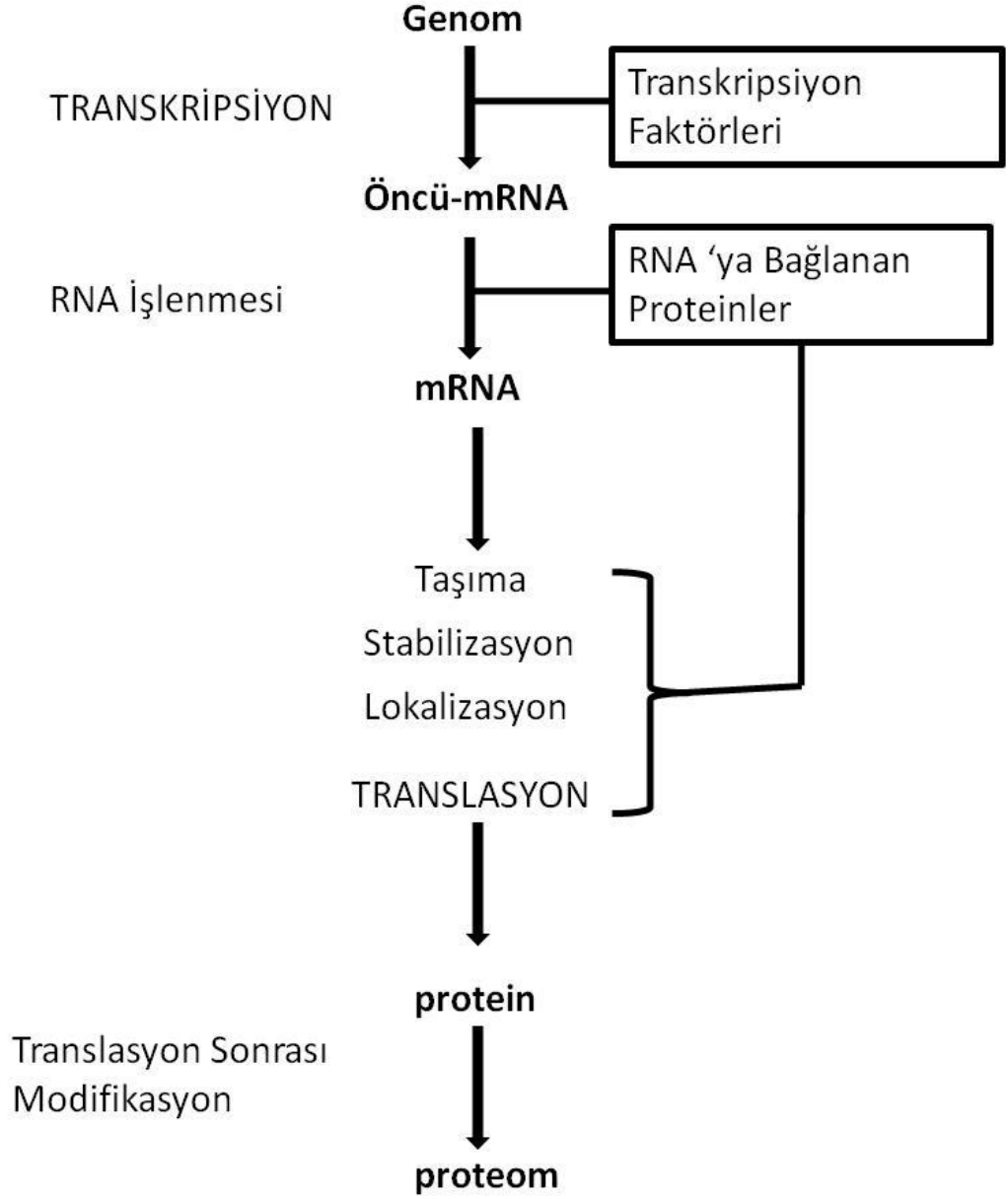
dokuya oranla ADAMTS-1 ekspresyonunun azaldığını ve daha yüksek seviyelerde ADAMTS-1 ekspresyonuna sahip olan hastalarda, hayatta kalma süresinin kısa olması ile ilişkili olan retroperitoneal invazyona ve lenf nodu metastazına daha sık rastlandığını göstermişlerdir [7].

## **1.8 ADAMTS-1 ve Transkripsiyonel Regülasyonu**

### **1.8.1 Transkripsiyonel Regülasyon**

Ökaryotik organizmalarda gen ekspresyonunun farklı şekillerde düzenlenmesi, hücrel farklılaşmanın ve her türlü hücrel işlevin odak noktasını oluşturmaktadır. Hücreler aynı genetik bilgiye sahip olmalarına rağmen, bu bilgi her hücre tipi için farklı şekillerde işlenmektedir. Organizma gen regülasyonu sayesinde, belirli bir hücre tipinde belirli bir gen takımını, farklı hücre tiplerinde ise diğer farklı gen takımını çalıştırabilme yeteneğine sahip olmaktadır. Gen ekspresyonu sürecinin sıkı bir şekilde kontrol edilmesi, hücrelerin çevresel uyarıcılara ve metabolik ihtiyaçlarına cevap verilmesi yani gelişiminin ve farklılaşmasının da kontrolü anlamına gelmektedir [56].

DNA'da şifrelenmiş olarak bulunan genetik bilginin protein şekline dönüşmesi süreci, DNA'nın RNA'ya transkripte olması, RNA'nın işlenmesi, protein sentezi (translasyon) ve post-translasyonel değişikliklerin yapıldığı basamaklardan oluşmaktadır. Bu basamakların her birinde gen ekspresyonunun kontrolü mümkün olsa da, hücrelerde mutlak gerekli olan ve maksimum enerji tasarrufu açısından da önem teşkil eden transkripsiyon basamağındaki kontrol en yaygın olanıdır ve genlerin çoğunluğunda bu basamakta regülasyon yapılmaktadır. Transkripsiyon basamağındaki kontrol genin ifade olup olmayacağına dair karar verilen kontrol aşaması olarak açıklanabilir.



**Şekil 1.6:** Gen İfadesi ve Kontrol Basamakları

Ökaryotlarda gen ifadesinin başlangıç aşaması, genin düzenleyici dizisi olan promotor bölgesine spesifik proteinlerin ve ardından RNA polimeraz II enziminin bağlanması ve transkripsiyonun başlaması şeklinde gerçekleşmektedir. RNA polimeraz II ökaryotlarda bulunan üç RNA polimerazdan bir tanesidir ve hücrede mRNA ve diğer birçok küçük RNA'ların transkripsiyonundan sorumlu olan enzimdir. RNA polimerazII'nin aktivitesi genellikle transkripsiyon başlangıç bölgesinin yukarı kısmında bulunan düzenleyici DNA dizileri (cis etkili elements) ile bağ yapabilen birtakım spesifik proteinler (trans-etkili) arasındaki etkileşime

bağlıdır. Bu diziler genellikle transkripsiyonun başlangıç noktasının üst kısmında 5' bölgede bulunurlar. Transkripsiyonun düzenlenmesinden sorumlu olan düzenleyici DNA dizileri; (i). Bazal promotor elementleri; başlangıç noktasının tanımlanmasında ve transkripsiyonun bazal seviyede minimum oranda devam etmesinde kritik rol oynarlar [18]. (ii). Yukarı bölge düzenleyici elementler. (iii). Enhansörler; promotör aktivitesini arttırıcı dizilerdir. (iv). Silensörler; enhansörlere benzer tarzda işlev görürler fakat transkripsiyonu baskılayıcı dizilerdir. (v). Lokus kontrol bölgeleri, birçok geni içeren lokusun ekspresyonunu düzenleyici dizilerdir [56].

Trans-etkili faktörler ya da transkripsiyon faktörleri spesifik DNA dizilerine bağlanarak, direkt ya da dolaylı olarak RNA polimeraz II ile etkileşerek transkripsiyonu etkilemektedirler. Genel transkripsiyon faktörleri II. sınıf genlerin çekirdek promotor dizilerine bağlanarak transkripsiyonun başlangıç aşamasında RNA polimeraz II ile etkileşirler. Düzenleyici transkripsiyon faktörleri ise fonksiyonlarını çekirdek promotorun alt ya da üst kısmında bulunan dizilere bağlanarak ve genel transkripsiyon faktörleri ile etkileşerek gerçekleştirirler. Çekirdek promotor elementleri, RNA polimeraz II tarafından transkripsiyonun başlatılması için minimum düzeyde gerekli olan DNA elementlerini içermektedir. Çekirdek promotorlar transkripsiyonun başlangıç bölgesi olan +1 noktasını ve yaklaşık 35 nükleotitlik aşağı ve yukarı promotor bölgesini içermektedir. Genler arasında çekirdek promotor elementleri açısından varyasyonlar görünse de, genellikle TATA kutusu, TFIIB tanıma dizisi, başlatıcı ve aşağı çekirdek promotor elementi dizileri bulunmaktadır [56].

### **1.8.2 ADAMTS-1 ve Transkripsiyonel Regülasyonu**

İlk üyesinin 1997 de izole edildiği ADAMTS-1 proteinlerinin transkripsiyonel regülasyonu ile ilgili sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. İlk bilinen üyesi olmasına rağmen ADAMTS-1'in transkripsiyonel regülasyonu konusunda bilgi çok sınırlıdır. Fare ADAMTS-1 geninin promotörü 1997 yılında klonlanarak karakterize edilmiştir [3]. 2006 yılında Lind ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada DNA metilasyonunun fare ADAMTS-1 aktivitesini azalttığı belirtilmiştir. Bu da farede aktivitesinin transkripsiyonel olarak promotör seviyesinde



kontrol edildiğini göstermektedir. Kanser spesifik hipermetilasyona uğradığı düşünülmektedir [2]. Fare ADAMTS-1 promotoruna HDAC inhibitörü olan TSA uygulamasından sonra SP1 ve HDAC6 bağlanmasının azaldığını bulmuşlardır. Proksimal bölgedeki GC kutularının inaktivasyon için gerekli olduğu tespit edilmiştir. SP1 in ADAMTS-1 ekspresyonunu azalttığı açıklanmıştır [4, 5].

2009 yılında Hatipoğlu ve arkadaşları tarafından hipoksiyanın insan ADAMTS-1'i indükleyip indüklediği ve regülasyon mekanizması araştırılmıştır. Endotelial hücrelerde, hipoksiya durumunda, ADAMTS-1 mRNA ve protein ekspresyon seviyesi hızlı bir şekilde arttığı fakat diğer hücre tiplerinde böyle bir durum tespit edilmemiştir. İlginç bir şekilde ADAMTS-1'in hipoksiya ile indüklenmesi geçici bir durum olmasına rağmen HUVEC hücrelerinde, VEGF'ün hipoksiya ile indüklenmesi zamana bağlı olarak artmaktadır. Endotelial hücrelerde ADAMTS-1 hipoksiya durumunda geçici olarak indüklendiği ve HIF-1'in bağlanması aracılığıyla transkripsiyonu yapıldığı tespit edilmiştir. Sonuç olarak ADAMTS-1 in yeni bir erken hipoksik dönemde regüle edilen bir gen olduğu gösterilmiştir [6].

## 1.9 Çalışmanın Amacı

Çalışmamıza başladığımız ilk zamanlarda literatür taraması yaptığımızda, insan ADAMTS-1 geninin transkripsiyonel regülasyonu ile ilgili herhangi bir bilgi bulunmazken, 2009 yılında Hatipoğlu ve arkadaşları tarafından genin regülasyonu ile ilgili ilk çalışmalar yayınlamıştır. Ancak bu çalışmada yalnızca hipoksi koşullarındaki regülasyon ile ilgili bulgular mevcuttur. Buna göre ADAMTS-1 geninin HIF1 $\alpha$  proteini tarafından erken hipoksik gen olarak regüle edildiği tespit edilmiştir [6]. Genin normoksi koşullarındaki regülasyonu yani bazal transkripsiyonel regülasyonu aydınlatılmamıştır. Bu amaçla çalışmamızın konusu, detaylı olarak ADAMTS-1 geninin transkripsiyonel regülasyonunu karaciğer kanser modeli Hep3B hücrelerinde aydınlatmaktır. Böylece, ADAMTS-1'in normal oksijen koşullarında, bazal transkripsiyonel aktivitesi ve karaciğer dokuya özel aktivitesi konusunda bilgi sahibi olunacaktır. Ayrıca genin promotorunda muhtemel olarak bağlanma bölgeleri bulunan transkripsiyon faktörlerinin etkileri belirlenerek, hem

mRNA hem de protein seviyesinde analizleri yapılacaktır. Hatipoğlu ve arkadaşları tarafından ADAMTS-1'in hipoksik koşullar altında regüle edildiği bilgisine dayanılarak, seçilen transkripsiyon faktörlerinin etkileri hem normal oksijen durumunda hemde  $\text{CoCl}_2$  indüklenmiş hipoksik koşullar altında analiz edilecektir. Transkripsiyonel aktivitede görülen değişiklikler mRNA düzeyinde ve protein düzeyinde de korunup korunmadığını belirlemek için gerçek zamanlı PZR ve western blot çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bu kapsamda planlanan çalışmanın basamakları Şekil 7'den takip edileceği gibi, aşağıda da her basamak detaylanmıştır.

**I. Farklı kanser tiplerinde ekspresyonunun değiştiği bilinen ADAMTS-1'in farklı dokulara ait kanser hücre hatlarındaki ve normal dokulardaki ekspresyon durumunun incelenmesi.**

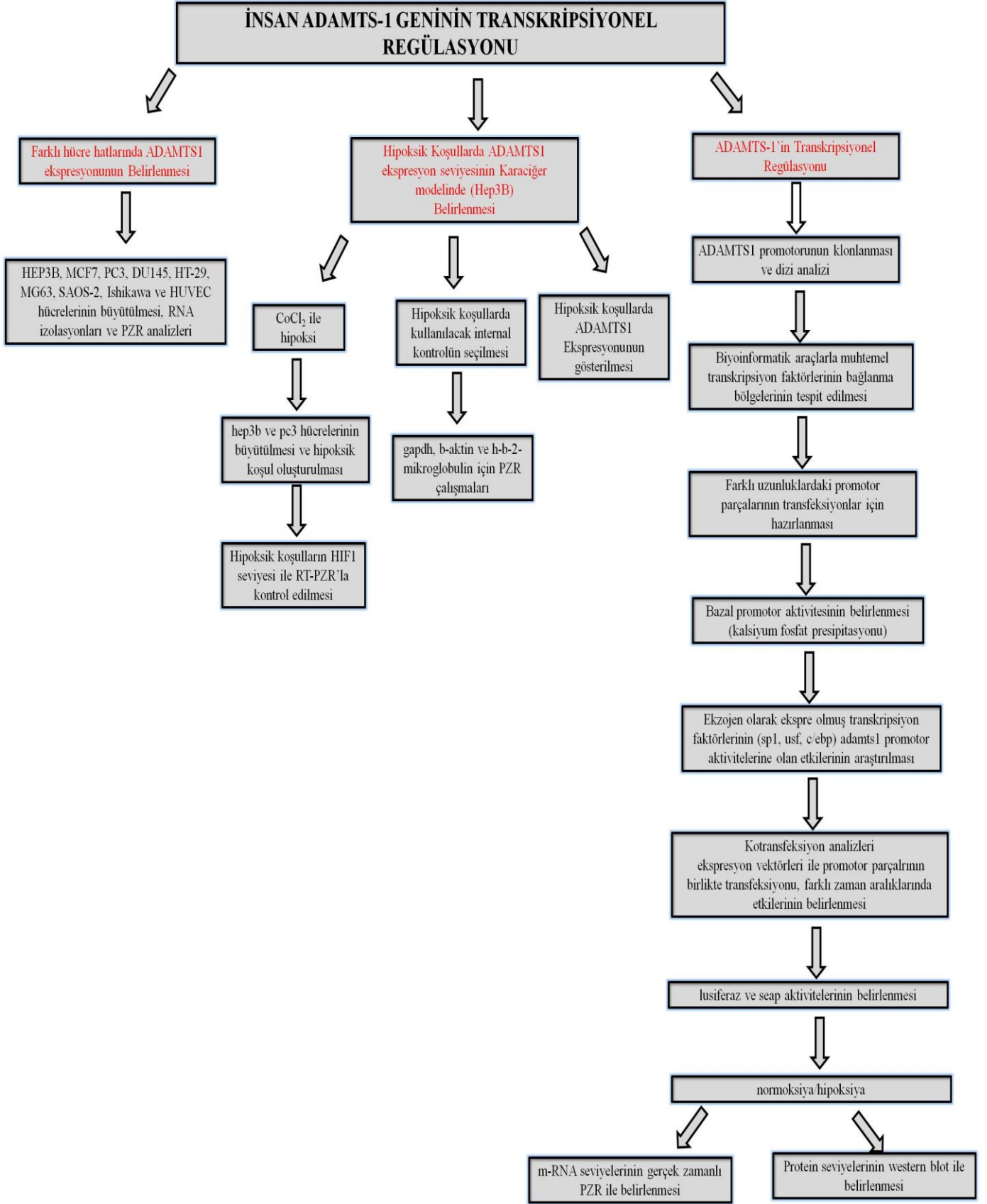
- (i) ADAMTS-1 mRNA ifadesinin semi-quantitatif RT- PZR çalışmaları ile gösterilmesi.

**II. Hipoksik koşullarda Hep3B hücrelerinde ADAMTS-1 ifadesinin belirlenmesi**

- (i) ADAMTS-1'in ifade edildiği hücre hattı olan Hep3B'lerde  $\text{CoCl}_2$  uygulaması ile kimyasal indüklenen hipoksik koşul oluşturulması ve HIF1 $\alpha$  mRNA seviyesinin belirlenerek hipoksik koşul oluşmasının doğrulanması.
- (ii) Hep3B hücre hattında  $\text{CoCl}_2$  ile oluşturulmuş hipoksik koşullarda ve normal oksijen koşullarında, farklı internal kontrol genleri olarak kullanılan GAPDH,  $\beta$ -Aktin ve  $\beta$ -2-Mikroglobulinin PZR ile seviyelerinin kontrol edilmesi ve uygun pozitif kontrol geninin seçimi. Bulunan sonuçların hücre tipine spesifik olup olmadığını analiz etmek için farklı bir hücre hattında prostat kanser modeli (PC3) aynı deneylerin yapılması.
- (iii) Hep3B hücrelerinde normal oksijen koşulları ve hipoksik koşullarda ADAMTS-1 mRNA durumunun belirlenmesi.

### III. ADAMTS-1'in transkripsiyonel regülasyonu

- (i) İnsan ADAMTS-1 promotor bölgesinin genomik DNA dan PZR'a dayalı strateji ile klonlanması.
- (ii) DNA dizileme ile klonlanan dizinin doğrulanması ve biyoinformatik araçlarla muhtemel transkripsiyon faktörlerinin bağlanma bölgelerinin tespit edilmesi.
- (iii) Farklı promotor parçalarının, model olarak seçilen insan hepatoma hücrelerine (Hep3B) aktarılması ve geçici ifadesinin sağlanması. Bu şekilde bazal transkripsiyonel aktitelerin belirlenerek, promotor üzerindeki, transkripsiyonel aktivite açısından en önemli bölgelerin belirlenmesi.
- (iv) Ekzojen olarak ekspre olmuş transkripsiyon faktörlerinin (SP1, USF ve C/EBP $\alpha$ ) direkt olarak ADAMTS-1'in transkripsiyonel aktivitesini etkileyip etkilemediklerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla farklı promotor parçaları transfekte edilmiş olan Hep3B hücrelerinde farklı inkübasyon aralıklarında transkripsiyon faktörü uygulanarak transkripsiyonel aktivitelerinin belirlenmesi.
- (v) Seçilen transkripsiyon faktörlerinin (SP1, USF ve C/EBP $\alpha$ ) ADAMTS-1 geninin mRNA seviyesindeki etkilerinin belirlenmesi için Gerçek Zamanlı PZR analizlerinin yapılması.
- (vi) Aynı transkripsiyon faktörlerinin protein seviyesindeki etkilerinin belirlenmesi için Western Blot analizlerinin yapılması.



**Şekil 1.7:** Çalışmanın planlanan basamakları

## 2. MATERYAL VE METOT

### 2.1 MATERYAL

#### 2.1.1 Çalışmada Kullanılan Kimyasallar

Çalışmada kullanılan kimyasalların tamamı moleküler biyoloji için uygun saflıktadır. Moleküler biyoloji materyalleri ve lusiferaz sisteminde kullanılan kimyasal ve enzimler Biochrom, Sigma, Merck, Fermentas, Qiagene, Roche ve Clontech firmalarından temin edilmiştir.

**Tablo 2.1:** Çalışmada kullanılan kimyasallar ve üreticileri

Kimyasallar	Üretici
DMEM	Biochrom
FCS	Biochrom
Tripsin	Sigma
EDTA	Sigma
L-Glutamine	Sigma
PBS	Sigma
DMSO	Merck
Hepes	Sigma
CaCl <sub>2</sub>	Sigma
NaCl <sub>2</sub>	Sigma

**Tablo 2.1** (Devamı)

NaHPO <sub>4</sub>	Sigma
Beta-mercaptoetanol	Sigma
DEPC	Sigma
MOPS	Sigma
Na Asetat	Sigma
Formaldehit	Sigma
Ethanol	Sigma
Lusiferaz Substrat	Clontech
SEAP substrat	Clontech
Tris Base	Sigma
Borik Asit	Sigma
Etidyum Bromür	Sigma
Agaroz	Sigma
LB	Sigma
LB agar	Sigma
Ampicillin	Sigma
Gliserol	Merck

### 2.1.2 Çalışmada Kullanılan Laboratuvar Gereçleri

**Tablo 2.2:** Çalışmada kullanılan laboratuvar gereçleri

<b>Kullanılan Gereç</b>	<b>Modeli</b>
CO <sub>2</sub> 'li inkübatör	Nuair

**Tablo 2.2 (Devamı)**

Laminar Air Flow	Telstar BIOII, İspanya
İnverted Mikroskop	Nikon
-80 °C ultralow freezer	Sanyo, Japonya
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	Hırayama, Japonya
PH Metre	WTW, Almanya
Saf su cihazı	Destilasyon 3.1 (Comecta Sa,)
Santrifüj	Sigma laborzentrifugen, Germany
Sıcak su banyosu	Consort, İngiltere
Isı kontrollü çalkalamalı inkübatör	GFL, Almanya
UV visible spektrofotometre	Heios α (Unicam), Metro Lab,

**Tablo 2.2 (Devamı)**

Vorteks	Elektromag, Türkiye
Hassas Terazı	Sartorius
96 kuyulu plaka okuyucu spektrofotometre	Bio-Tek
Otomatik pipetler	Finnpipette
Luminometre	Thermo
DNA elektroforezi	Minicell Primo
UVP Gel Görüntüleme	UVP
PZR	Thermo
Mikro santrifüj	Thermo

### 2.1.3 Stok Solusyonlar

#### 2.1.3.1 Kandan DNA izolasyonu Çözeltileri

**Tablo 2.3:** Kandan DNA İzolasyon Çözeltileri

<b>Solüsyon</b>	<b>İçeriği</b>
Proteinaz K	Proteinaz-K son konsantrasyon 10 mg/ml olacak şekilde hazırlandı (1 ml dH <sub>2</sub> O'da 0,01 g). -20°C'de saklandı.



**Tablo 2.3 (Devamı)**

Sature Amonyum Asetat (NH <sub>4</sub> Ac)	74 g NH <sub>4</sub> Ac, dH <sub>2</sub> O ile 100ml'ye tamamlandı. Magnetik karıştırıcıda yaklaşık 40 °C'de çözüldü. Filtrasyon ile steril edildi. +4 °C'de saklandı.
Nüklei Lizis Tamponu	10 mM Tris Base, 400mM NaCl, 2mM Na <sub>2</sub> EDTA. pH 8,2 distile H <sub>2</sub> O ile istenen miktara tamamlandı. +4 °C'de saklandı.

### 2.1.3.2 Agaroz Jel Elektroforezi Çözeltileri

**Tablo 2.4:** Agaroz Jel Elektroforezi Çözeltileri

Solüsyon	İçeriği
5X TBE (pH:8,00)	54g Tris Baz, 27,5 g Borik Asit tardı. 20 ml 0,5M EDTA pH 8,00 ve dH <sub>2</sub> O ile 1 litreye tamamdı.
0,5X TBE	5X TBE stok tampondan 100ml alınarak üzeri dH <sub>2</sub> O ile 1 litreye tamamlandı.

### 2.1.3.3 Formaldehit Jel Elektroforezi (RNA Jeli)

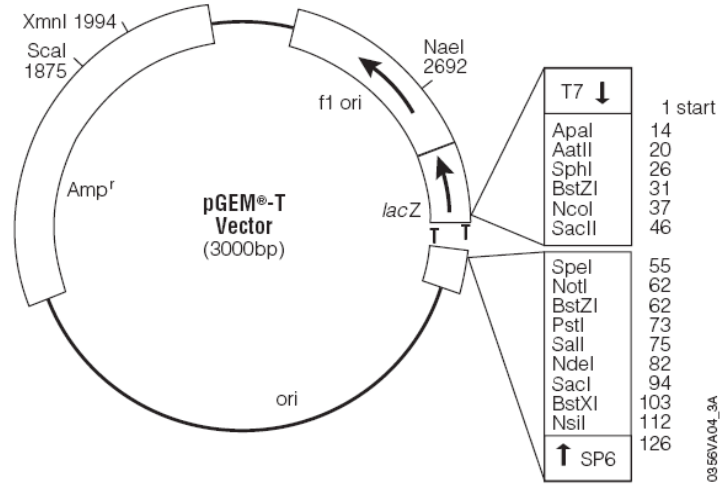
**Tablo 2.5:** Formaldehit Jel Elektroforez Çözeltileri

Solüsyon	İçeriği
10XFA Jel Tamponu	41,9 g MOPS (asitsiz), 6,8 g Na-asetat.3H <sub>2</sub> O, 20 ml 0,5M EDTA pH 7,00 ve 1 litreye tamamlandı.
FA Jel Yürütme Tamponu	100 ml 10XFA Jel tamponu, 20 ml %37'lik (12,3M) formaldehit, 880 ml DEPC'li su.

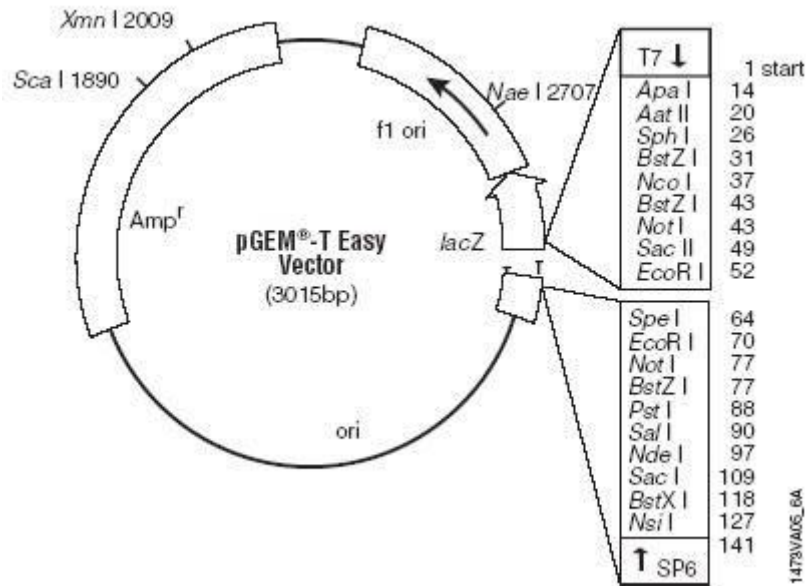
**Tablo 2.6:** DEPC'li dH<sub>2</sub>O

Çözelti	İçeriği
1L DEPC'li H <sub>2</sub> O	1 ml DEPC 1L dH <sub>2</sub> O'ya eklendi ve 37 <sup>0</sup> C'de 1 gece bekletildi.

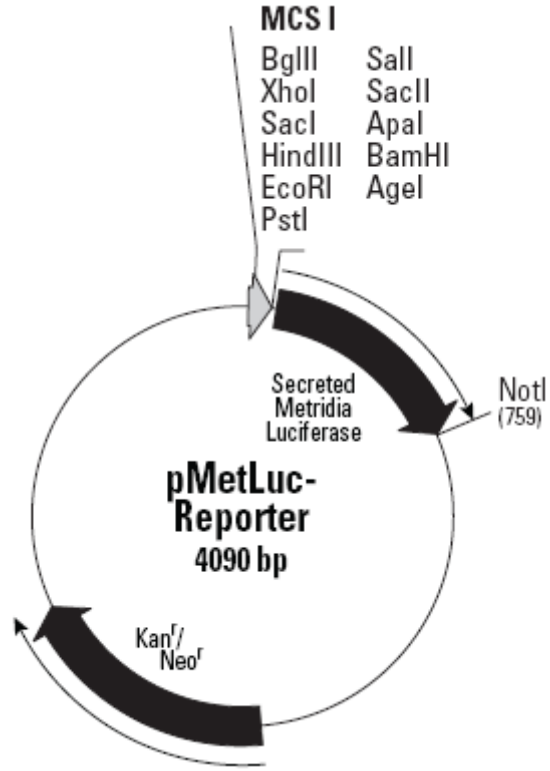
#### 2.1.3.4 Çalışmada kullanılan vektörler



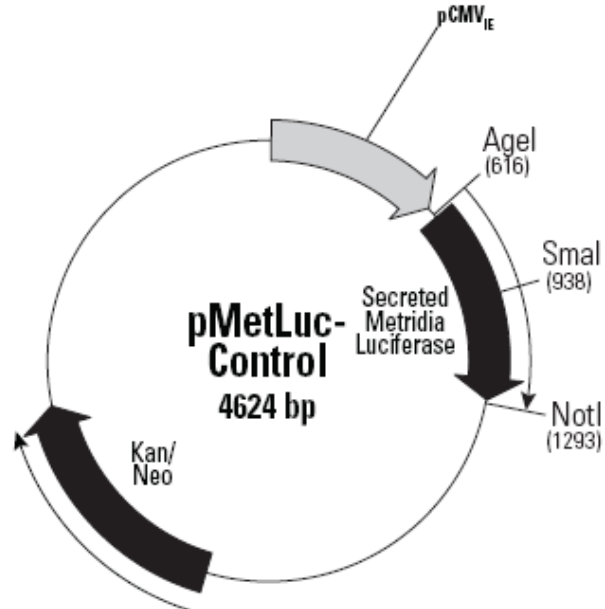
**Şekil 2.1:** pGEMT Vektör Haritası



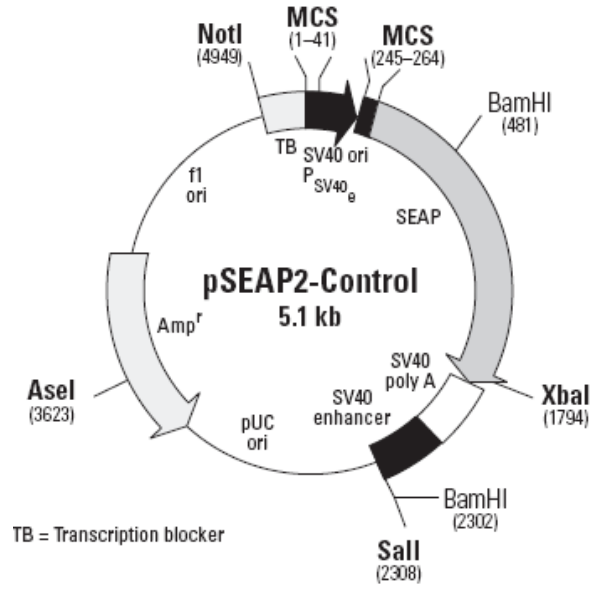
**Şekil 2.2:** pGEMT Easy Vektör Haritası



Şekil 2.3: pMetLuc Reporter Vektör Haritası



Şekil 2.4: pMetLuc Kontrol Vektör



**Şekil 2.5:** SEAP-2 Kontrol Vektör

### 2.1.3.5 *E. coli* için Bakteriyel Kültür Ortamları

*E. coli* için gerekli kültür ortamı olarak LB ve LB-agar kullanılmıştır. Toz halinde temin edilen bakteriyel medyumlar üretici firmanın belirttiği şekilde hazırlanarak ddH<sub>2</sub>O ile hazırlanarak otoklavlanarak steril edildi.

### 2.1.3.6 Antibiyotik Hazırlanması

Kültürlerde kullanılan Ampicillin stokları 100 mg/ml olacak tarzda steril ddH<sub>2</sub>O ile hazırlandı. 0.22 mikronlukluk filtreler kullanılarak steril edildi.

### 2.1.3.7 Transformasyon İçin Kompetent Hücre Hazırlama Çözeltisi

**Tablo 2.7:** Kompetan Hücre için Kullanılan Çözeltiler

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

### 2.1.3.8 Transfeksiyon Çözeltileri

**Tablo 2.8:** Transfeksiyon Çözeltileri

<b>Solusyon</b>	<b>İçeriği</b>
2 mM CaCl <sub>2</sub>	14,7 g tart, 50 ml'ye distile su ile tamamlandı. Otoklav yapıldı, filtre edildi ve +4 °C'de saklandı.
2 XHepes	1,6 g NaCl, 0,04 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 1,3 g Hepes 100 ml'ye distile su ile tamamlandı. pH 7,05 – 7,12 olmalıdır. Otoklav yapıldı, filtre edildi ve -20 °C'de saklandı.

### 2.1.3.9 Lusiferaz ve SEAP (Secreted Alkaline Fosfatase-Salınan Alkalın Fosfataz) Çözeltileri

**Tablo 2.9:** Lusiferaz Aktivite Ölçüm Çözeltileri

<b>Solusyon</b>	<b>İçeriği</b>
10 X Substrat Çözeltisi	Kit içerisindeki liyofilize substrat eşit hacimdeki substrat buffer ile çözüldü.
1 X Substrat/Reaksiyon Tamponu	1/10 oranında kullanılacak kadar miktar 10 X substrat çözeltisi, reaksiyon tampon ile sulandırıldı. Her ölçüm için 5 µL kullanıldı.

**Tablo 2.10:** SEAP Aktivite Ölçüm Çözeltileri

<b>Solusyon</b>	<b>İçeriği</b>
1X Dilusyon Tamponu	Kit içerisindeki 5X dilüsyon tamponundan çalışmada kullanılacak hacim kadarı 1X'e ddH <sub>2</sub> O ile sulandırıldı. Her örnek için 75 µL kullanıldı.

### 2.1.3.10 Western Blot Çözeltileri

**Tablo 2.11:** Western Blot Çözeltileri

Solüsyon	İçeriği
Laemli Tamponu	0,125 M Tris-HCl (pH 6,8), %4 (w/v) SDS, %10 (v/v) Gliserol, %10 (v/v) $\beta$ -2-Mercaptoetanol
Brom fenol mavi Çözeltisi	%0.05 (w/v) bromfenol mavisi distile su içinde
SDS PAGE Alt Jel	1,5 M Tris-HCl (pH 8,8), %10 (w/v) SDS
SDS PAGE Üst Jel	1 M Tris-HCl (pH 6,8), %10 (w/v) SDS
SDS PAGE Yürütme Tampon Çözeltisi	25 mM Tris, 250 mM Glisin, % 0,1 (w/v) SDS
Western Blot Transfer Çözeltisi	25 mM Tris, 192 mM Glisin, % 20 (v/v) Metanol
10X TBS	10 mM Tris-HCl, 20 mM NaCl, pH 7.4

### 2.1.3.11 Laemli Çözeltisi

**Tablo 2.12:** Laemli Çözeltisi

Son Konsantrasyon	Stok Solüsyon	1ml için	500 $\mu$ L için
0,125 M Tris HCl ph:6,8	0,5M Tris HCl ph:6,8	250 $\mu$ L	125 $\mu$ L
%4 SDS	%10 SDS	400 $\mu$ L	200 $\mu$ L
%10 Gliserol	%100 Gliserol	100 $\mu$ L	50 $\mu$ L
%10 $\beta$ -Merkaptoethanol	%100 $\beta$ - Merkaptoethanol	100 $\mu$ L	50 $\mu$ L
dH <sub>2</sub> O	dH <sub>2</sub> O	150 $\mu$ L	75 $\mu$ L

### 2.1.3.12 SDS PAGE Çözeltileri

**Tablo 2.13: SDS PAGE Çözeltileri**

Jel İçeriği	%10 Ayırma Jeli	%5 Yığıma Jeli
Üst Jel Tamponu	-	2.5 ml
Alt Jel Buffer	2.5 ml	-
Akrilamid:Bisakrilamid (37.5:1)	2.5 ml	1.25 ml
ddH <sub>2</sub> O	5 ml	6.25 ml
% 10 (w/v) APS	100 µL	100 µL
TEMED	10 µL	10 µL

## 2.2 METOT

### 2.2.1 Çalışmada kullanılan ortamın ve malzemenin Temizliği ve Sterilizasyonu

Isıya dayanıklı bütün cam malzemeler, pipet uçları, epindorflar, santrifüj tüpleri, bakteri kültür ortamları 121°C'de 20 dakika (1,02 atm basınçta ) otoklavda steril edildi.

Doku Kültürü Laboratuvarı her hafta periyodik olarak virkon içeren sıvılarla 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.

### 2.2.2 Bakteriyel Çalışmalar

#### 2.2.2.1 Çalışmada Kullanılan Bakteri Soyları

Çalışma sırasında transformasyon için *E.coli* XL1-blue (endA1 gyrA96(nal<sup>R</sup>) thi-1 recA1 relA1 lac glnV44 F'[ ::Tn10 proAB<sup>+</sup> lacI<sup>q</sup> Δ(lacZ)M15] hsdR17(r<sub>K</sub><sup>-</sup> m<sub>K</sub><sup>+</sup>)) ve *E.coli* DH5α (SupE44Δ lacU169 (Φ80 LacZ ΔM15) hsdR17recA1 endA1 gyrA96 thr-1 rI A1) bakteri soyları kullanıldı.

#### 2.2.2.2 Bakteriyel Kültür Ortamı

*E.coli* için gerekli kültür ortamı olarak LB ve LB-agar kullanıldı. Toz halinde satın alınan bakteriyel medyumlar üretici firmanın belirttiği şekilde dH2O ile hazırlanarak otoklav edildi.



### 2.2.2.3 Antibiyotikler

Ampisilin 100 mg/ml stok çözelti şeklinde hazırlandı, 0,22 µm filtre ile steril edilerek -20 °C’de saklandı.

### 2.2.2.4 Kompetent Hücre Hazırlanması

Kompetant hale getirilecek *E.coli* hücreleri LB agar içeren petrielerde 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 LB besiyeri konularak ve bu besiyerine önkültürden 5 ml inoküle edildi. 37°C’de çalkalamalı etüvde inkübasyona bırakıldı ve belirli zaman aralıklarında absorbans alınarak OD<sub>600</sub>’nin 0,5 ile 0,6 arasında olması beklendi. Bakteri süspansiyonu 3000 rpm de 5 dakika 4°C’de santrifüj yapıldı. Süpernatant pipetle alınarak başlangıç hacminin yarısı 0,1 M CaCl<sub>2</sub> solusyonundan eklenerek, nazikçe pipetaj yapılarak pelletin çözünmesi sağlandı, 25 dakika buz üzerinde inkübe edildi. Tekrar 3000 rpmde 4°C’de 5 dakika santrifüj yapıldı. Süpernatant uzaklaştırılarak başlangıç hacminin 1/10’u 0,1 M CaCl<sub>2</sub> ile tekrar pellet çözüldü. 1-4 saat arasında buz üzerinde bekletildi. Daha sonra eşit hacimde %40 steril gliserol ilave edilerek karıştırıldı. Buz üzerinde bekletilen eppendorflara 100 µl ya da 200 µl olacak şekilde alikot yapıldı ve etiketlenerek -80 °C dondurucuda saklandı.

### 2.2.2.5 Transformasyon

Transformasyon için, 50 µL kompetent hücreye 2 µL plazmit ilave edilerek buz üzerinde 20 dakika bekletildi. Süre sonunda 42 °C’de 45 ile 50 saniye ısı şoku uygulandı. Hacim 950 µL LB ilave edilerek 1 ml’ye tamamlandı ve 37°C’de çalkalamalı etüvde 1,5 saat inkübe edildi. Süre sonunda hücrelerden 100 µL ampisilin içeren LB agar besiyerine yayıldı ve bir gece inkübe edildi. Ayrıca hücreler eppendorflara alınarak 3000 rpm’de 10 dakika santrifüj edildi. Pellet 100 µL LB’de çözüldü, ampisilin içeren LB agar besiyerine yayıldı ve bir gece inkübe edildi.

### **2.2.2.6 Plazmit DNA izolasyonu (Küçük ölçekte-Miniprep)**

Miniprep DNA izolasyonu için Miniprep DNA isolation kit (Qiagen) kullanıldı. Kit protokolüne göre, son konsantrasyonu 100 µg/ml ampisilin içeren 5 ml LB besiyerine transformasyon gerçekleşmiş olan tek koloni ekim yapıldı ve bir gece 37 °C çalkalamalı etüvde inkübe edildi. Kültür 3000 rpm 10 dakika santrifüj yapıldı ve bakteri pelletine protokole uygun şekilde yapılan işlemlerden sonra DNA elüe edildi.

### **2.2.2.7 Plazmit DNA izolasyonu (Büyük ölçekte-Maxiprep)**

#### **2.2.2.7.1 Qiagene maxiprep plazmit DNA izolasyonu**

Büyük miktarda ve transfekte edilebilecek saflıkta plazmit DNA izolasyonu için Endo-free Maxi Prep Kit (Qiagen) kullanıldı. Kit protokolüne göre, uygun konsantrasyonda seçici antibiyotik içeren 2-5 ml LB besiyeri içerisine tek koloni ekim yapıldı. 37 °C de 8 saat 250 rpm de çalkalamalı etüvde inkübe edildi. Süre sonunda başlangıç kültürü 1/500-1/1000 arasında seçici antibiyotik içeren LB medyumda dilue edildi. Yüksek kopyalı plazmitler için 100 ml medyum, düşük kopyalı olanlar için 250 ml medyum kullanıldı. 37°C de 12-16 saat 250 rpm'de inkübe edilerek bakterilerin büyümesi beklendi. 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.

#### **2.2.2.7.2 Roche maxiprep plazmit DNA izolasyonu**

Büyük miktarda ve transfekte edilebilecek saflıkta plazmit DNA izolasyonu için ayrıca Roche maxi prep kiti kullanıldı. Kit protokolüne göre, uygun konsantrasyonda seçici antibiyotik içeren 2-5 ml LB besiyeri içerisine tek koloni ekim yapılır. 37°C'de 1 gece 250 rpm de çalkalamalı etüvde inkübe edildi. Seçici antibiyotik içeren 150 mL LB medyumda önkültürden inoküle edilerek 37°C'de 1

gece 250 rpm de çalkalamalı etüvde inkübe edildi. Kitin önerdiği basamaklara uygun olarak izolasyon yapıldı.

### **2.2.3 DNA ile ilgili teknikler**

#### **2.2.3.1 Primer Tasarımı**

Primer tasarımı için [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov), [www.idtdna.com](http://www.idtdna.com) ve [www.restrictionmapper.org](http://www.restrictionmapper.org) adreslerinden yararlanıldı. Tasarlanan primerlerin saç tokası yapısı oluşturmamasına,  $T_m$  sıcaklıklarının birbirine yakın olmasına ve nükleotitlerin dağılımının mümkün olduğunca eşit olmasına dikkat edildi. Ayrıca tasarlanan primerler databanklarda bulunan DNA sekansları ile blast yapılarak insan ADAMTS-1 geni ile en yüksek benzerliği gösterdiği tespit edilmiştir.

#### **2.2.3.2 Kandan Genomik DNA İzolasyonu**

DNA izolasyonu için, 400 µL EDTA'lı tüpten alınan kan 1,5 ml eppendorf tüpüne alınarak üzerine 1ml distile su ilave edildi ve 5 dakika süresince çalkalandı. 3500 rpmde 10 dakika santrifüj yapıldıktan sonra üst kısım atıldı, üzerine yine 1 ml distile su katılarak çalkalandı ve 10 dakika 3500 rpmde santrifüj yapıldı. Üst kısım atıldıktan sonra çökelti üzerine 250 µL nüklei lizis tamponu, 20 µL %10 luk SDS ve 20 µL proteinaz K ilave edilerek alt üst edilerek çalkalandı. Daha sonra 72 °C su banyosunda 10 dakika inkübe edildi, süre sonunda 175 µL doymuş amonyum asetat eklenerek çalkalandı ve oda sıcaklığında 15 dakika bekletildi. 4500 rpm'de 20 dakika santrifüj sonunda üst kısım temiz bir eppendorfa alınarak üzerine 2 katı oranında absolu etanol eklendi. Eppendorf alt üst edilerek DNA'nın belirmesi gözlendi ve 13000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek DNA çökmesi sağlandı. Üst kısım uzaklaştırıldı ve çökelti üzerine 250 µL %75 etanol ilave edilerek tekrar 13000 rpm'de 10 dakika santrifüj yapıldı ve üst kısım atılarak DNA havada kurutuldu. Son olarak 250 µL distile suda DNA çözülerek -20 dondurucuda saklandı.

### **2.2.3.3 Polimeraz Zincir Reaksiyonları (PZR)**

PZR reaksiyonları 50 µL hacimde yapıldı. Kalıp olarak yaklaşık 200 ng DNA, her bir primer son konsantrasyonu 2 µM, 1X Tampon (Fermentas) (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, pH 9.0, %1 (v/v) Triton X-100), 200 mM her bir dNTP ve 2,5 Unite Taq DNA polimeraz (Fermentas) kullanıldı. MgCl<sub>2</sub> konsantrasyonu (1 mM, 2 mM ve 4 mM) ise her bir PZR reaksiyonu için optimize edildi. PZR sonuçları agaroz jelde görüntülendi ve istenilen bantlar jelden geri kazanıldı.

### **2.2.3.4 DNA Agaroz Jel Elektroforezi**

DNA elektroforezi için yatay jeller kullanıldı ve 80 volt elektrik akımında 45 dakika örnekler yürütüldü. Elektroforez tamponu olarak 0,5 x TBE tercih edildi. Agaroz jelle son konsantrasyonu 0,5 µg/ml olacak şekilde etidyum bromür ilave edildi. DNA'yı izleme boyası olarak bromfenol mavisi kullanıldı. Çalışmalarda plazmit DNA'lar için %0,8 ve ekspresyon profillerini karşılaştırmak için %2'lik konsantrasyonda agaroz jeller kullanıldı. Elektroforezde ayrılan DNA parçalarının büyüklüğünün belirlenmesi için 1 kb DNA ladder ile karşılaştırıldı. Elektroforez sonuçları UVP jel görüntüleme sisteminde görüntülenerek fotoğrafları çekildi.

### **2.2.3.5 Agaroz Jelden DNA Saflaştırılması**

İstenilen DNA bantları UV transilluminator üzerinde agaroz jelden kesilerek alındı ve DNA jel ekstraksiyon kiti (Qiagen) kullanılarak DNA elüe edildi. Jelden kazanılan DNA'nın küçük bir kısmı tekrar jelde yürütülerek kontrol edildi. DNA miktarı ve temizliğinin kontrolü için 260 ve 280 nm dalga boyundaki absorbanları alındı.

### **2.2.3.6 DNA miktar tayini**

İzole edilen plazmitlerin miktarları ve saflıkları 260nm ve 280 nm'de absorbanlarının ölçümü ile hesaplandı. Bu amaçla kuartz küvetlere kör değer için

200 µL dH<sub>2</sub>O, DNA ölçümleri için 195 µL dH<sub>2</sub>O ve ilgili plazmit DNA konuldu. Elde edilen absorbans değerleri ve saflıklarının değerlendirilmesi için aşağıdaki formüller kullanılmıştır.

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

$$\text{Saflık} = A_{260} / A_{280}$$

### 2.2.3.7 PZR Ürünlerinin T:A Klonlaması

Taq polimeraz kullanılarak elde edilen PZR ürünleri pGEM-T vektörüne protokolda belirtildiği şekilde T:A klonlaması yapıldı (Promega). Buna göre 20 µL toplam hacim olacak şekilde, 2 µL pGEM-T vektör, 6 µL insert DNA (jelden kazanılan PZR ürünü), 10 µL T4 ligaz tamponu ve 2 µL T4 DNA ligaz +4 °C’de bir gece inkübe edildi. Ligasyon sonuçları *E.coli XL1blue* ve DH5α kompetent hücrelerine transforme edildi. Transformantların seçimi mavi-beyaz koloni yöntemine göre yapıldı. Bunun için ampisillin içeren LB agar besiyerlerine 100 µL IPTG (100 mM stok) ve 20 µL X-Gal (stok 50 mg/ml) yayıldı.

## 2.2.4 Hücre Kültürü

### 2.2.4.1 Hücre Kültüründe Kullanılacak Malzemelerin Hazırlığı

#### 2.2.4.1.1 Hücre Kültürü Medyumunun Hazırlanması

Hücre kültürü medyumunu DMEM (Dulbecco’s Modified Eagles Medium) içine L-Glutamine son konsantrasyonu 0,2 mM ve FCS son konsantrasyonu % 10 olacak şekilde ilave edilmiştir. Tüm bileşenler 0,22 µm steril filtreden süzülerek steril edildi.

#### **2.2.4.1.2 FCS Hazırlanması**

FCS (Fetal Calf Serum)  $-20^{\circ}\text{C}$ 'de saklandı ve taşınması soğuk zincirle yapıldı. Stok serum ilk kullanımdan önce  $56^{\circ}\text{C}$ 'de 1 saat ısı ile inaktive edildi ve tekrar  $-20^{\circ}\text{C}$  de saklandı.

#### **2.2.4.1.3 PBS Tampon Çözeltisinin Hazırlanması**

Tablet şeklinde temin edilen PBS ( Phosphate-Buffered Salin), her tableti 100 ml ddH<sub>2</sub>O ile hazırlandı, otoklavlandı ve  $2-8^{\circ}\text{C}$ 'de saklandı.

#### **2.2.4.2 Çalışmada Kullanılan Hücre Soyları**

Bu çalışmada kullanılan İnsan karaciğer karsinomu (Hep3B) hücre hattı Cardiff Üniversitesinden Dr. Ramji'den sağlandı. İnsan prostat karsinom hücreleri (DU145, PC3) ve İnsan meme karsinom hücreleri (MCF7) Ege Üniversitesi Biyomühendislik Bölümünden Dr. Kemal Sami Korkmaz'dan sağlandı. İnsan kemik karsinom hücre hatları (MG63 ve Saos-2) Cardiff Üniversitesi'nden Dr. Kennent'den sağlandı. İnsan kolon karsinom (HT-29) hücre hattı Ankara Şap Enstitüsü'nde, Hücre Bankası sorumluluğunda olan ve Avrupa Kültür Koleksiyonları Organizasyonu üyesi olan Hayvan Hücre Kültürü Koleksiyonu'ndan (HÜKÜK) sağlandı. İnsan endometrial adenokarsinom hücre hattı (Ishikawa) İstanbul Üniversitesi Çapa Tıp Fakültesinden Dr. Ayhan Bilir'den sağlandı. Kullanılan bütün hücre hatları (Hep3B, PC3, DU145, MCF7, HT-29, HUVEC, MG63, Saos-2, Ishikawa) 15 ml medyumda  $75\text{ cm}^2$  flaklarda, içerisinde 0,2 mM L-Glutamine ve %10 FCS içeren DMEM medyumunu içerisinde haftada 2 kez rutin pasaj yapılarak üretildi.

#### **2.2.4.3 Hücre Soyunun Başlatılması**

Uzun dönemde  $-80^{\circ}\text{C}$ 'de saklanan hücre hatlarının büyütülmesi için  $-80^{\circ}\text{C}$ 'den çıkarılan hücreler  $37^{\circ}\text{C}$  sıcaklığındaki su banyosuna alındı ve hızlıca çözümleri sağlandı. Çözünen hücreler %10'luk FCS içeren medyuma alındı, alt

üst edildi ve 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı, oluşan pellet medyum ile çözüldü ve flasklara ekim yapıldı. Flasklar etiketlendi ve 37 °C, %5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatöre konuldu.

#### **2.2.4.4 Hücrelerin Büyütülmesi**

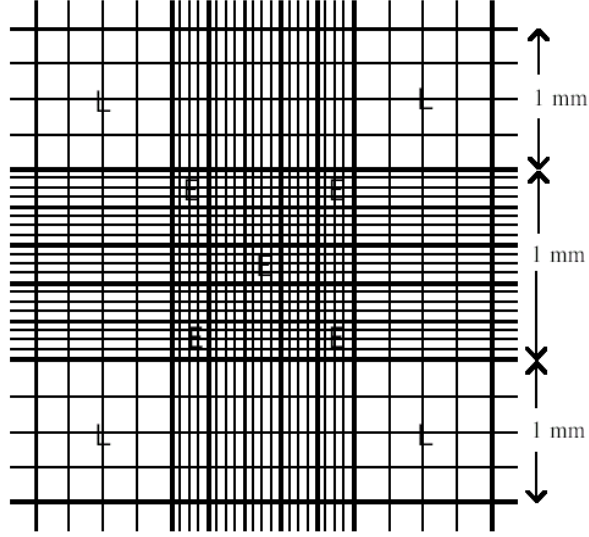
Hücreler 15 ml medyumda 75 cm<sup>2</sup> flasklarda, içerisinde 0,2 mM L-Glutamine ve % 10 FCS içeren DMEM medyumunu içerisinde haftada 1 kez rutin pasaj yapılarak üretildi.

#### **2.2.4.5 Hücrelerin Pasajlanması**

Hücreler buldukları yüzeyi %80-90 oranında kaplayınca, içerisindeki medyum uzaklaştırıldı. Hücreler 2 kez steril PBS ile yıkandı ve 75 cm<sup>2</sup> flasklar için 3 ml Tripsin-EDTA ile tripsinizasyon yapıldı. Hücreler yüzeyden ayrılınca medyum eklendi ve 1000 rpm 'de 5 dakika santrifüj ile hücreler çöktürüldü. Süpernatant uzaklaştırıldı, pellet medyum ile çözüldü ve flasklara ekim yapıldı. Flasklar etiketlendi ve 37 °C, %5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatöre konuldu.

#### **2.2.4.6 Canlı Hücrelerin Belirlenmesi (Trypan Blue Exclusion) ve Hücre Sayımı**

Toplam hücre süspansiyonunun mililitresindeki hücre sayısı hesaplamak için üzeri 25 küçük kareye ayrılmış, 1mm<sup>2</sup> alan, 0,1 mm derinliği olan ve böylelikle toplam hacmin hesaplanabildiği hemositometre (Şekil 2.6) lamı kullanıldı. Canlı ve ölü hücreleri ayırt etmek için 10 µL hücre süspansiyonu eşit hacimde trypan blue (1:1 dilasyon oranında) ile 3-5 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi ve sayım yapıldı.



**Şekil 2.6:** Hemositometre

Süspansiyonun mililitresindeki toplam hücre sayısı aşağıdaki formülle bulunur.

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

#### **2.2.4.7 Hücrelerin -80 °C'de Saklanması**

Hücreler buldukları yüzeyi %80-90 oranında kaplayınca, içerisindeki medyum uzaklaştırıldı. Hücreler 2 kez steril PBS ile yıkandı ve 75 cm<sup>2</sup> flasklar için 3 ml Tripsin-EDTA ile tripsinizasyon yapıldı. Hücreler yüzeyden ayrılınca medyum eklendi ve 1000 rpm 'de 5 dakika santrifüj ile hücreler çöktürüldü. Süpernatant uzaklaştırıldı, pellet % 10 DMSO içeren FCS ile dikkatlice çözüldü, cryovial tüplerine konuldu ve etiketlenerek 80 °C'deki dolaba konuldu.

#### **2.2.4.8 Kalsiyum-Fosfat Prespitasyon Metoduyla Geçici Transfeksiyon**

Bu metot 12 kuyulu plakalarda ve 25 cm<sup>2</sup> flasklarda uygulandı. 12 kuyulu plakalarda transfeksiyondan 24 saat önce hücreler 250.000 hücre/kuyu olacak şekilde yayıldı. Transfekte edilecek DNA ve 2 M CaCl<sub>2</sub> ayrı bir tüp içinde hazırlandı. Üzerine 2 X Hepses eklenerek yarım saat prespitasyon için oda sıcaklığında bekletildi. DNA/Kalsiyum fosfat prespitasyonu oluştuktan sonra karışım damla

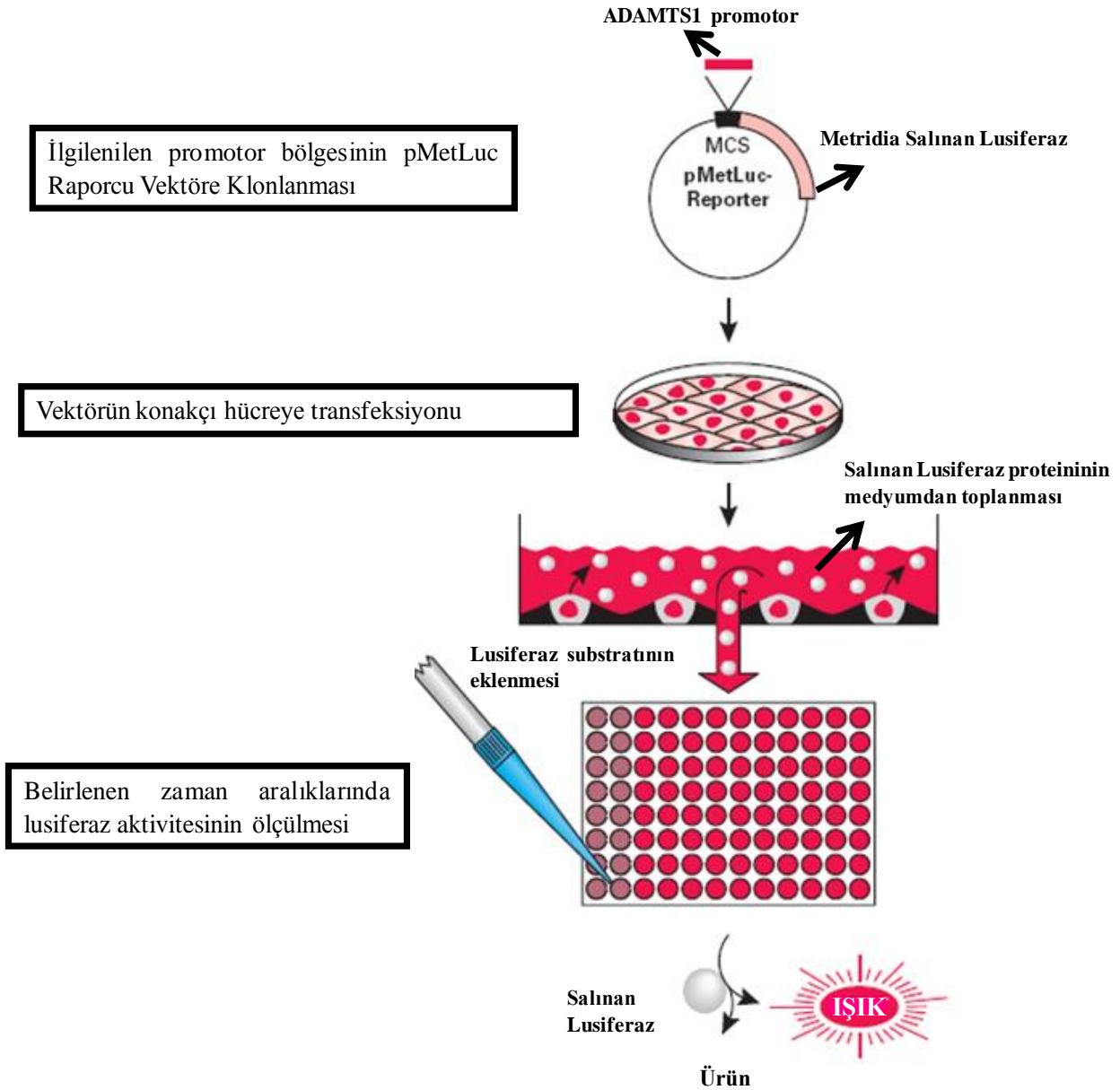


damla kuyucuklara eklendi. Plaka hafifçe sallanarak karışımın dağılması sağlandı. 6 saat sonra transfeksiyon solusyonu değiştirilerek, PBS ile kuyular yıkandı ve taze medyum eklendi. 24, 48 ve 72 saat sonra hücre medyumu alınarak lusiferaz aktivitesi belirlendi.

25cm<sup>2</sup> flasklarda transfeksiyondan 24 saat önce hücreler yaklaşık 2.000.000 olacak şekilde yayıldı. Transfekte edilecek DNA ve 2M CaCl<sub>2</sub> ayrı bir tüp içinde hazırlandı. Üzerine 2XHepes eklenerek yarım saat prespitasyon için oda sıcaklığında bekletildi. DNA/Kalsiyum fosfat prespitasyonu oluştuktan sonra karışım damla damla kuyucuklara eklendi. Flask 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 ile kaldırıldı ve pellet haline getirilerek RNA izolasyonları için -80 °C dondurucuda saklandı.

#### **2.2.4.9 Lusiferaz Aktivitesinin Ölçülmesi**

12 kuyulu plakalarda yapılan transfeksiyon sonrasında 24, 48 ve 72 saatlik sonuçların okunmasında şu yöntem uygulandı; 96 kuyulu plakalara 50 µl hücre kültürü medyumu eklendi (Şekil 2.7). Bu aşamada istenirse örnekler -80'de saklanarak ölçümler daha sonra yapılabilir. 10X substrat solusyonu hazırlandı ve daha sonra ölçümlerde kullanılmak üzere 1X'e Reaksiyon tampon ile seyreltildi. Her bir örnek için taze hazırlanmış 1XSubstrat/Reaksiyon tamponundan 5 µl kullanıldı. Sonuçlar luminometrede ölçüldü.



**Şekil 2.7:** Salınan Lusiferaz sisteminin genel çalışma stratejisi

#### 2.2.4.10 SEAP (Salınan Alkalın Fosfataz) Aktivitesinin Ölçümü

12 kuyulu plakalarda yapılan transfeksiyon sonrasında 24, 48 ve 72 saatlik sonuçların okunmasında şu yöntem uygulanmıştır; 96 kuyulu plakalara 25 µl hücre kültürü medyumunu eklendi. Bu aşamada istenirse örnekler -20 °C'de saklanarak ölçümler daha sonra yapılabilir. 5X dilüsyon tampon 1X'e ddH<sub>2</sub>O ile dilüe edildi. 75 µl 1 X Dilüsyon tampon örneklere eklendi ve plaka alimünyum folya ile sarılarak 65

°C'de 30 dakika bekletildi. 2-3 dakika buzda bekletildi ve daha sonra oda sıcaklığına getirildi. Oda sıcaklığına getirilmiş olan SEAP substrat çözeltisinden 100 µl eklendi ve örnekler oda sıcaklığında 10-60 dakika bekletildi (Şekil 2. 7). İşlem sonunda sonuçlar luminometrede ölçüldü.

## **2.2.5 RNA ile ilgili Teknikler**

### **2.2.5.1 Deney dizaynının kurulması**

#### **2.2.5.1.1 Normal koşullar**

25 cm<sup>2</sup> flasklarda transfeksiyondan 24 saat önce hücreler yaklaşık 2.000.000 olacak şekilde yayıldı. Transfekte edilecek DNA'lar sırasıyla 10 µg son konsantrasyonda olacak şekilde USF, SP1 ve C/EBPα ve 2M CaCl<sub>2</sub> ayrı bir tüp içinde hazırlandı. Üzerine 2XHepes eklenerek yarım saat prespitasyon için oda sıcaklığında bekletildi. DNA/Kalsiyum fosfat prespitasyonu oluştuktan sonra karışım damla damla kuyucuklara eklendi. Flask 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 ile kaldırıldı ve pellet haline getirilerek RNA izolasyonları için -80 °C dondurucuda saklandı.

#### **2.2.5.1.2 Hipoksik Koşullar**

25 cm<sup>2</sup> flasklarda transfeksiyondan 24 saat önce hücreler yaklaşık 2.000.000 olacak şekilde yayıldı. Transfekte edilecek DNA'lar sırasıyla 10 µg son konsantrasyonda olacak şekilde USF, SP1 ve C/EBPα ve 2 M CaCl<sub>2</sub> ayrı bir tüp içinde hazırlandı. Üzerine 2XHepes eklenerek yarım saat prespitasyon için oda sıcaklığında bekletildi. DNA/Kalsiyum fosfat prespitasyonu oluştuktan sonra karışım damla damla kuyucuklara eklendi. Flask hafifçe sallanarak karışımın dağılması sağlandı. 6 saat sonra transfeksiyon solusyonu değiştirilerek, PBS ile kuyular yıkandı ve taze medyum eklendi. 150 µM son konsantrasyonda CoCl<sub>2</sub> eklenerek hücreler

hipoksik koşullar için uyarıldı. 24, 48 ve 72 saat sonra hücreler tripsin ile kaldırıldı ve pellet haline getirilerek RNA izolasyonları için -80 °C dondurucuda saklandı.

### **2.2.5.2 Hücre pelletlerinden RNA izolasyonu**

Pellet haline getirilerek RNA izolasyonları için -80 °C dondurucuda saklanan örnekler buz üzerinde dikkatlice çözüldü. Qiagen RNeasy kiti kullanılarak RNA izolasyonları yapıldı. RNA örnekleri uzun dönemde -80 °C dondurucuda saklandı.

### **2.2.5.3 RNA Miktar Tayini**

İzole edilen RNA'ların miktarları ve saflıklarının tayini için 260 nm ve 280 nm'de absorbansları alındı. Bu amaçla kuvartz küvetlere kör değer için 200 µL dH<sub>2</sub>O, RNA ölçümleri için 195 µL dH<sub>2</sub>O ve ilgili RNA konuldu. Elde edilen absorbans değerleri ve saflıklarının değerlendirilmesi için aşağıdaki formüller kullanıldı.

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

$$\text{Saflık} = A_{260} / A_{280}$$

### **2.2.5.4 RNA 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 kurumaya bırakıldı. 0,5 g agaroz, 5 ml 10XFA jel tampon ve 50ml 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 1XFA jel tamponu ile doldurulan tanka yerleştirildi. 5 µL RNA örneği ve 3 µL 2X yükleme boyası 65 °C'de 3-5 dakika bekletildi ve buzda soğutulduktan sonra kuyulara yüklendi.

### 2.2.5.5 Reverse Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonları (RT-PZR)

RT-PZR iki ayrı basamakta yapıldı. Birinci basamakta Reverse-Transkriptaz (RT) kullanılarak cDNA sentezlenmesi gerçekleştirildi, ikinci basamakta ise gene spesifik primerler ile ilk basamakta elde edilen cDNA kullanılarak ilgili gen bölgesinin amplifikasyonu, Polimeraz Zincir Reaksiyonları (PZR) gerçekleştirildi.

#### 2.2.5.5.1 cDNA Eldesi

Miktarları belirlenen RNA örneklerinden 1000 ng olacak şekilde RNA kalıbı kullanılarak RT-PZR yapıldı. RT-PZR aşağıdaki tabloya uygun olarak her deney grubu için yapıldı.

**Tablo 2.14:** cDNA Eldesi İçin Uygun PZR Bileşenleri

Bileşen (son konsantrasyon)	
RNA kalıp	---
Oligo dT (Fermentas) (0,5 µg)	1 µL
DEPC'li su	---
<b>65 °C'de 5 dk</b>	
5X Reaction buffer (1X)	4 µL
Ribolock Rnaz inhibitör (20 ünite)	0,5 µL
dNTP karışımı (1 mM)	2 µL
M-MuLV Reverse Transcriptase (Fermentas) 40 ünite)	2 µL
Son hacim	20 µL
<b>Yavaşça karıştır ve kısa süreli santrifüj yap</b>	
<b>37 °C'de 60 dk</b>	
<b>70 °C'de 10 dk</b>	

### 2.2.5.5.2 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

cDNA eldesinden sonra ADAMTS-1, HIF-1 $\alpha$ , VEGF,  $\beta$ -Aktin, GAPDH ve  $\beta$ -2 mikroglobulin için optimize edilen şartlarda RT-PZR yapıldı. Her PCR reaksiyonunda tablo 2.17'de belirtildiği gibi kalıp konulmadığı negatif kontrol yapıldığı gibi, internal primerlerin (GAPDH,  $\beta$ -Aktin ve  $\beta$ -2 Mikroglobulin) kullanıldığı PZR etkinliğinin ölçülebilmesi için pozitif kontrol de yapıldı.

**Tablo 2.15:** ADAMTS-1 için optimum döngü ve PZR Bileşenleri

Bileşen (son konsantrasyon)	ADAMTS-1 40 siklus	N.K.	P.K
cDNA kalıp	4 $\mu$ L	-	1 $\mu$ L
10 X Taq Buffer (1 X)	5 $\mu$ L	5 $\mu$ L	5 $\mu$ L
MgCl <sub>2</sub> (1 mM)	2 $\mu$ L	2 $\mu$ L	2 $\mu$ L
dNTP mix (0,2 mM)	1 $\mu$ L	1 $\mu$ L	1 $\mu$ L
Forward primer (2 ng)	2 $\mu$ L	2 $\mu$ L	1 $\mu$ L
Reverse Primer (2 ng)	2 $\mu$ L	2 $\mu$ L	1 $\mu$ L
Taq polimeraz (Fermentas)	0,5 $\mu$ L	0,5 $\mu$ L	0,5 $\mu$ L
dH <sub>2</sub> O	33,5 $\mu$ L	37,5 $\mu$ L	36,5 $\mu$ L
Son hacim	50 $\mu$ L	50 $\mu$ L	50 $\mu$ L

**Tablo 2.16:** VEGF ve HIF1 için Optimum Döngü ve PZR Bileşenleri (30 siklus VEGF ve HIF-1)

Bileşen (Son Konsantrasyon)	VEGF 30 siklus	NK	HIF1 30 Siklus	NK	PK
cDNA kalıp	1 $\mu$ L	-	1 $\mu$ L	-	1 $\mu$ L

Taq Buffer	5 µL	5 µL	5 µL	5 µL	5 µL
MgCl <sub>2</sub>	2 µL	2 µL	2 µL	2 µL	2 µL
dNTP mix	1 µL	1 µL	1 µL	1 µL	1 µL
Forward primer	1 µL	1 µL	1 µL	1 µL	1µL
Reverse Primer	1µL	1µL	1µL	1 µL	1µL
Taq polimeraz	0,5 µL	0,5 µL	0,5 µL	0,5 µL	0,5 µL
dH <sub>2</sub> O	38,5 µL	39,5 µL	38,5 µL	39,5 µL	38,5 µL
Son hacim	50µL	50µL	50µL	50µL	50µL

**Tablo 2.17:** GAPDH, β-AKTİN VE β-2-Mikroglobulin için PZR Koşulları

<b>Bileşen (Son Konsantrasyon)</b>	<b>GAPDH 18 SİKLUS</b>	<b>β-Aktin 18 SİKLUS</b>	<b>β-2 mikroglobulin 19 SİKLUS</b>
cDNA kalıp	1 µL	1 µL	1 µL
Taq Buffer	5 µL	5 µL	5 µL
MgCl <sub>2</sub>	2 µL	2 µL	2 µL
dNTP mix	1 µL	1 µL	1 µL
Forward primer	1 µL	1 µL	1 µL
Reverse Primer	1 µL	1 µL	1 µL
Taq polimeraz	0,5 µL	0,5 µL	0,5 µL
dH <sub>2</sub> O	38,5 µL	38,5 µL	38,5 µL
Son hacim	50 µL	50 µL	50 µL

**Tablo 2.18: PZR Bileşenleri**

1	94 °C	5 dakika	1 döngü
2	94 °C	30 saniye	Kullanılan primere göre siklus sayısı değişmektedir. (18, 30, 40 vb.)
	50 °C	30 saniye	
	72 °C	30 dakika	
3	72 °C	5 dakika	1 döngü

**Tablo 2.19: Çalışmada Kullanılan Primer Bilgileri**

<b>ADAMTS-1</b>				
Forward	Reverse	Gen Bankası No	Ürün Büyüklüğü	Tm
5'CAGCCCAAGGTTGTAGATG GTA'3	5'TTCACTTCGATGTTG GTGGCTC'3	NM_006988	241 bç	58 °C
<b><math>\beta</math>-2 Mikroglobulin</b>				
Forward	Reverse	Gen Bankası No	Ürün Büyüklüğü	Tm
5'TTTCTGGCCTGGAGGCTATC '3	5'CATGTCTCCATCCCA CTTAACT '3	NM_004048	314 bç	60 °C
<b>GAPDH</b>				
Forward	Reverse	Gen Bankası No	Ürün Büyüklüğü	Tm
5'CCCTTCATTGACCTCAACTA CATGG'3	5'AGTCTTCTGGGTGGC AGTGATGG'3	NM_002046.3	455 bç	55 °C
<b>BETA AKTİN</b>				
Forward	Reverse	Gen Bankası No	Ürün Büyüklüğü	Tm
5'TCCCTGGAGAAGAGCTACG A'3	5'AAGAAAGGGTGTAA CGCAAC'3	NM_001101.3	461 bç	50 °C
<b>VEGF</b>				
Forward	Reverse	Gen Bankası No	Ürün Büyüklüğü	Tm
5'CTACCTCCACCATGCCAAGT '3	5'TCTCTCCTATGTGCT GGCCT'3	NM_0010253 70.1	311 bç	52 °C
<b>HIF-1<math>\alpha</math></b>				
Forward	Reverse	Gen Bankası No	Ürün Büyüklüğü	Tm
5'CCACCTATGACCTGCTTGGT '3	5'TGTCCTGTGGTGA CTGTCC'3	NM_181054.2	269 bç	52 °C



### 2.2.5.6 Gerçek Zamanlı PZR (Q-PZR)

Her deney seti için 2 tekrarlı olarak aşağıda Bioneer gerçek zamanlı PZR kiti (Bioneer Exicycler™ 96 Real-Time Quantitative Thermal Block) kullanılarak belirtilen koşullarda gerçek zamanlı PZR yapıldı. Sonuçlar Livak metoduna göre değerlendirildi. Elde edilen Ct değerleri öncelikli olarak 3 tekrarlı çalışıldığı için her deney grubu için elde edilen değerlerin ortalaması alınmıştır, ardından tek bir kontrol olması hedeflendiği için her zaman dilimine ait kontrol gruplarının ortalaması alınmıştır. Daha sonra kontrol genimiz olan Human-β-mikroglobülin 2 geninin Ct değerleri ile bulunan Ct değerinin formülü aşağıdaki gibidir;

$$Ct_{H-\beta-2} - Ct_{ADAMTS1} = \Delta Ct$$

$$\text{Hedef ct değeri} = 2^{-\Delta Ct}$$

**Tablo 2.20:** Gerçek Zamanlı PZR Bileşenleri

Bileşen (Son konsantasyon)	Miktar
Mix	Liyofilize halde standart
dH <sub>2</sub> O	17 µL
F-Primer (5 ng)	1 µL
R-Primer (5 ng)	1 µL
cDNA	1 µL
Son hacim	20 µL

**Tablo 2.21:** Gerçek Zamanlı PZR Koşulları

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

Erime Eğrisi Analizi		1
----------------------	--	---

## 2.2.6 Protein İle İlgili Teknikler

### 2.2.6.1 Western İçin Deney Kurulması

#### 2.2.6.1.1 Normal koşullar

25 cm<sup>2</sup> flasklarda transfeksiyondan 24 saat önce hücreler yaklaşık 2.000.000 olacak şekilde yayıldı. Transfekte edilecek DNA'lar sırasıyla 10 µg son konsantrasyonda olacak şekilde USF, SP1 ve C/EBPα ve 2M CaCl<sub>2</sub> ayrı bir tüp içinde hazırlandı. Üzerine 2XHepes eklenerek yarım saat prespitasyon için oda sıcaklığında bekletildi. DNA/Kalsiyum fosfat prespitasyonu oluştuktan sonra karışım damla damla kuyucuklara eklendi. Flask 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 ile kaldırıldı ve pellet haline getirilerek western için -80 °C dondurucuda saklandı.

#### 2.2.6.1.2 Hipoksik Koşullar

25 cm<sup>2</sup> flasklarda transfeksiyondan 24 saat önce hücreler yaklaşık 2.000.000 olacak şekilde yayıldı. Transfekte edilecek DNA'lar sırasıyla 10 µg son konsantrasyonda olacak şekilde USF, SP1 ve C/EBPα ve 2 M CaCl<sub>2</sub> ayrı bir tüp içinde hazırlandı. Üzerine 2 X Hepes eklenerek yarım saat prespitasyon için oda sıcaklığında bekletildi. DNA/Kalsiyum fosfat prespitasyonu oluştuktan sonra karışım damla damla kuyucuklara eklendi. Flask hafifçe sallanarak karışımın dağılması sağlandı. 6 saat sonra transfeksiyon solusyonu değiştirilerek, PBS ile kuyular yıkandı ve taze medyum eklendi. 150 µM son konsantrasyonda CoCl<sub>2</sub> eklenerek hücreler hipoksik koşullar için uyarıldı. 24, 48 ve 72 saat sonra hücreler tripsin ile kaldırıldı ve pellet haline getirilerek western için -80 °C dondurucuda saklandı.

### **2.2.6.1.3 Laemli Buffer Kullanılarak Protein Örneklerinin Hazırlanması**

Taze hazırlanmış Laemli bufferdan 300 µL direkt hücrelerin üzerine eklendi ve hücreler ependorfa alındı. Protein ekstraktları 12000 rpmde 5 dakika santrifüj edildi ve bu basamakta ya direkt SDS PAGE uygulaması için kullanıldı yada daha sonra kullanılmak üzere -80 °C’de saklandı.

### **2.2.6.2 SDS PAGE**

Elektroforez aparatları ve cam levhalar su ve %70 etanol ile temizlendi. İlk olarak ayırma jeli yukarıda belirtildiği şekilde hazırlanarak, üst kısımda 3 cm boşluk kalacak şekilde döküldü ve hemen üzerine %90 izopropanol ilave edilerek hava kabarcığı oluşumu engellendi. 30-40 dakika jelin polimerizasyonu için beklendi. Jel polimerize olduktan sonra izopropanol uzaklaştırılarak ddH<sub>2</sub>O ile yüzey yıkandı ve Whatman 3MM kağıdı ile yüzey kurutuldu. Ardından Yığılma jeli döküldü ve kuyu oluşumunu sağlamak için tarak yerleştirildi. Yığılma jelinin polimerizasyonundan sonra, tarak çıkarıldı ve kuyucuklardaki hava kabarcıklarının uzaklaştırılması için yine ince şeritler halinde kesilmiş Whatman 3MM kağıdı kullanıldı. Daha sonra hazırlanan jeller tank içine yerleştirildi.

Örneklerin Yüklenmesi, protein ekstraksiyonu Laemli buffer ile yapıldığı için örnekler yalnız bromophenol blue ile karıştırılarak kuyucuklara yüklendi ve ilk kuyuya 10 µL protein Büyüklük belirteci (Fermentas) yüklendi. Jelin yürütülmesi, 0.1 (w/v) SDS içeren 1X Running Buffer ile tank doldurularak (orta kısım ve alt kısım) jel başına 0,4 amper kullanılarak yaklaşık 90 dakika yürütüldü.

### **2.2.6.3 SDS jelinin Blotlanması**

Proteinlerin elektroforetik transferi için Bio-Rad Laboratories, Bio-Rad Trans Blot sistemi kullanıldı. Proteinlerin transferi için PVDF (Millipore) membranlar kullanıldı. Kısaca, jeller cam levhalar arasından çıkarılır, yığılma jeli kesilerek uzaklaştırıldı ve jel transfer buffer içine alınarak dengelenmesi için oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi. Whatman 3MM kağıt ve PVDF membranlar jel ile aynı

boyutlarda kesilerek hazırlandı. Bu sırada sünger pedler ve transfer aparatları da transfer buffer içine alındı. Daha sonra sandviç hazırlandı. Bunun için transfer kasedi arasına sünger, Whatman kağıdı, jel, membran, Whatman kağıdı, sünger olacak şekilde sandviç hazırlandı. Bu sırada hava kabarcığı kalmamasına dikkat edildi. Daha sonra kaset, transfer buffer ile dolu olan blot tankına yerleştirildi ve 100 volt akımda 60 dakika transfer yapıldı.

#### **2.2.6.4 Proteinlerin Belirlenmesi**

Proteinlerin transfer olduğu PVDF membranlar ilk olarak 20 mL bloklama çözeltisinde (%5 (w/v) yağsız süt tozu ve %0.1(v/v) Tween20 içeren 1X TBS ) 1 saat horizontal çalkalayıcıda oda sıcaklığında inkübe edildi. Süre sonunda bloklama çözeltisi uzaklaştırılarak 5 dakikalık sürelerle 3 kez membran yıkandı, bunun için %0.1 (v/v) Tween20 içeren 1X TBS kullanıldı. Membran primer antikor ile 1-1.5 saat oda sıcaklığında inkübe edildi. Daha sonra sekonder antikor ile bir saat oda sıcaklığında inkübasyon yapıldı ve görüntülemeye geçildi.

Membranlar 1-2 dakika arasında ECL sistemi Pierce ECL (Western Blotting Substrate-Thermo) substratla muamele edildi. Reagent A ve Reagent B çözeltilerinden ayrı ayrı 1,5 ml alınarak membran üzerine uygulandı. Ardından karanlık odaya geçilerek membran filme aktarıldı. Membran film üzerinde 10sn, 15 sn, 30 sn ve 60 sn aralıklarla bastırıldı. Film yıkama makinesine verilerek sonuçlar görünür hale getirildi.

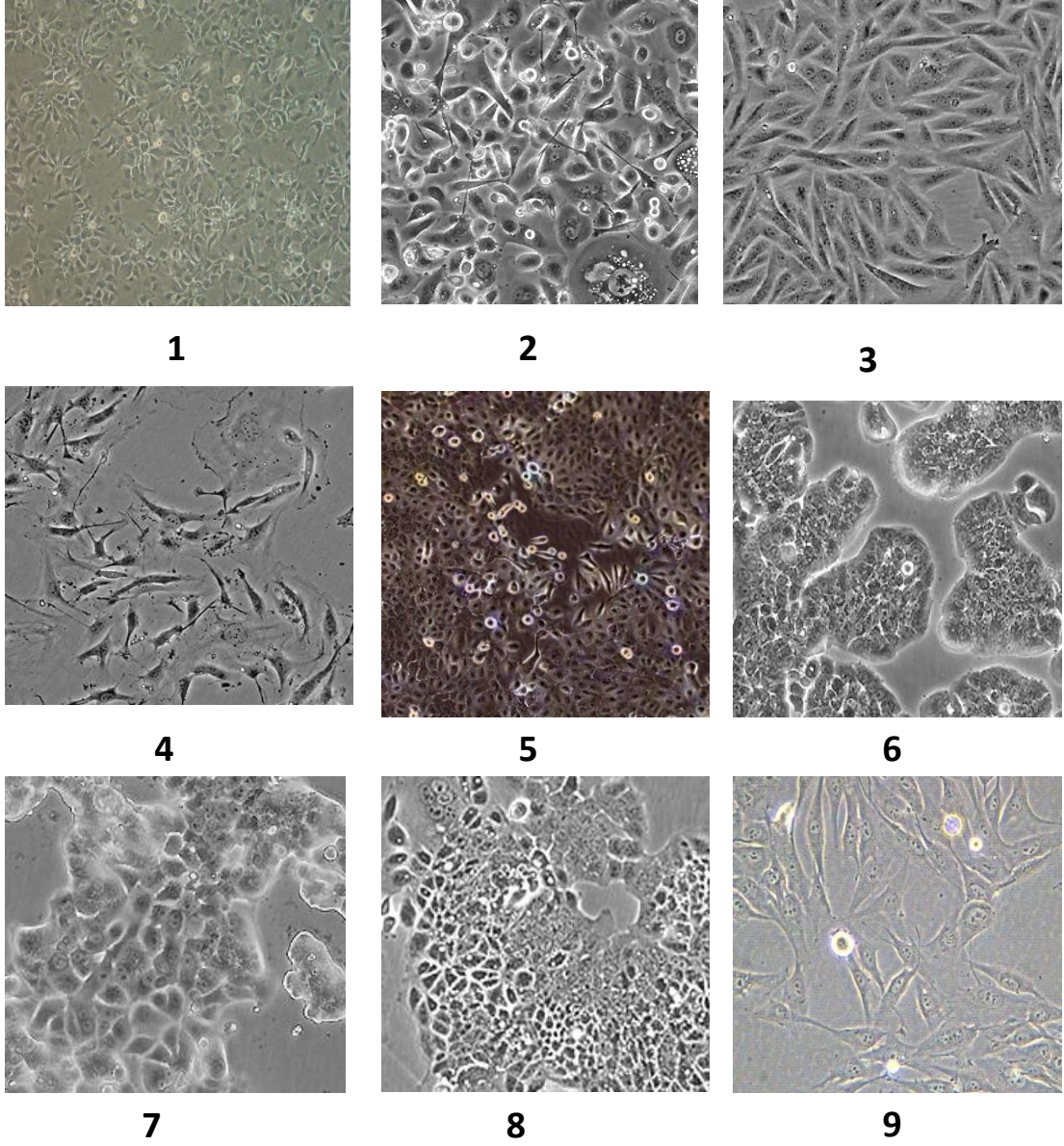
#### **2.2.7 İstatistiksel Analiz**

Deney sonuçlarının istatistiksel analizleri tek yönlü ANOVA testi (Minitab15 versiyonu) kullanılarak gerçekleştirildi.  $P \leq 0.05$  değeri anlamlı olarak kabul edildi.

### **3. BULGULAR**

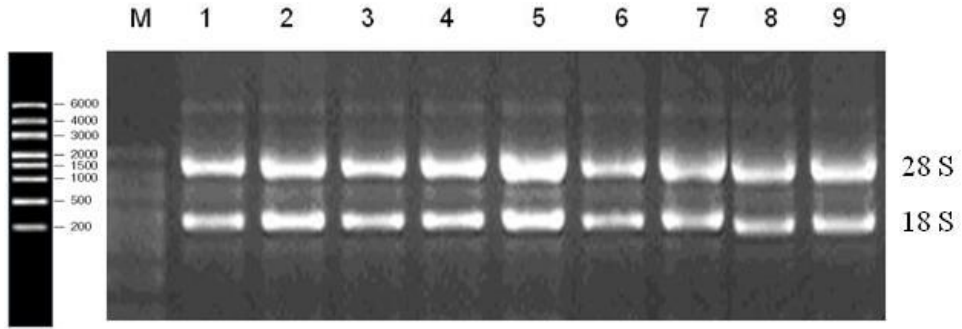
#### **3.1 Farklı Hücre Hatlarında ADAMTS-1 Ekspresyonunun Belirlenmesi**

İlk olarak ADAMTS-1 geninin ekspresyon profilinin belirlenmesi amacıyla farklı doku modelline ait hücreler büyütülerek RNA izolasyonları yapıldı. Semikantitatif RT-PZR ile bu hücre hatlarında ADAMTS-1 ifade olup olmadığı gösterildi. Çalışmamızda farklı kanser tiplerinde ekspresyonunun değiştiği bilinen ADAMTS-1'in farklı dokulara ait kanser hücre hatlarındaki ve normal dokulardaki ekspresyon durumunu incelemek için Hep3B (İnsan karaciğer karsinomu), MCF7 (İnsan meme karsinomu), PC3 (İnsan prostat karsinomu), DU145 (İnsan prostat karsinomu), HT-29 (İnsan kolon karsinomu), MG63 (İnsan kemik karsinomu), Saos-2 (İnsan kemik karsinomu), Ishikawa (human endometrial adenokarsinom) ve HUVEC (İnsan umbilikal venlerinden elde edilen endotel hücre) hücre hatları kullanıldı. Bu hücreler bölüm 2.2.4 belirtildiği gibi büyütüldü ve Bölüm 2.2.5 belirtilen şekilde total RNA izolasyonları yapıldı. Çalışmamızda ADAMTS-1 ekspresyon paternini belirlemek amacıyla ADAMTS-1 genine spesifik olarak dizayn edilen ve ADAMTS-1 geninin ORF (NM\_006988 erişim numaralı ADAMTS-1 mRNA dizisi) bölgesinde 2475-2719 nükleotitleri arasındaki bölgenin çoğaltılmasını sağlayan primerlerin tasarımı bölüm 2.2.3.1'de belirtildiği şekilde yapıldı. Primer bilgilerine tablo 1.21'de ulaşılabilir. Ayrıca pozitif kontrol amacıyla  $\beta$ -2-mikroglobulin primerleri kullanıldı.

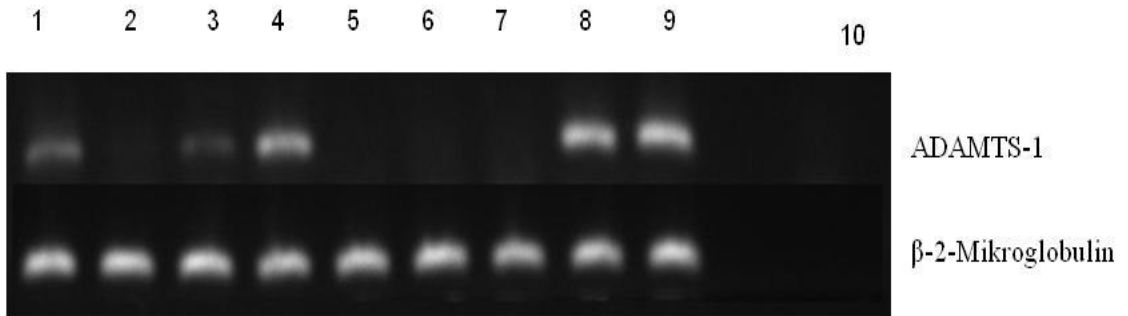


**Şekil 3.1:** İnsan ADAMTS-1 geninin ekspresyonu belirlemek amacıyla kullanılan hücre hatlarının resimleri: (1) Hep3B (İnsan Karaciğer Karsinomu), (2) PC3 (İnsan Prostat Karsinomu), (3) Saos-2 (İnsan Kemik Karsinomu), (4) HUVEC (İnsan umbilikal venlerinden elde edilen endotel hücre), (5) DU145 (İnsan Prostat Karsinomu), (6) HT-29 (İnsan Kolon Karsinomu), (7) MCF7 (İnsan Meme Karsinomu), (8) Ishikawa (human endometrial adenokarsinom), (9) MG63 (İnsan Kemik Karsinomu).

Hücre kültürü ortamında bölüm 2.2.4’de anlatıldığı şekilde büyütülen hücre soylarından total RNA izolasyonları yapılarak ve cDNA eldesi yapıldı. Total RNA izolasyonu ve cDNA sentezi bölüm 2.2.5’de belirtildiği şekilde yapıldı. RNA miktarı ve saflığı RNA elektroforezi (Şekil 3.2) ve spektroskopik olarak belirlendi. RT reaksiyonlarında 1000 ng RNA kullanılarak cDNA eldesi yapıldı. Pozitif kontrol olarak insan- $\beta$ -2-mikroglobulin primerleri kullanıldı.  $\beta$ -2-mikroglobulin geni insan hücrelerinde sürekli olarak ekspre olan bir gen dir ve RT-PZR şartlarının normalizasyonu ve pozitif kontrol olarak kullanıldı. Uygun PZR koşulu için yapılan optimizasyonlar sonucunda en iyi bant kalınlığının elde edildiği şartlarda PZR yapılarak sonuçlar agaroz jelde yürütüldü ve UVP görüntüleme sistemi ile görüntülendi (Şekil 3.3). Sonuç olarak ADAMTS-1’in Hep3B, PC3, MG-63, SAOS, HUVEC, ISC hücre hatlarında ekspre edildiği ancak MCF-7, DU145 ve HT-29 hücre hatlarında ifade edilmediği belirlendi.



**Şekil 3.2:** RNA agaroz jel elektroforez görüntüsü M: RNA Büyüklük belirteci, 1-9: Farklı RNA örnekleri



**Şekil 3.3:** Farklı hücre hatlarında ADAMTS-1 ekspresyon analizi agaroz jel elektroforez görüntüsü; 1: Hep3B, 2: PC3, 3: Saos-2, 4: HUVEC, 5: Du145, 6: HT-29, 7: MCF-7, 8: Ishikawa, 9: MG-63, 10: Negatif Kontrol, Üst jel: ADAMTS-1, Alt jel:  $\beta$ -2-mikroglobulin

### **3.2 Hep3B Hücrelerinde Kimyasal İndüklenmiş Hipoksik Koşulların Oluşturulması ve ADAMTS-1 mRNA Seviyesinin Belirlenmesi**

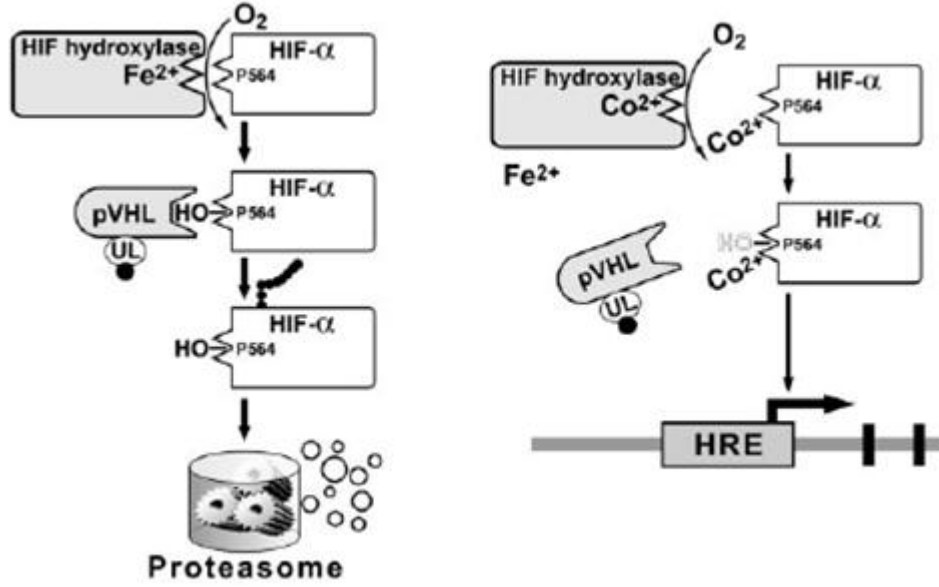
2009 yılında Hatipoğlu ve arkadaşlarınca ADAMTS-1 erken hipoksik koşullarda indüklenen bir gen olduğu HUVEC hücrelerinde gösterilmiştir. Endotelial hücrelerde, (HUVEC, HPAEC ve HMEC) hipoksiya durumunda, ADAMTS-1 mRNA ve protein ekspresyon seviyesi hızlı bir şekilde arttığı fakat diğer hücre tiplerinde (ARPE-Retinal Pigment epitelyum) artmadığı yaptıkları çalışma ile gösterilmiştir. İlginç bir şekilde ADAMTS-1'in hipoksiya ile indüklenmesi geçici bir durum olmasına rağmen HUVEC hücrelerinde, VEGF'ün hipoksiya ile indüklenmesi zamana bağlı olarak artmaktadır. Endotelial hücrelerde ADAMTS-1 hipoksiya durumunda geçici olarak indüklendiği ve HIF-1'in bağlanması aracılığıyla transkripsiyonu yapıldığı tespit edilmiştir [6]. Literatür incelendiğinde çalışmamızın model hücre hattı olan Hep3B hücrelerinde ADAMTS-1'in hipoksi durumunda indüklenip indüklenmediği ile ilgili veriye rastlanmamıştır. Bu nedenle çalışmamızda benzer metod ile hipoksi durumu oluşturup bu koşullar altında ADAMTS-1 ekspresyon seviyesini incelendi. Bu amaçla çalışmamızda kimyasal hipoksi oluşturabileceğimiz kimyasal olan  $\text{CoCl}_2$  kullanıldı.

#### **3.2.1 Kimyasal Hipoksi Oluşturulması**

Kimyasal hipoksi modeli memeli hücrelerinde düşük oksijen koşullarındaki biyokimyasal ve moleküler cevabı oluşturduğu için düşük oksijen koşullarını taklit etmede sıklıkla kullanılmaktadır [82-86]. Hipoksi;  $\text{O}_2$  oranının azalmasıdır. Hipoksiyaya cevap olarak hücreler bu duruma adapte olabilmek için anjiyogenez, eritrosit üretimi, hücre hayatta kalması ve metabolizmayı kapsayan genlerin transkripsiyon seviyelerini değiştirirler. Bu koşullarda HIF-1 ve HIF-2 aktive olur. HIF-1 iki alt ünitelerden oluşmaktadır; HIF-1 $\alpha$  ve HIF-1 $\beta$ . HIF-1 $\alpha$ ,  $\text{O}_2$ 'le regüle olan domain içermektedir. Normal koşullarda HIF-1 $\alpha$  alt ünitesi prolin hidroksilazlar tarafından hidroksillenmektedir.  $\text{O}_2$  bağımlı degradasyon domaininde korunmuş 2 prolin residüsü bulunmaktadır. Nükleusta HIF-1 $\beta$  ile dimerleşir ve spesifik HREs (Hipoksi Response Element) bağlanır. Yaklaşık olarak tüm genlerin %2.6'sı HIF-1 aktivasyonu ile regüle olduğu bilinmektedir.  $\text{CoCl}_2$ , HIF-1'i normal oksijen



koşullarında inhibe eden prolin hidroksilazlara bağlanarak onların aktivitesini durdurur. Böylece HIF-1 hidroksillenmez ve aktif hale geçer. Aktif hale geçen HIF-1 oksijen yetersizliğindeki seviyesine ulaşır ve hipoksi ile regüle olan diğer genlerin transkripsiyonlarını etkiler [87, 88].



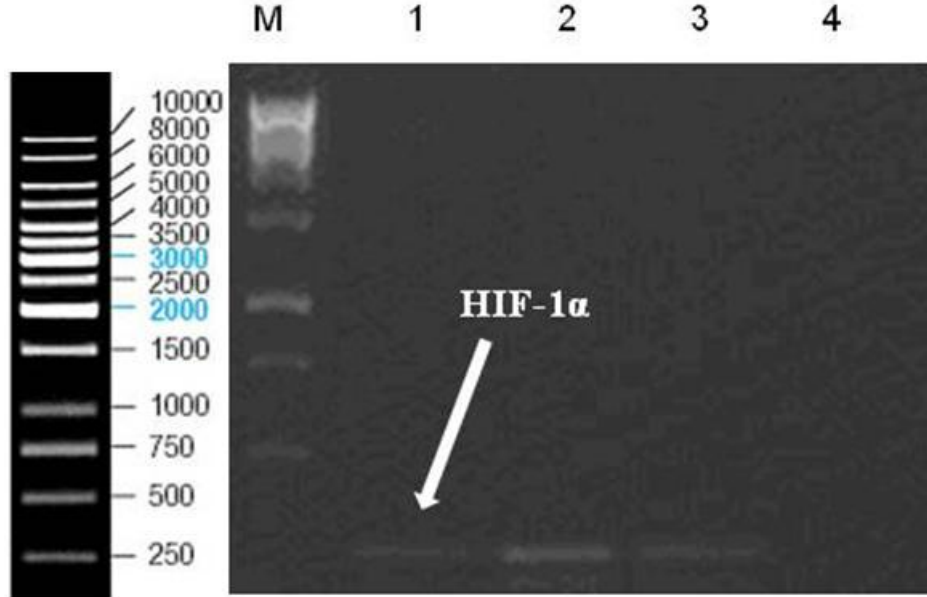
**Şekil 3.4:**  $\text{CoCl}_2$  ile kimyasal hipoksi modeli [88]

Bu basamakta yürütülen çalışmalar 3'e ayrılmaktadır;

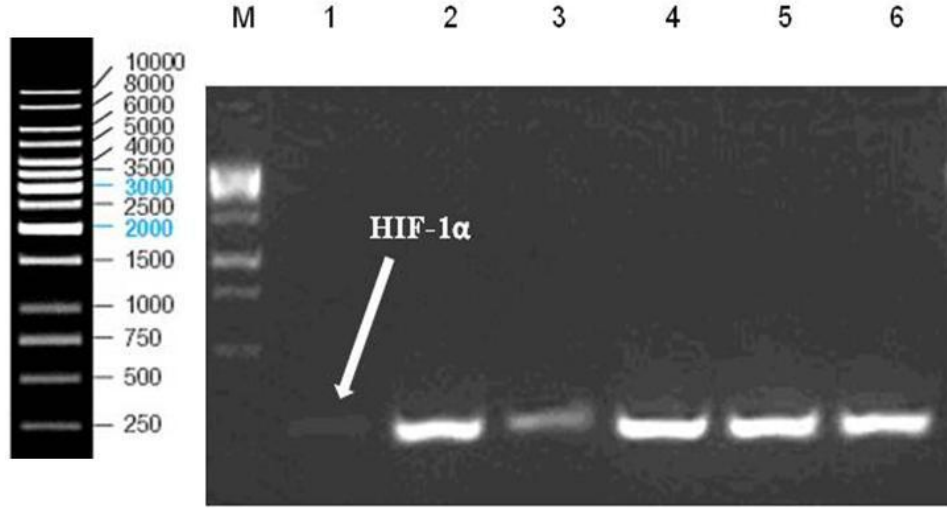
1. Hep3B Hücre hattında hipoksi oluşturularak HIF1- $\alpha$  alfa seviyesi ile doğrulanması
2. Hipoksik koşullarda kullanılacak internal kontrolün seçimi
3. Hipoksik koşullarda ADAMTS-1 ifadesinin araştırılması

### 3.2.1.1 Hep3B hücrelerinde kimyasal indüklenmiş hipoksik koşulun doğrulanması

Çalışmamızda Hep3B hücre hattında  $\text{CoCl}_2$  uygulaması ile hipoksik koşul oluşturuldu. Hipoksik model için  $25\text{cm}^2$  flaklara 24 saat önce hücreler yaklaşık 2.000.000 olacak şekilde yayıldı. 24 saat sonunda hipoksik model için  $150\ \mu\text{M}$  son konsantrasyonda  $\text{CoCl}_2$  eklenerek hücreler hipoksik koşullar için uyarıldı. Normal koşullar için herhangi bir uygulama yapılmadı. 24, 48 ve 72 saat sonra hücreler tripsin ile kaldırılır ve pellet haline getirilerek RNA izolasyonları yapıldı. cDNA eldesi yapıldıktan sonra  $1\text{mM}$   $\text{MgCl}_2$  ve  $1\ \mu\text{L}$  cDNA ile HIF-1 primerleri kullanılarak PZR şartları optimize edildi. PZR sonucu %2'lik agaroz jelde yürütüldü ve analizler için uygun PZR döngüsüne karar verildi (Şekil 5). Sonuç olarak  $1\text{mM}$   $\text{MgCl}_2$ ,  $1\ \mu\text{L}$  cDNA ve 30 siklusun uygun olduğuna karar verildi. 24 saat , 48 ve 72 saat zaman dilimlerinde hipoksik koşul oluşturulmuş hücrelerde ve normal hücrelerde incelendi. HIF-1'in hipoksik koşullarda artmış olduğu doğrulandı. Böylece mRNA düzeyinde hipoksik koşul teyit edildi (Şekil 3.6).



**Şekil 3.5 :** HIF-1 (269 bp) için PCR optimizasyonları M: Büyüklük belirteci, 1: 30 siklus HIF-1, 2: 35 siklus HIF-1, 3: 40 siklus HIF-1, 4: Negatif kontrol



**Şekil 3.6:** CoCl<sub>2</sub> ile hipoksik koşul oluşumunun HIF-1 (269 bç) seviyesi ile kontrolü için yapılan PZR sonucu; M: Büyüklük belirteci, 1: 24 saat kontrol grubundan HIF-1, 2: 24 saat CoCl<sub>2</sub> uygulanan gruptan HIF-1, 3: 48 saat kontrol grubundan HIF-1, 4: 48 saat CoCl<sub>2</sub> uygulanan gruptan HIF-1, 5: 72 saat kontrol grubundan HIF-1, 6: 72 saat CoCl<sub>2</sub> uygulanan gruptan HIF-1

### 3.2.2 Normal ve Hipoksik Koşullarda Kullanılacak İnternal Kontrolün Seçimi

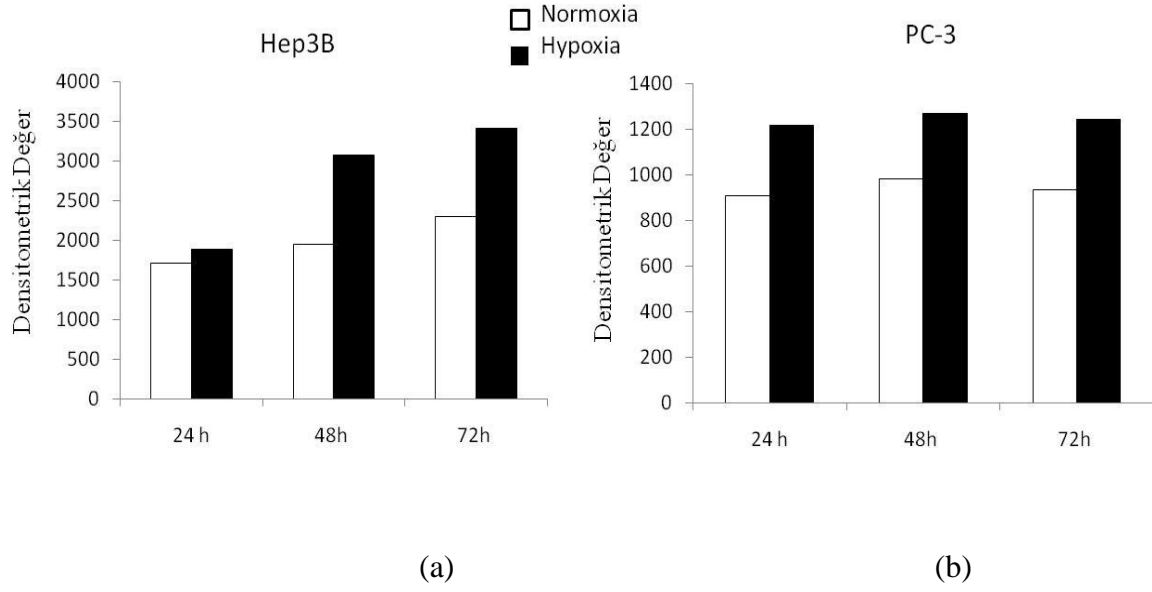
Gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz (GAPDH), beta-aktin ( $\beta$ -Aktin) ve beta-2-Mikroglobulin ( $\beta$ -2-Mikroglobulin) RNA analizlerinde sıklıkla normalizasyon amaçlı kullanılan internal kontrol genleridir. İdeal olan normalizasyon geninin deneysel şartlardan etkilenmemesi RNA analizlerinin hassasiyeti açısından oldukça önemlidir. Gen ekspresyonu karşılaştırma çalışmalarında en iyi sonuç internal kontrolün örnek içerisinde fazla ve sabit oranda bulunmasıyla elde edilir. Özellikle farklı hücre tiplerinin kullanımı, farklı gelişim basamakları veya farklı deneysel uygulamaların seçildiği durumlarda kullanılan internal kontrolün bu şartlardan etkilenmemesi gerekmektedir. Ancak ne yazık ki tek bir internal kontrol geninin tüm bu şartlardan bağımsız olarak ekspresyon seviyesini koruması oldukça güçtür. Bu nedenle çalışmanın dizaynı aşamasında seçilecek olan internal kontrol genin uygulanacak olan deneysel şartlardan etkilenip etkilenmediği mutlaka test edilmelidir. Bu yüzden, normalizasyonda kullanılan bazı genlerin hipoksik koşullarda mRNA düzeyinde ifadelerinin belirlenmesi için semikantitatif RT-PZR çalışmaları yapıldı. Real Time çalışmalarına geçmeden önce internal kontrol olarak

kullanılacak olan GAPDH,  $\beta$ -Aktin ve  $\beta$ -2 mikroglobulin mRNA seviyeleri normal ve hipoksik koşullardaki hem model olarak kullandığımız Hep3B hücrelerinde incelendi. Sonuçların hücreye spesifik olup olmadığı da farklı bir hücre olan PC3 hücrelerinde analiz edildi.

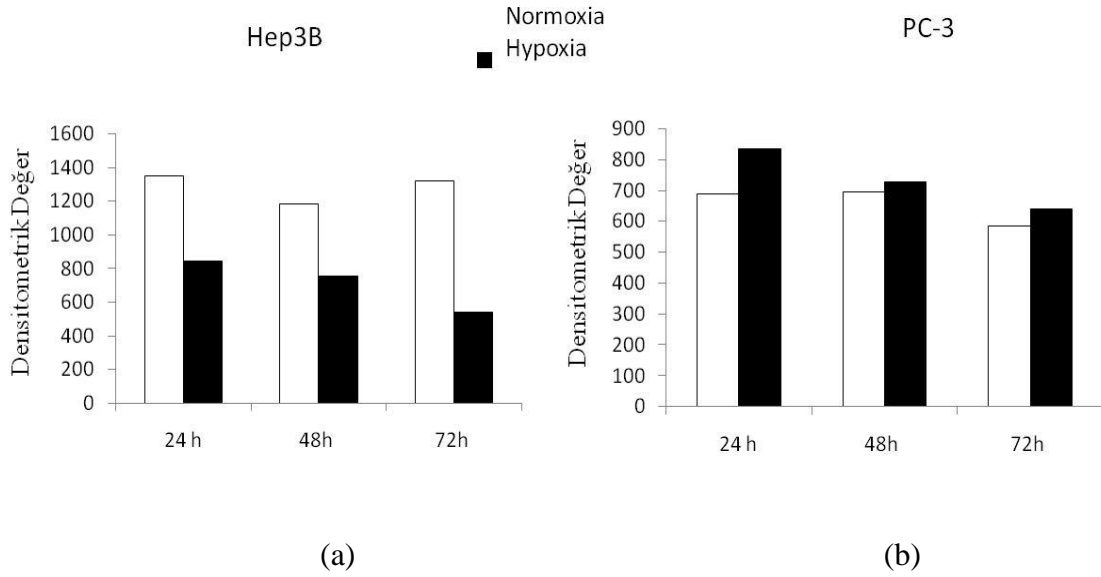
Bu amaçla 25 cm<sup>2</sup> flasklarda transfeksiyondan 24 saat önce hücreler yaklaşık 2.000.000 olacak şekilde yayıldı. 24, 48 ve 72 saat sonra hücreler tripsin ile kaldırıldı ve pellet haline getirilerek RNA izolasyonları yapıldı. Yine hipoksik model için 25cm<sup>2</sup> flasklarda transfeksiyondan 24 saat önce hücreler yaklaşık 2.000.000 olacak şekilde yayıldı. Hipoksik model için 150  $\mu$ M son konsantrasyonda CoCl<sub>2</sub> eklenerek hücreler hipoksik koşullar için uyarıldı. 24, 48 ve 72 saat sonra hücreler tripsin ile kaldırıldı ve pellet haline getirilerek RNA izolasyonları yapıldı. cDNA eldesi yapıldıktan sonra 1 mM MgCl<sub>2</sub> ve 1  $\mu$ L cDNA ile aşağıdaki herbir internal kontrol için optimize edilen şartlarda PZR yapıldı. PZR sonucu %2'lik agaroz jelde yürütüldü ve densitometrik analizleri yapıldı.

Hipoksik durumların karşılaştırılması amacıyla normal oksijen durumlardaki bu zaman aralıklarındaki hücreler kullanıldı. Buna göre her iki hücre hattında CoCl<sub>2</sub> uygulamasının normal koşullara göre GAPDH mRNA seviyesinde artan değişikliğe sebep olduğu gözlenmiştir (Şekil 3.7 a ve 3.7 b). Hep3B hücrelerinde bu artışın zamana bağlı olarak arttığı fakat PC3'lerde zaman bağımlı olmadığı tespit edildi. Buna göre Hep3B hücre hattında CoCl<sub>2</sub> uygulamasının  $\beta$ -Aktin mRNA seviyesinde azalmaya sebep olduğu fakat PC3 hücrelerinde herhangi bir etki görülmediği belirlendi (Şekil 3.8 a ve 3.8 b). CoCl<sub>2</sub> ile oluşturulan hipoksik koşullarda  $\beta$ -2 Mikroglobulin seviyesi diğer genlere oranla değişimi her iki hücre hattında da en az olduğu tespit edildi.

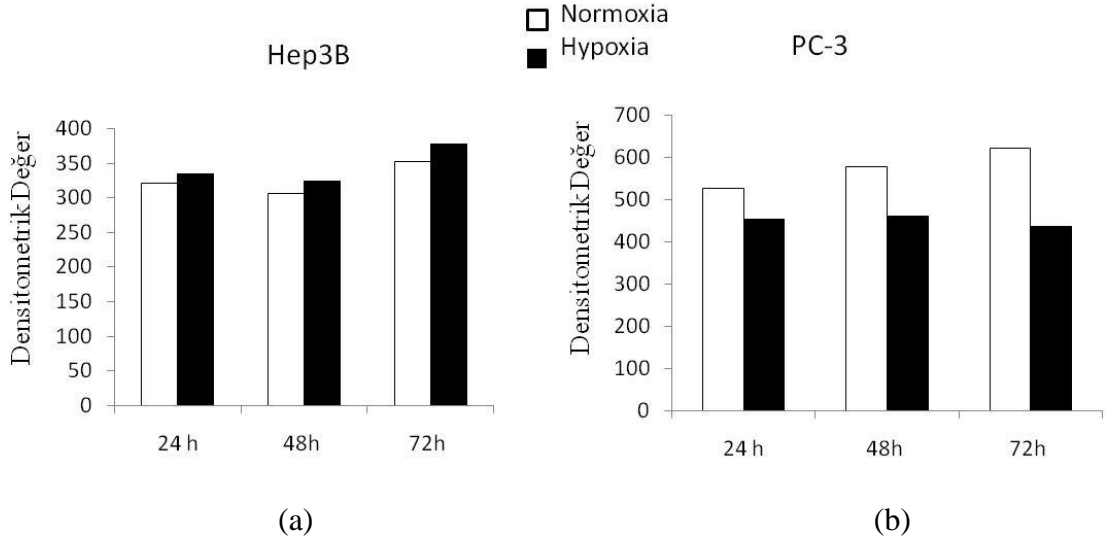
$\beta$ -2 Mikroglobulin seviyesi ayrıca Hep3B hücre hattında gerçek zamanlı PZR analizleri ile de kontrol edildi. Gerçek zamanlı PZR analizleri sonucu Hep3B hücre hattında CoCl<sub>2</sub> ile oluşturulan hipoksik koşullarda  $\beta$ -2 Mikroglobulin seviyesi diğer genlere oranla değişiminin az olduğu tespit edildi.



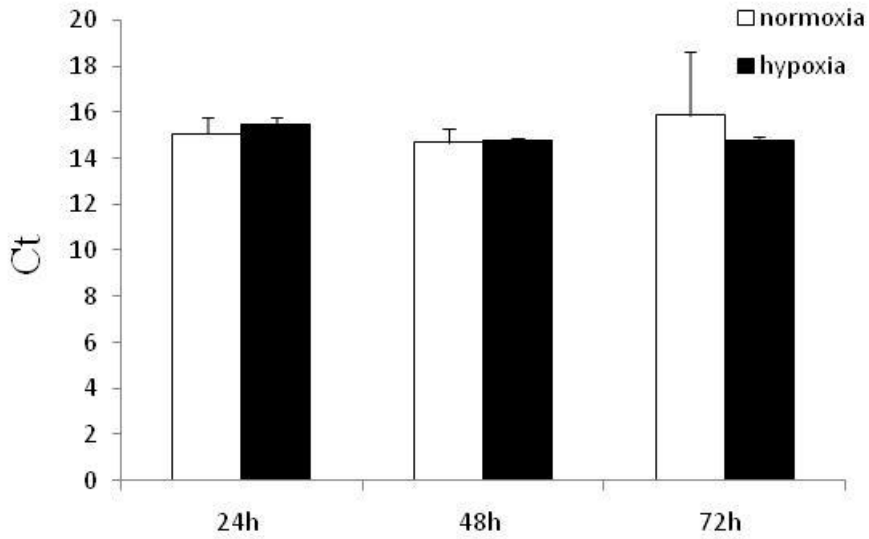
**Şekil 3.7:** (a) Hep3B hücre hattında normal ve hipoksik koşullarda GAPDH ekspresyonu (N: Normal koşullar, H: Hipoksik koşullar) (b) PC3 hücre hattında normal ve hipoksik koşullarda GAPDH ekspresyonu (N: Normal koşullar, H: Hipoksik koşullar)



**Şekil 3.8:** (a) Hep3B hücre hattında normal ve hipoksik koşullarda  $\beta$ -aktin ekspresyonu (N: Normal koşullar, H: Hipoksik koşullar) (b) PC3 hücre hattında normal ve hipoksik koşullarda  $\beta$ -aktin ekspresyonu (N: Normal koşullar, H: Hipoksik koşullar)



**Şekil 3.9:** (a) Hep3B hücre hattında normal ve hipoksik koşullarda  $\beta$ -2 Mikroglobulin ekspresyonu (N: Normal koşullar, H: Hipoksik koşullar) (b)PC3 hücre hattında normal ve hipoksik koşullarda  $\beta$ -2 Mikroglobulin ekspresyonu (N: Normal koşullar, H: Hipoksik koşullar)

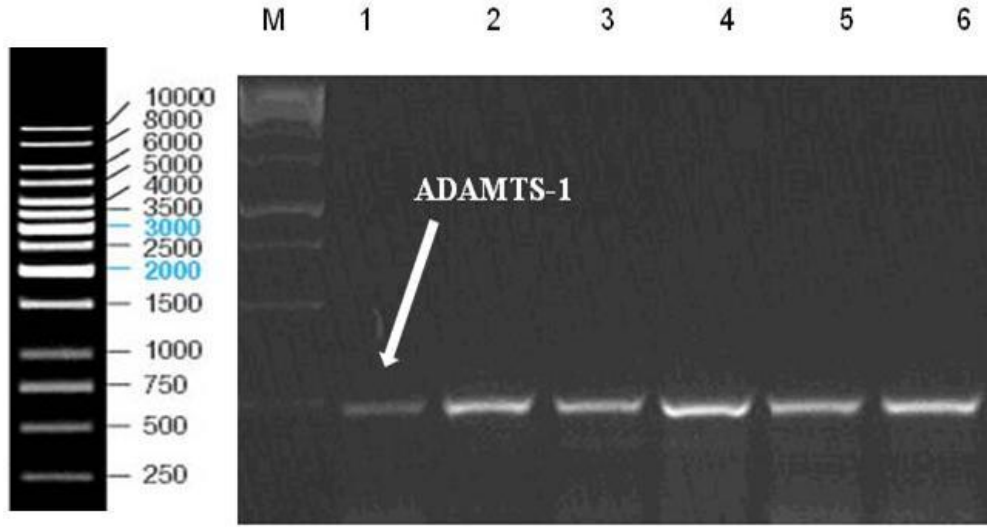


**Şekil 3.10:** Hep3B hücre hattında normal ve hipoksik koşullarda  $\beta$ -2 Mikroglobulin ekspresyonu gerçek zamanlı PZR analizi

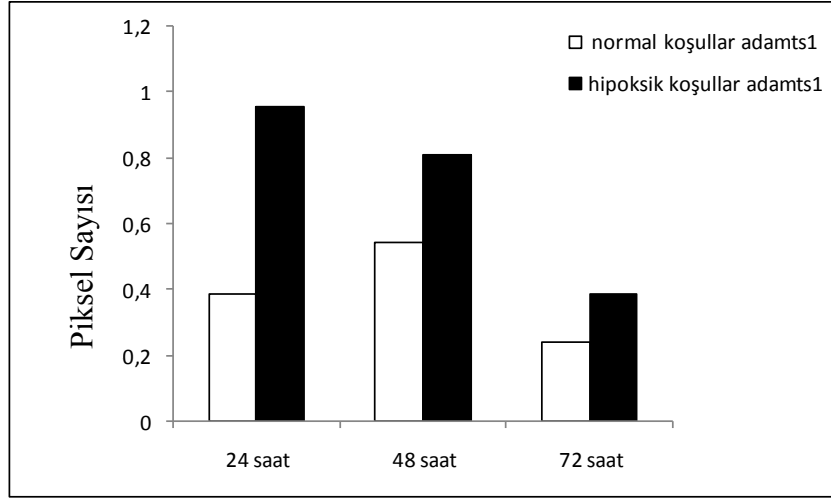
### 3.2.3 Hep3B Hücrelerinde Hipoksik Koşullarda ADAMTS-1 Ekspresyonu

2009 yılında Hatipoğlu ve arkadaşları tarafından hipoksiyanın ADAMTS-1'i indükleyip indiklemediği ve regülasyon mekanizması araştırılmıştır. Endotelial

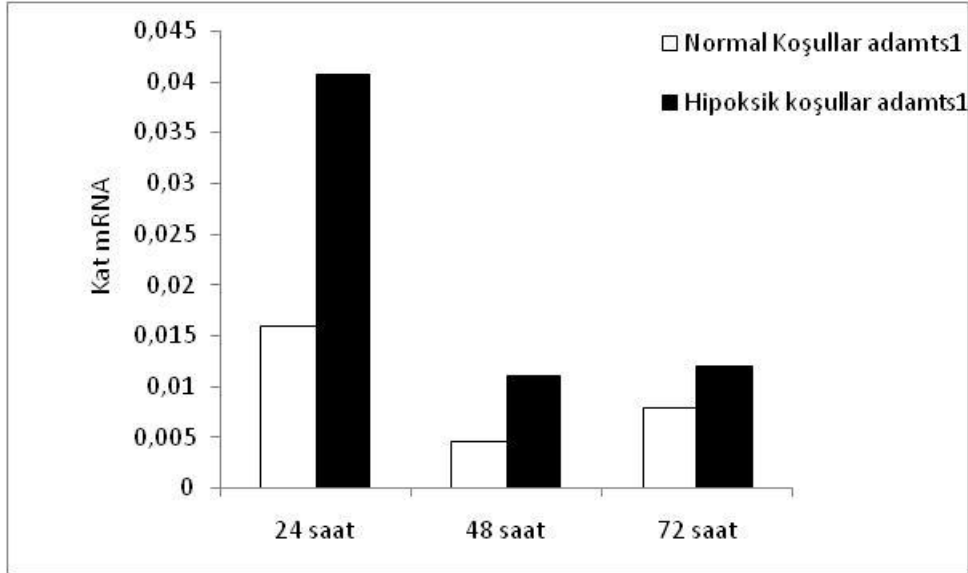
hücrelerde,  $\text{CoCl}_2$  ile indüklenen hipoksiya durumunda, ADAMTS-1 mRNA ve protein ekspresyon seviyesi hızlı bir şekilde arttığı tespit edilmiştir. İlginç bir şekilde ADAMTS-1'in hipoksiya ile indüklenmesi geçici bir durum olmasına rağmen HUVEC hücrelerinde, VEGF'in hipoksiya ile indüklenmesi zamana bağlı olarak artmaktadır. Endotelial hücrelerde ADAMTS-1 hipoksiya durumunda geçici olarak indüklendiği ve HIF-1'in bağlanması aracılığıyla transkripsiyonu yapıldığı tespit edilmiştir. Sonuç olarak ADAMTS-1'in yeni bir erken hipoksiya ile regüle edilen bir gen olduğu gösterilmiştir. Çalışmada benzer metod ile hipoksik koşul oluşturdu ve bu koşullarda ADAMTS-1 ekspresyon seviyesinin artıp artmadığını RT-PZR tekniği (Şekil 3.11-3.12) ve gerçek zamanlı PZR teknikleri (Şekil 3.13) ile incelendi. Bu amaçla öncelikle spesifik ADAMTS-1 primerler ile optimizasyon çalışmaları yapıldı. Uygun koşulların tespitinden sonra normal ve hipoksik koşullardan elde edilen cDNA'lar kullanılarak PZR reaksiyonları gerçekleştirildi ve sonuçlar %2'lik agaroz jelde yürütüldü.



**Şekil 3.11:**  $\text{CoCl}_2$  ile oluşturulan hipoksik koşullarda ADAMTS-1 ekspresyonu; M: Büyüklük belirteci, 1: 24 saat kontrol grubundan ADAMTS-1, 2: 24 saat  $\text{CoCl}_2$  uygulanan gruptan ADAMTS-1, 3: 48 saat kontrol grubundan ADAMTS-1, 4: 48 saat  $\text{CoCl}_2$  uygulanan gruptan ADAMTS-1, 5: 72 saat kontrol grubundan ADAMTS-1, 6: 72 saat  $\text{CoCl}_2$  uygulanan gruptan ADAMTS-1



**Şekil 3.12:** Normal ve hipoksik koşullar semi kantitatif RT-PZR analizi ile ADAMTS-1 mRNA ifadesi densitometrik analizi



**Şekil 3.13:** Normal ve hipoksik koşullar gerçek zamanlı PZR analizi ile ADAMTS-1 mRNA ifadesi densitometrik analizi

### 3.3 İnsan ADAMTS-1 Geninin Transkripsiyonel Regülasyonu

ADAMTS-1 transkripsiyonel regülasyonunun aydınlatılması ile ilgili olarak, ADAMTS-1 promotor bölgesi klonlamak amacıyla kandan genomik DNA izolasyonu yapıldı. Daha sonra sırasıyla genin -1545/+51 promotor bölgesinin PZR ile çoğaltılması ve pGEMT içerisine klonlanması ve dizi analizi çalışmaları



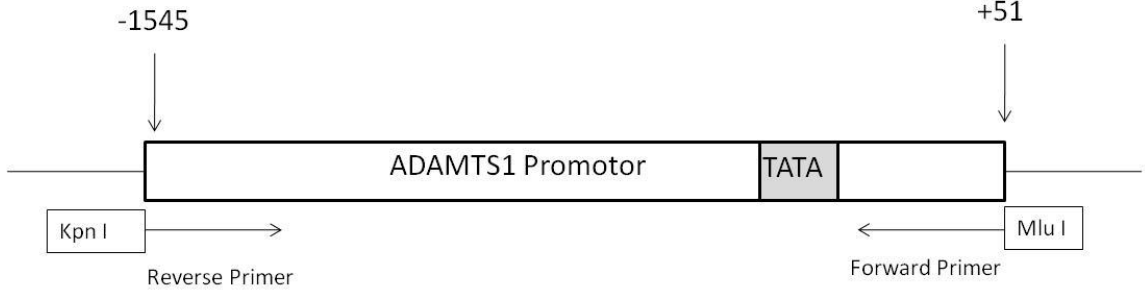
gerçekleştirildi. Daha sonra sırasıyla pGEMT Easy ve lusiferaz vektörü olan pMetLuc vektörlerine alt klonlamaları gerçekleştirildi. ADAMTS-1 promotor bölgesi için biyoinformatik çalışmalar ile promotordaki muhtemel transkripsiyon faktörü bağlanma bölgeleri belirlendi. Bu basamakta seçilen transkripsiyon faktörleri olan SP1, USF ve C/EBP $\alpha$ 'nın ADAMTS-1 geni üzerinde olan etkileri araştırıldı. Transkripsiyon faktörlerinin etkileri promotor parçaları üzerinde, mRNA düzeyinde ve protein düzeyinde araştırıldı. mRNA ve protein düzeyinde olan etki ayrıca hipoksik koşullarda da araştırıldı. Öncelikle promotor parçalarının bazal transkripsiyonel aktiviteleri belirlendi ve daha sonra ko-tranfeksiyonlara geçilerek transkripsiyon faktörlerinin bazal aktiviteye olan etkileri salınan sistem lusiferaz ve alkalin fosfataz aktiviteleri ile belirlendi. Seçilen transkripsiyon faktörlerinin ADAMTS-1 mRNA düzeyine olan etkileri kantitatif PZR ile protein düzeyindeki etkileri ise western blot analizleri ile belirlendi. Uygulanan basamakların akış diyagramı Şekil 1.7'de takip edilebilir.

### **3.3.1 ADAMTS-1 Promotorunun Klonlanması**

#### **3.3.1.1 Primerlerin Tasarlanması**

ADAMTS-1 geninin promotor kısmının klonlanması amacıyla, genin tüm nükleotit dizisi NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) sayfasından bulundu [Gen Bankası no: NT 011512 ] ve bu dizi üzerinden promotorun 1596 baz çiftlik kısmı için primerler tasarlandı (Şekil 3.14). Tasarlanan forward ve reverse primerler databanklarda bulunan DNA sekansları ile BLAST yapılarak ADAMTS-1 geni ile en yüksek benzerliği gösterdiği tespit edildi.

Primer hazırlanması sırasında hairpin oluşumu, Tm değerlerinin hesaplanması, %GC içeriğinin bulunması gibi değişkenler Oligo Analyzer 3.0 programı kullanılarak hesaplandı ([http:// www. idtdna. Com /analyzer/ Applications/OligoAnalyzer](http://www.idtdna.com/applications/OligoAnalyzer/)).



**Şekil 3.14:** İnsan ADAMTS-1 promotorunun klonlanmasında kullanılan primerlerin bağlanma yerlerinin şematik gösterimi

### 3.3.1.2 İnsan ADAMTS-1 Promotorunun pGEMT Vektörüne Klonlanması

Bölüm 2.2.3.2 belirtilen metoda göre kandan genomik DNA izolasyonu yapıldı. İzole edilen DNA %0,8 lik agaroz jelde yürütülerek görüntülendi (Şekil 3.15). 1596 bç için 61<sup>0</sup> C, pozitif kontrol olan GAPDH primerleri için 55<sup>0</sup> C Gradient PZR kullanılarak PZR çalışıldı. PZR programı 1 mM, 2 mM ve 4 mM MgCl<sub>2</sub> kullanılarak ve 1 µL kalıp DNA ile yapıldı. Pozitif kontrol olarak GAPDH ve Negatif kontrol de çalışıldı. Sonuçlar %0,8'lik agaroz jelde 1 kb büyüklük belirteci (Fermentas) kullanılarak yürütüldü (Şekil 3.16).



**Şekil 3.15:** Genomik DNA izolasyon sonucu jel görüntüsü (Büyüklik belirteci: Fermentas SM 0311)

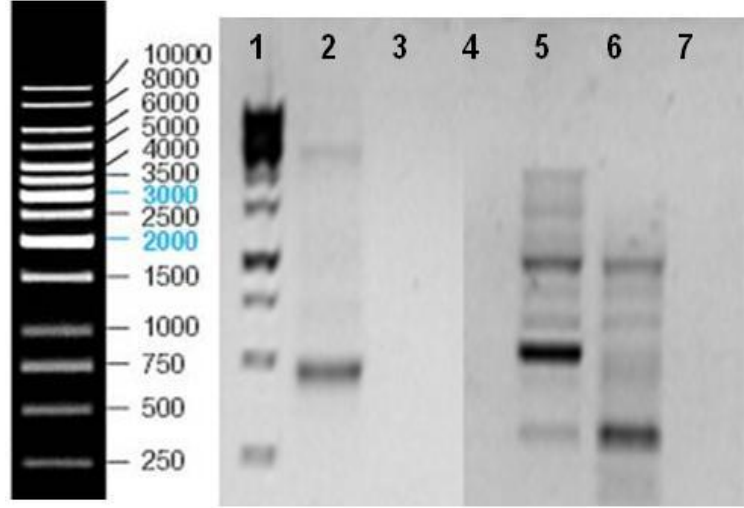
Farklı bağlanma sıcakları ve DNA kaynakları kullanılarak amplifikasyon denendi. Fakat denenen amplifikasyon şartları sonucunda birçok spesifik olmayan bant elde edildi (Şekil 3.16). Böylece, primerin bağlanma spesifikliğı ile ilgili bir problem yaşayıp yaşamadığımızı bir kere daha değerlendirmek için BLAST analizi yapıldı. BLAST analizi sonucu primerin %100 olasılıkla insan genomunda bir kaç diziye bağlandığı tespit edildi. Böylece yeni primer dizaynına karar verildi.

**Tablo 3.1:** ADAMTS-1 Promotorunun -1545/+51 Bölgesinin Çoğaltılmasında Kullanılan İlk Primer Bilgileri

Primer adı	Dizi	Tm	%GC
Forward Primer	ACGCGTCACCCTGGCTTTGC	63,6 <sup>0</sup> C	%65
Reverse Primer	CCATGGCTGCCATTCTTGCTC	59,2 <sup>0</sup> C	%57

**Tablo 3.2:** ADAMTS-1 Promotorunun Çoğaltılmasında Kullanılan PZR Koşulları

1	94 °C	2 dakika	1 döngü
2	94 °C	20 saniye	35 döngü
	53 °C -65°C	20 saniye	
	72 °C	1 dakika	
3	72 °C	5 dakika	1 döngü

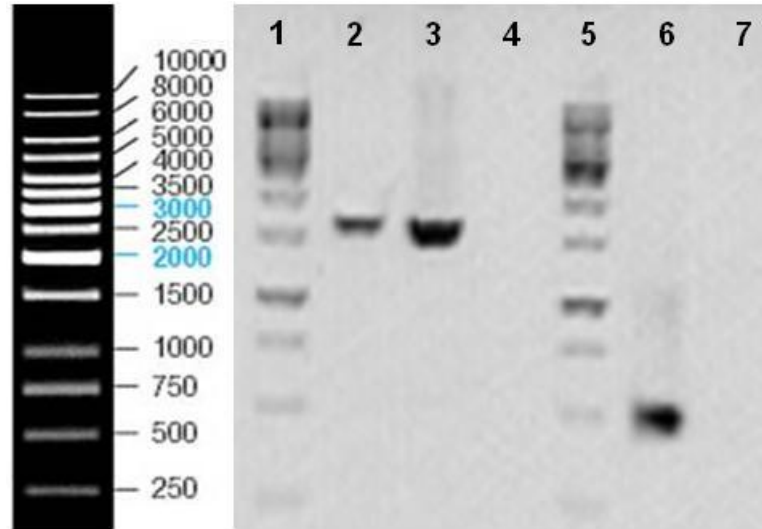


**Şekil 3.16:** Spesifik ADAMTS-1 primerleri ile farklı  $MgCl_2$  kullanılarak yapılan PZR Sonucu (1: Büyüklük belirteci SM 0311, 2: Pozitif Kontrol GAPDH, 3: Negatif Kontrol GAPDH Primerleri, 4: 1mM  $MgCl_2$  ,5: 2mM  $MgCl_2$ , 6: 4mM  $MgCl_2$ , 7: Negatif kontrol ADAMTS Primerleri)

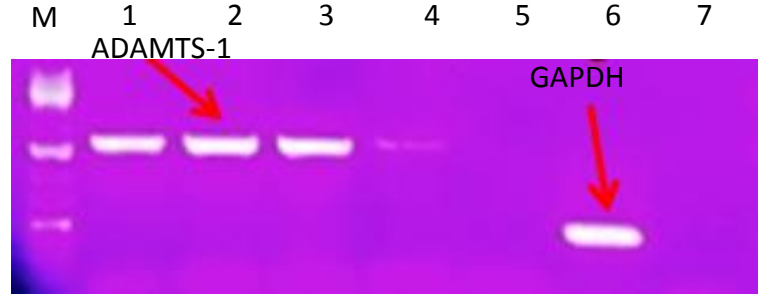
Yeni primerler için hedeflenen bölgenin yakınından diziler seçilerek BLAST ile sadece ADAMTS 1 promotorunun ilgili bölgelerine bağlanan Primerler oluşturuldu. Bu primerlere ait bilgiyi tablo 3.3’de görülebilir. Yeni primerlerle yapılan PZR reaksiyonunda öncelikli olarak tablo 3.2’de belirtilen PZR şartları kullanıldı. Ayrıca farklı  $MgCl_2$  konsantrasyonları kullanılarak PZR reaksiyonu yapıldı (Şekil 3.17). Kullanılan bu PCR reaksiyonu istenen bölgede 1596’bç lik spesifik bölge elde edildi. 2 mM  $MgCl_2$  uygun olduğu tespit edildikten sonra 10  $\mu$ L kalıp DNA kullanılarak bu bölgenin klonlanması amacıyla PZR yapıldı (Şekil 3.18). Bantlar jelden jel ekstraksiyon kiti ile geri kazanıldı. Geri kazanılan bantların bir kısmı tekrar agaroz jelde yürütüldü ve doğru yerde olduğu tespit edildi. Jelden kazanılan 1596 bç’lik bantlar doğru yerde olduğu için promotor PGEMT vektöre ligasyon yapıldı. Ligasyon  $+4^0C$ ’de 1 gece yapıldı. Ligasyon koşulları bölüm 2.2.3.7’de belirtilmiştir.

**Tablo 3.3:** ADAMTS-1 Promotorunun -1545/+51 bç Bölgesinin Çoğaltılmasında Kullanılan İkinci Primer Bilgileri

Primer adı	Dizi	Tm	%GC
Forward Primer	ACGCGTCACCCTGGCTTTGC	63,6 <sup>0</sup> C	%65
Reverse Primer	CCATGGCTGCCATTCTTGCTC	59,2 <sup>0</sup> C	%57

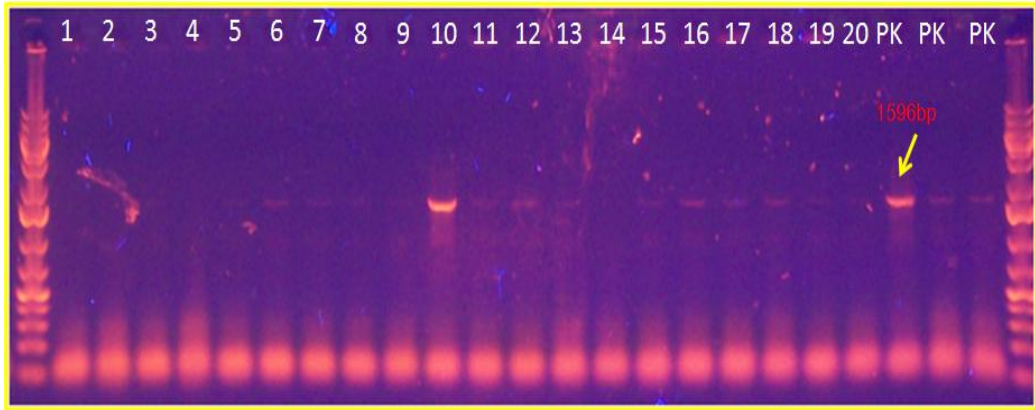


**Şekil 3.17:** Yeni Primerler Kullanılarak Farklı MgCl<sub>2</sub> konsantrasyonlarında Yapılan PZR Sonucu (1: Büyüklük belirteci, 2: 1mM MgCl<sub>2</sub> ,3: 2mM MgCl<sub>2</sub>, 4: 4mM MgCl<sub>2</sub>, 5: Büyüklük belirteci, 6: Pozitif Kontrol, 7: Negatif Kontrol)



**Şekil 3.18:** Yeni primerler ile 2mM MgCl<sub>2</sub> kullanılarak yapılan PZR sonucu (M: Büyüklük belirteci, 1-4: 2mM MgCl<sub>2</sub> ADAMTS-1 promotor 1596 bç, 5: Negatif control ADAMTS-1 primerleri, 6: Pozitif Kontrol GAPDH, 7: Negatif Kontrol GAPDH)

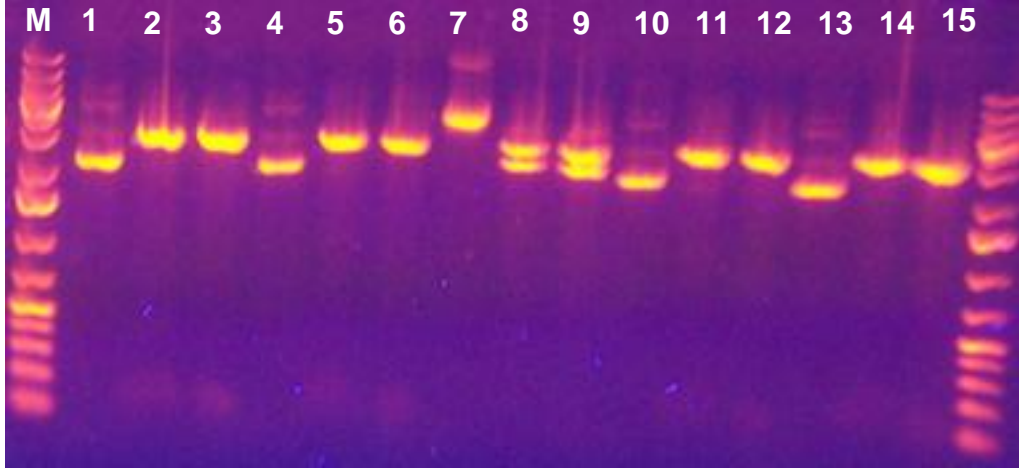
Ligasyon sonuçları *E.coli* DH5 $\alpha$  ve XL-1 Blue hücrelerine transforme edildi. Transformantlar mavi beyaz seçimi yapıldı. 1596 bç için oluşan kolonilerden 20 tanesi ile koloni PZR ile yapıldı (Şekil 3.19). Her bir koloni 10  $\mu$ L steril distile su içerisinde çözüldü ve kalıp olarak bu karışımdan 1  $\mu$ L alındı. Pozitif kontrolde kalıp olarak 1  $\mu$ L genomik DNA kullanıldı.



**Şekil 3.19:** 1596 bç ADAMTS-1 Promotor Bölgesi İçin Yapılan Koloni PZR Sonucu (1-20: Taranan koloni numarası, PK: Pozitif Kontrol olarak genomik DNA kalıbı kullanıldı)

1596 bç için 10, 12, 16, 17, 18. ci kolonilerden en parlak bant verdikleri için plazmit izolasyonu yapıldı. Daha sonra bu plazmitler genin içinden kesen Bgl II ve

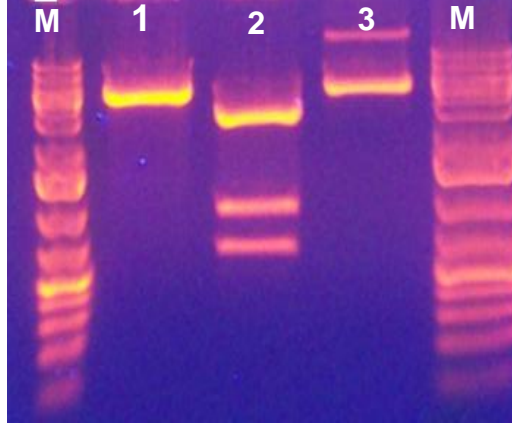
genin iki ucundan kesen Not I ve NcoI ile kesildi. Sonuçlar %0,8'lik agaroz jelde yürütüldü (Şekil 3.20). Restriksiyon kesimi sonucunda istenilen bölgelerde bant görülmedi. Uygulanan koloni PZR'da rastlanılan yanlış pozitiflerin PZR reaksiyonunda kontaminasyon olabileceği değerlendirilerek, ADAMTS-1 promotorunun klonlama çalışmalarına yeniden başlandı.



**Şekil 3.20:** Taranan Kolonilerin Restriksiyon Enzimi Kesim Sonuçları (M: Büyüklük belirteci SM1333, 1: 10.koloni mini prep. Sonucu, 2: 10.koloni NotI/NcoI Kesimi, 3: 10.koloni Bgl II Kesimi, 4: 12.koloni mini prep. Sonucu, 5: 12.koloni NotI/NcoI Kesimi, 6: 12.koloni Bgl II Kesimi, 7: 16.koloni mini prep. Sonucu, 8: 16.koloni NotI/NcoI Kesimi, 9: 16.koloni Bgl II Kesimi, 10: 17.koloni mini prep. Sonucu, 11: 17.koloni NotI/NcoI Kesimi, 12: 17.koloni Bgl II Kesimi, 13: 18.koloni mini prep. Sonucu, 14: 18.koloni NotI/NcoI Kesimi, 15: 18.koloni Bgl II Kesimi)

1596 bç'lik bölge genomik DNA'dan PZR yapılarak klonlanma çalışmalarına devam edildi. Elde edilen beyaz kolonilere restriksiyon kesimi uygulandı, geni kesmeyen KpnI/NotI ile genden kesen StyI/NotI kesimi yapıldı. 1596 bç'lik konstrakt için StyI geni 948. bazdan geni kesmektedir. Kesim sonuçları %0,8'lik agaroz jelde yürütüldü. 1596 bç için Sty I kesiminde doğru yerde bantlar görüldü. Kpn I ve Not I kesiminde genin pozisyonunun ters olmasından dolayı sadece plazmit gözlemlendi (Şekil 3.21).





**Şekil 3.21:** Koloni PZR sonucu tespit edilen plazmidin KpnI/NotI ve StyI/NotI kesimleri agaroz jel elektroforez sonuçları (M: Büyüklük belirteci, 1: KpnI/NotI, 2: StyI/NotI, 3: Mini prep. Sonucu)

### 3.3.1.3 İnsan ADAMTS-1 Promotorunun Dizi Analizi

1596 bç'lik konstraktı içeren plazmit dizi analizine gönderildi. Dizi analizi sonucunda insan ADAMTS-1 promotor'un sorunsuz klonlandığı belirlendi. Klonlanan dizi fare ADAMTS-1 promotoru ile karşılaştırıldı (Şekil 3.22). Ayrıca klonlanan insan ADAMTS-1 promotoruna bağlanan olası transkripsiyon faktörleri de belirlendi.

```

ADAMTS1 1          CTGCCATTCTTGCTCATTGATTTTTCCTGATGAGTGGAAAGCAATGTTTTGTTTTGT 60
|||||
Krmz 21 13881144   CTGCCATTCTTGCTCATTGATTTTTCCTGATGAGTGGAAAGCAATGTTTTGTTTTGT
13881085

ADAMTS1 1          TTTTCAAGTAAGCAATCTCGCTAGGAAAAAAGAAGTTGGAAAGCATCCGAAAAGAAAGC 120
|||||
Krmz 21 13881084   TTTTCAAGTAAGCAATCTCGCTAGGAAAAAAGAAGTTGGAAAGCATCCGAAAAGAAAGC
13881025

ADAMTS1 1          TTGTAAGAGGGACGTGTGGGAGAACTAGAAGGGACGCTTCTGGCTGGGGCCAACCTGAAGT 180
|||||
Krmz 21 13881024   TTGTAAGAGGGACGTGTGGGAGAACTAGAAGGGACGCTTCTGGCTGGGGCCAACCTGAAGT
13880965

ADAMTS1 1          GGGGAAGATCTGGGGAGGAGCGAGGAAAGGACCCAGATCTACTTGGAGCCAACCAAGAGA 240
|||||
Krmz 21 13880964   GGGGAAGATCTGGGGAGGAGCGAGGAAAGGACCCAGATCTACTTGGAGCCAACCAAGAGA
13880905

ADAMTS1 1          CCGGACGGGAGTGGGGCGAAAGCGGAGACCAGTTCGAGCACAACCGGGGGCGCGCG 300
|||||
Krmz 21 13880904   CCGGACGGGAGTGGGGCGAAAGCGGAGACCAGTTCGAGCACAACCGGGGGCGCGCG
13880845

```

ADAMTS1	1	AGTGTGAGGGTTGCGGGTCCGCCCGGGGCTAGGGCGGTGCTCTCGCCATTGTCCCCGCG	360
Krmz 21	13880844		
13880785		AGTGTGAGGGTTGCGGGTCCGCCCGGGGCTAGGGCGGTGCTCTCGCCATTGTCCCCGCG	
ADAMTS1	1	GCTTTCGCCTGTGAAACACGTCCTTCCTCTGGGTCCTTGAGCCCCCTCCCACTTTTGGGA	420
Krmz 21	13880784		
13880725		GCTTTCGCCTGTGAAACACGTCCTTCCTCTGGGTCCTTGAGCCCCCTCCCACTTTTGGGA	
ADAMTS1	1	GAGAAGAGCCACTCAGTTTTTTTTTCCTAAGGACCTGTTGGTGGACCTCTCCTCGCTTTCG	480
Krmz 21	13880724		
13880665		GAGAAGAGCCACTCAGTTTTTTTTTCCTAAGGACCTGTTGGTGGACCTCTCCTCGCTTTCG	
ADAMTS1	1	TAACGCGGATATAGCCTTTTCCCTTCCTGGTAGGAAGAGGAAGGAGGGGTCCGGGAAGGA	540
Krmz 21	13880664		
13880605		TAACGCGGATATAGCCTTTTCCCTTCCTGGTAGGAAGAGGAAGGAGGGGTCCGGGAAGGA	
ADAMTS1	1	AGCCGATTCCTTCTTTCCCTCTGCACGCTTGTCTAGCCCCAGCGATCGCTGCTGGCCC	600
Krmz 21	13880604		
13880545		AGCCGATTCCTTCTTTCCCTCTGCACGCTTGTCTAGCCCCAGCGATCGCTGCTGGCCC	
ADAMTS1	1	CCGGGTAGGAAAGTGGGGTTCCTGGCCGTTTCTGCGACGCTGGCCTAGGGCTTGACGCTG	660
Krmz 21	13880544		
13880485		CCGGGTAGGAAAGTGGGGTTCCTGGCCGTTTCTGCGACGCTGGCCTAGGGCTTGACGCTG	
ADAMTS1	1	CTGTTGAGTGAAAGCACGACACTGGCGGGAGCCGATCATTTCGGAATGAAGAAGAAAA	720
Krmz 21	13880484		
13880425		CTGTTGAGTGAAAGCACGACACTGGCGGGAGCCGATCATTTCGGAATGAAGAAGAAAA	
ADAMTS1	1	AGCGCAATTCCTTCCTTATGCTCTAGGGAATTGAGCCGCTCCAGATCACCCATTCCAG	780
Krmz 21	13880424		
13880365		AGCGCAATTCCTTCCTTATGCTCTAGGGAATTGAGCCGCTCCAGATCACCCATTCCAG	
ADAMTS1	1	AAATGTGAAACCGGGCCCTCACAAAGTCGTCTCTGGTGAAGAGGTGGCGTGCAGGGTGGG	840
Krmz 21	13880364		
13880305		AAATGTGAAACCGGGCCCTCACAAAGTCGTCTCTGGTGAAGAGGTGGCGTGCAGGGTGGG	
ADAMTS1	1	GGTTGGTGGAGGGTGAAGGCATAAGCAAACATATTTTAAAAATCCAGATCGTAGGAAGTGT	900
Krmz 21	13880304		
13880245		GGTTGGTGGAGGGTGAAGGCATAAGCAAACATATTTTAAAAATCCAGATCGTAGGAAGTGT	
ADAMTS1	1	CACCTGGCCCCTCACCCAGGCATGCTTTCTGGGGGAAGCGCAGGGCCAAGCTTTCCTTAG	960
Krmz 21	13880244		
13880185		CACCTGGCCCCTCACCCAGGCATGCTTTCTGGGGGAAGCGCAGGGCCAAGCTTTCCTTAG	
ADAMTS1	1	AAAAGCTGGGGCGAAGAGAGAGCAGGCGCGGCTAAGGAGCTCCTGGCAGGCTGGGAAGG	1020
Krmz 21	13880184		
13880125		AAAAGCTGGGGCGAAGAGAGAGCAGGCGCGGCTAAGGAGCTCCTGGCAGGCTGGGAAGG	
ADAMTS1	1	TGGAGAAGTGGGGTGGAGTATTTTTCTAGAAAGTGTAGCCCTAGCTCATCTCCTAGATTG	1080
Krmz 21	13880124		
13880065		TGGAGAAGTGGGGTGGAGTATTTTTCTAGAAAGTGTAGCCCTAGCTCATCTCCTAGATTG	
ADAMTS1	1	GGGAAGAGGGAAGTGGAGGAGGAGGAGAGCCAGGGCAGCTCCAGGATAGGGAAT	1140
Krmz 21	13880064		
13880005		GGGAAGAGGGAAGTGGAGGAGGAGGAGAGCCAGGGCAGCTCCAGGATAGGGAAT	
ADAMTS1	1	GTTGAAGAAGGGACTGCGTTCTCCAACCGAACCTCCCTCCTGGGAACCGCAGCCAGCG	1200
Krmz 21	13880004		
13879945		GTTGAAGAAGGGACTGCGTTCTCCAACCGAACCTCCCTCCTGGGAACCGCAGCCAGCG	

```

ADAMTS1 1          CGGTAACTGAGTTACCGCAACCGGGCGGTGGGGAGGAAGGGTGGTCCAGGAAACCGGCGA 1260
|||||
Krmz 21 13879944  CGGTAACTGAGTTACCGCAACCGGGCGGTGGGGAGGAAGGGTGGTCCAGGAAACCGGCGA
13879885

ADAMTS1 1          GGGAGAAAAGCGGTGGAAGGGAGAGTCTTCTCCCTGGAGCGGCCCCAGCAGTACAAAGTG 1320
|||||
Krmz 21 13879884  GGGAGAAAAGCGGTGGAAGGGAGAGTCTTCTCCCTGGAGCGGCCCCAGCAGTACAAAGTG
13879825

ADAMTS1 1          CTGGTCACAGCGCCCCTTCCGCCCTAGATTGACGAGCAGTGGCGTGGAGCCAGCGCGGA 1380
|||||
Krmz 21 13879824  CTGGTCACAGCGCCCCTTCCGCCCTAGATTGACGAGCAGTGGCGTGGAGCCAGCGCGGA
13879765

ADAMTS1 1          GGCTGCCCCCTCCCCCTCCCGAGCCCGCAGCGCGGAGCGCGGTTTAGCACCAACGGAGCC 1440
|||||
Krmz 21 13879764  GGCTGCCCCCTCCCCCTCCCGAGCCCGCAGCGCGGAGCGCGGTTTAGCACCAACGGAGCC
13879705

ADAMTS1 1          GGGGGCGGCGTCTTTGGGATGAAAAGGGCCAAAGGGGAGGAGTGGGGTGGGGTGGGGG 1500
|||||
Krmz 21 13879704  GGGGGCGGCGTCTTTGGGATGAAAAGGGCCAAAGGGGAGGAGTGGGGTGGGGTGGGGG
13879645

ADAMTS1 1          TTTCACTGGTCCACTATAAAAAGGACCGCTCGGCTGCCCGGTTCTTGCACTCGCTGGAAAG 1560
|||||
Krmz 21 13879644  TTTCACTGGTCCACTATAAAAAGGACCGCTCGGCTGCCCGGTTCTTGCACTCGCTGGAAAG
13879585

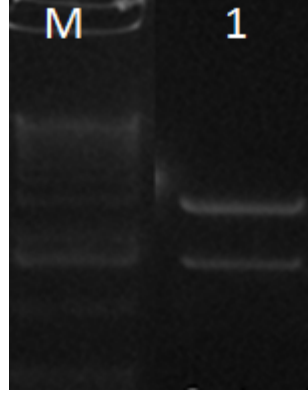
ADAMTS1 1          CGGCTCCGAGCCAGGGGCTATTGCAAAGCCAGGGTG 1596
|||||
Krmz 21 13879584  CGGCTCCGAGCCAGGGGCTATTGCAAAGCCAGGGTG 13879549

```

**Şekil 3.22:** ADAMTS1 promotor bölgesi ve kromozom 21 deki blast sonucu

### 3.3.1.4 İnsan ADAMTS-1 Promotorunun pGEMT Easy Vektörüne Alt Klonlama Yapılması

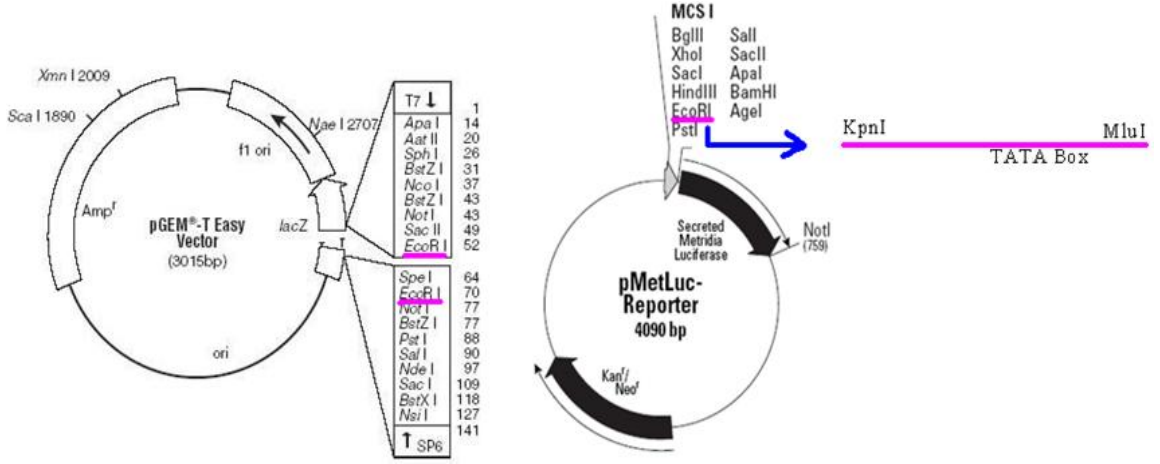
Bölüm 3.3.2’de anlatıldığı gibi pGEMT vektörüne klonlanan insan ADAMTS-1 promotoru PZR reaksiyonu ile çoğaltıldı ve tekrar pGEMT Easy vektörüne ligasyonu yapıldı. Bunun sebebi pMetLuc lusiferaz vektörüne klonlama için pGEMT-Easy vektörünün EcoRI kesim bölgesi içermesidir. Ligasyon ürünleri *E.coli* XL-1 Blue hücrelerine transforme edildi ve oluşan kolonilerden plazmit izolasyonları yapıldı. Elde edilen plazmitler Kpn I ve Mlu I restriksiyon enzimleri ile kesilerek istenilen bölgeyi içerip içermedikleri test edildi. Restriksiyon kesiminde Fermantas Fast Digest enzimleri kullanıldı.



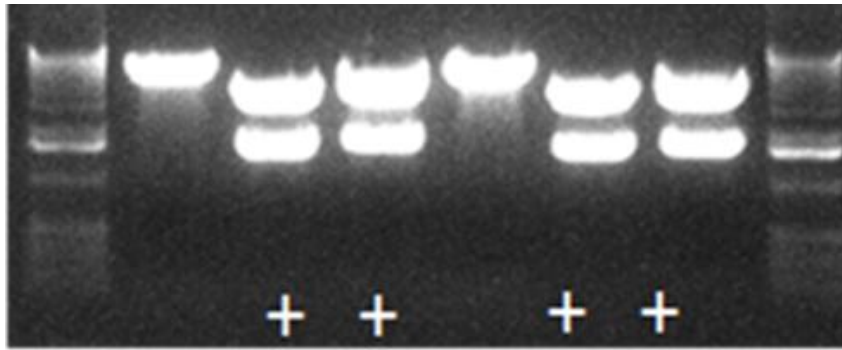
**Şekil 3.23:** KpnI/MluI Restriksiyon enzimleri ile pGEMT Easy Kontrol Kesimi (M: Büyüklük belirteci, 1: pGemT kesimi)

### **3.3.1.5 İnsan ADAMTS-1 Promotorunun pMetLuc Reporter Lusiferaz Vektörüne Alt Klonla Yapılması**

pGEM-T Easy vektörüne klonlanan insan ADAMTS-1 promotoru fonksiyonel aktivitesinin belirleneceği pMetLuc lusiferaz raportör vektörüne alt klonlama yapıldı. pGEMT Easy vektörüne klonlanan ADAMTS-1 Promotorunun pMetLuc Lusiferaz Vektörüne Klonlama Stratejisinin Şematik olarak şekil 3.24’de gösterilmektedir. Bu amaçla hem 1596 baz çiftlik ADAMTS-1 promotorunu içeren pGEM-T Easy vektörü hemde pMetLuc lusiferaz raportör vektörü EcoRI restriksiyon enzimi ile kesildi. pMetLuc vektörünün kendi kendine ligasyonunu önlemek için EcoRI kesiminden sonra alkalin fosfataz uygulaması yapıldı. pGEMT Easy vektörünün kesimi ve alkalin fosfataz uygulaması iki kez yapıldı. Kesim sonuçları %0,8 agaroz jelde görüntülendi (Şekil 3.25). Daha sonra aynı şekilde EcoRI enzimi ile kesilen ve fosfataz uygulanan pMetLuc Reporter vektörü ile jelden geri kazanılan insan ADAMTS-1 promotoru bir gece +4°C’de ligasyona bırakıldı. *E.coli* XL1blue hücrelerine transforme edildi. Kanamisin içeren LB agarlı petrilere transformasyon yapılmış bakterilerin ekimi yapılarak bir gece 37°C’de inkübasyona bırakıldı. Oluşan kolonilerden 6 tanesi incelenerek, XhoI ve MluI restriksiyon enzimleri ile kesilerek kontrol yapıldı. Kesim sonuçları agaroz jelde yürütüldü. Şekil 3.25’de görüldüğü gibi ekilen 6 koloniden 4 tanesinde doğru oryantasyonda insan ADAMTS-1 promotor dizisi tespit edildi.



**Şekil 3.24:** pGEMT Easy vektörüne klonlanan ADAMTS-1 Promotorunun pMetLuc Lusiferaz Vektörüne Klonlama Stratejisinin Şematik Gösterimi

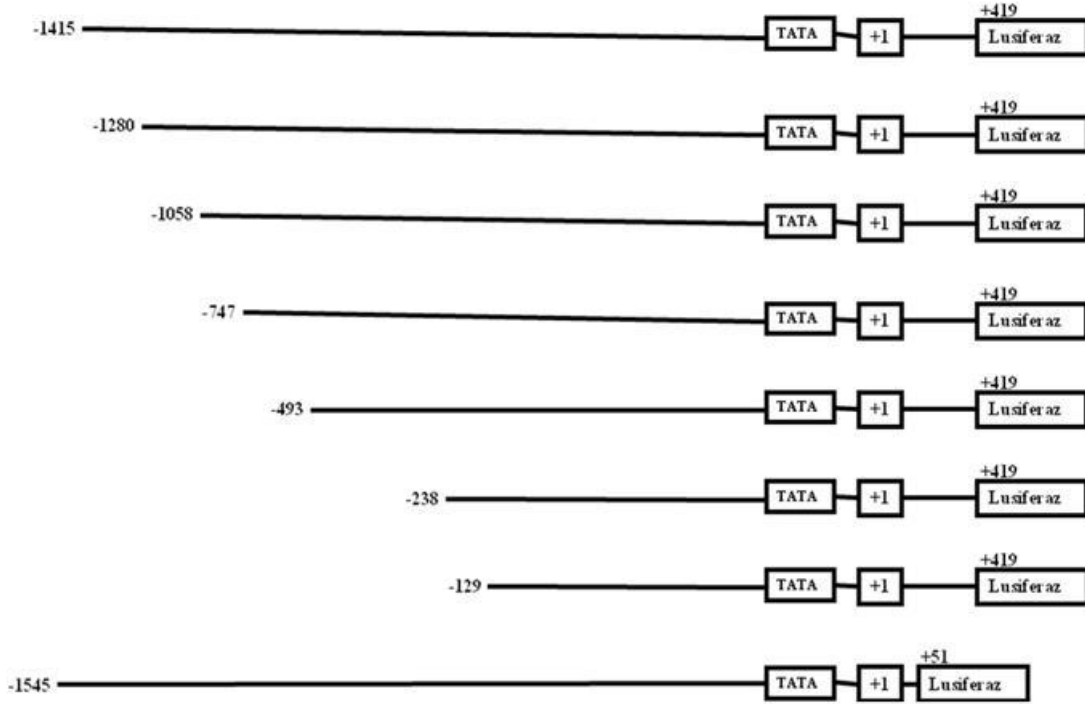


**Şekil 3.25:** Transformasyon sonucu taranan 6 koloninin XhoI/MluI restriksiyon enzimleri ile kesim sonucu (M: Büyüklük belirteci, 1-6: Seçilen altı koloniye ait plazmitler)

### 3.4 Farklı Uzunluklarda Promotor Parçalarının Kontrolü

Transfeksiyon analizlerinde kullanılacak 7 promotor parçası, Hatipoğlu ve arkadaşlarının tarafımıza bağışlanmıştır. Bu çerçevede bizim klonladığımız promotor parçasıyla elimizde 8 adet farklı promotor bölgeleri içeren promotor parçaları bulunmaktadır. Bizim klonladığımız bölge Hatipoğlu ve arkadaşlarının oluşturulmuş parçalardan farklı olarak 5' ucundan ilave 3' ucundan da eksik bölgeler bulunmaktadır. Herbir promotor parçasını içeren plazmitler *E.coli* DH5α hücrelerine

transforme edilmiş ve maxi prep. kiti kullanılarak izolasyonları yapılmıştır. Transfeksiyonlarda kullanılmadan önce restriksiyon enzimleri kullanılarak kontrolleri yeniden yapılmıştır. Promotor parçalarının şematize edilmiş şekli aşağıda görülmektedir. Promotor parçalarının kapsadığı bölgeler ve uzunlukları şu şekildedir; Promotor parçası 1 (P1) : 1834 bç (-1415/+419), promotor parçası 2 (P2): 1699 bç (-1280/+419), promotor parçası 3 (P3): 1058 bç (-1271/+419), promotor parçası 4 (P4): 1166 bç (-747/+419), promotor parçası 5 (P5): 912 bç (-493/+419), promotor parçası 6 ( P6): 657 bç (-238/+419), promotor parçası 7 (P7): 548 bç (-129/+419) ve promotor parçası 8 (P8): 1596bç (-1545/+51). Promotor parçalarının temsili şekli Şekil 3.26’da görülmektedir.



**Şekil 3.26:** Promotor (P) Parçalarının temsili şekli; P1: 1834 bç (-1415/+419), P2: 1699 bç (-1280/+419), P3: 1058 bç (-1271/+419), P4: 1166 bç (-747/+419), P5: 912 bç (-493/+419), P6: 657 bç (-238/+419), P7: 548 bç (-129/+419) ve P8: 1596 bç (-1545/+51).

### 3.5 İnsan ADAMTS-1 Geni Promotorunun Karakterizasyonu

İnsan ADAMTS-1 promotoru üzerindeki muhtemel transkripsiyon faktörleri bağlanma bölgeleri web tabanlı bir program olan TF SEARCH ve Mathinspector programları kullanılarak belirlendi (Şekil 3.28). Belirlenen tüm transkripsiyon faktörü bağlanma bölgeleri ise Ek 5’de verildi. İncelenen 1596bp [-1758/-162] uzunluğundaki promotor üzerinde sayısız transkripsiyon bağlanma sinyalleri belirlenmiştir. Önemli bulunan transkripsiyon faktörü bağlanma bölgelerinin promotor üzerindeki yerleşimleri ve kaç defa bağlandıkları ile ilgili bilgilere de şekil 3.28 ve tablo 3.4’de ulaşılabilir. Unutulmamalıdır ki bu bağlanma dizilerinin işlevsel olup olmadığı promotorun fonksiyonel analizleri ile test edilecektir. İnsan ADAMTS-1 promotoru ile yapılan çalışmalar TATA kutusu içerdiğini göstermiştir.

İnsan ADAMTS-1 promotor bölgesinin *Mus Musculus* ADAMTS-1 promotor bölgesi ile karşılaştırılması için BioEdit Sequence Alignment Programı kullanıldı. Karşılaştırma sonucunda özellikle GC kutuları analiz edildiğinde iki tür arasında yüksek oranda korunmuşluk olmadığı tespit edildi. Bu da iki türün genlerinin farklı şekilde regülasyona uğradığını düşündürmektedir (Şekil 3.27).

**Tablo 3.4:** -1415/+419 insan ADAMTS-1 promotoru üzerinde yer alan muhtemel transkripsiyon Faktörlerinin bağlanma dizileri ve lokalizasyonları

<b>TF</b>	<b>Bölge</b>
API (Activator protein 1)	-339, +286
c-Rel (Cellular oncogene)	-1187
C/EBP (CCAAT Binding	-1120, -1073, -850, -700, -

Protein)	472, +30, +143
GCBox/SP1(Stimulating Protein 1)	-1358, -1298, -1260, -1224, -1137, -717, -292, -213, -163, -108, -75
STAT(Signal transducer and activator of transcription)	-1047, -1026, -931, -765, -596, -331, -275, +324
USF (Upstream Stimulating Factor)	-656





Şekil 3.27: Fare ve İnsan ADAMTS-1 Promorlarının karşılaştırılması

-1415 GACGTGTGGGAGAACTAGAAGGGACGCTTCTGGCTGGGGCCAACCTGAAGT

-1365 GGGGAAGATCTGGGGAGGAGCGAGGAAAGGACCCAGATCTACTTGGAGCCAACCAAGAGA  
 SPI/GC Box

-1305 CCGGACGGGAGTGGGGCGGAAAGGCGGAGACCAGTTCGAGCACTAACGCGGGGGCGCGCG  
 SPI/GB Box SPI/GC Box

-1245 AGTGTGAGGGTTGCGGGTCCGCCCGGGGCTAGGGCGGTTCGCTCTCGCCATTGTCCCCGCG  
 SPI/GC Box c-Rel

-1185 GCTTCCGCTGTGAAACACGTCTCTCCTCTGGGTCCCTTGAGCCCCTCCCACCTTTTTTGA  
 SPI/GC Box

-1125 GAGAAGAGCCACTCAGTTTTTTTTTCCCTAAGGACCTGTTGGTGGACCTCTCCTCGCTTTCG  
 C/EBP

-1065 TAACGCGGATATAGCCTTTTCCCTTCCTGGTAGGAAGAGGAAGGAGGGGTCCGGGAAGGA  
 C/EBP STAT STAT

-1005 AGCCGATTTCTTCTTTCCCCCTCTGCACGCTTGCTAGCCCCAGCGATCGCTGCTGGCCC

-945 CCGGGTAGGAAAGTGGGGTTCTGGCCGTTTCTGCGACGCTGGCCTAGGGCTTGCAGCTG  
 STAT

-885 CTGTTGAGTGAAAGCACGCAGACTGGCGGGAGCCGATCATTCTCGAATGAAGAAGAAAA  
 C/EBP

-825 AGCGCAATTCCTCCTTATGCTCTAGGGAATTGAGCCCGGTCCCAGATCACCCATTCCAG

-765 AAATGTGAAACCGGGCCTCACAAAGTCGTCTCTGGTGAAGAGGTGGCGTGCGGGGTGGG  
 STAT SPI/GC Box

-705 GGTGGTGGAGGGTGAAGGCATAAGCAAACATATTTTAAAATCCAGATCGTAGGAAGTGT  
 C/EBP USF USF

-645 CACCTGGCCCCCTACCCAGGCATGCTTTCTGGGGGAAGCGCAGGGCCAAGCTTTCCCTAG  
 STAT

-585 AAAAGCTGGGGCGAAGAGAGAGCAGGCGGCGCTAAGGAGCTCCTGGCAGGCTGGGAAGG

-525 TGGAGAAGTGGGGTGAAGTATTTTTCTAGAAAGTGTAGCCCTAGCTCATCTCCTAGATTG  
 C/EBP

-465 GGGAAAGAGGGAACCTGAGGGAGGAGGGAAGGAGACCCAGGGCAGCTCCAGGATAGGGAAAT  
 C/EBP

-405 GTTGAAGAAGGGACTGCGTTCTCCAACCGAACCCCTCCCTCCTGGGAACCGCAGCCCAGCG

-345 CGGTAACCTGAGTTACCGCAACCGGGCGGTGGGGAGGAAGGGTGGTCCAGGAAACCGGCGA  
 AP1 STAT SPI/GC Box

-285 GGGAGAAAAGCGGTGGAAGGGAGAGTCTTCTCCCTGGAGCGGCCCAGCAGTACAAAGTG  
 STAT

-225 CTGGTCACAGCGCCCCTTCCGCCCTAGATTGACGAGCAGTGGCGTGGAGCCAGCGCGGA  
 SPI/GC Box

-165 GGCTGCCCCCTCCCCCTCCCGAGCCCGCAGCGCGGAGCGCGGTTAGCACCAACGGAGCC  
 SPI/GC Box

-105 GGGGCGGCGTCTTTGGGATGAAAAAGGGCCAAAGGGGAGGAGTGGGGTGGGGTGGGGG  
 SPI/GC Box SPI/GC Box SPI/GC Box

-45 TTTCACTGGTCCACTATAAAAGGACCGCTCGGCTGCCCGGTTCTTGCACTCGCTGGAAAG  
 TATA kutusu +1

+16 CGGCTCCGAGCCAGGGCTATGCAAAGCCAGGGTGCGCTACCGGACGGAGAGGGGAGAG  
 C/EBP

+76 CCCTGAGCAGAGTGAGCAACATCGCAGCCAAGGCGGAGGCCGAAGAGGGGCGCCAGGCAC

+136 CAATCTCCGCGTTGCCTCAGCCCCGAGGGCGCCCCAGAGCGCTTCTTGTCCAGCAGAGC  
 C/EBP

+196 CACTCTGCCTGCGCCTGCCTCTCAGTGTCTCCAACTTTGCGCTGGAAGAAAACTTCCCG

+256 CGCGCCGGCAGAACTGCAGCGCCTCCTTTTAGTGACTCCGGGAGCTTCGGCTGTAGCCGG  
 API

+316 CTCTGCGCGCCCTTCCAACGAATAATAGAAATTGTTAATTTTAACAATCCAGAGCAGGCC  
 STAT

+376 AACGAGGCTTTGCTCTCCCGACCCGAACTAAAGGTCCCTCGCTC +419

**Şekil 3.28:** -1415/+419 insan ADAMTS-1 promotörü üzerinde yer alan muhtemel transkripsiyon Faktörlerinin bağlanma dizileri ve lokalizasyonları

### 3.6 İnsan ADAMTS-1 Geni Promotor Bölgesinin Fonksiyonel Analizi

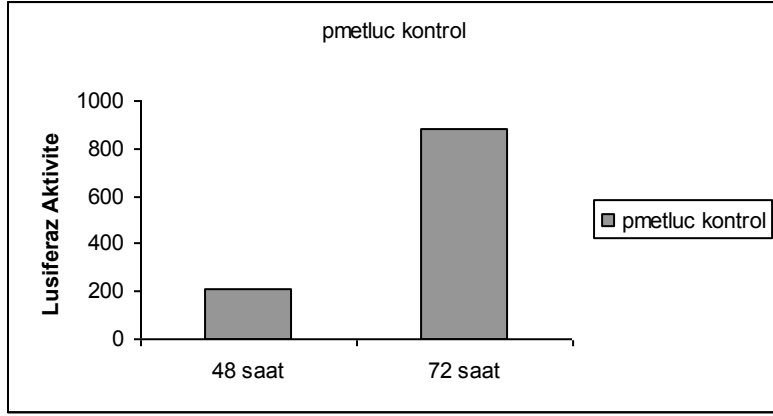
İnsan ADAMTS-1 promotör parçalarının fonksiyonel aktivitelerinin belirlenmesi için hepatoma (Hep3B) hücrelerine kalsiyum fosfat prespitasyon metodu kullanılarak geçici transfeksiyon yapıldı. Kalsiyum fosfat prespitasyon yöntemi, DNA'nın kalsiyum klorür ile karıştırılması ve bu karışımın fosfat içeren tampona kontrollü şekilde ilave edilerek oda sıcaklığında inkübasyonunu içerir. Böylece oluşan prespitasyonlar hücreler üzerine yayılarak fagositoz ya da endositoz yoluyla hücrelerin DNA moleküllerini almalarını sağlar. Yöntem özellikle kullanılan materyallerin ucuz olması ve kolaylıkla elde edilebilmesi nedeniyle yaygın olarak kullanılmaktadır. Promotor aktivitesini belirlemek için raportör gen olarak *Metridia longa* (marin copepod) lusiferaz geni içeren pMetLuc vektör sistemi kullanılmıştır. Lusiferaz proteini medyuma salındığı için lusiferaz aktivitesini belirlemek hassas,

güvenilir ve hızlıdır ayrıca bu enzimin hücre içinde stabil olmasından dolayı (uzun yarı ömürlü), lusiferaz raportör geni promotor aktivitesinin belirlenmesinde yaygın olarak kullanılır. Hep3B kalsiyum fosfat presipitasyon yöntemi ile kolaylıkla transfekte edilmektedir. Transfeksiyon çalışmalarından önce bölüm 3.2.4 ve bölüm 3.3'de belirtildiği şekilde insan ADAMTS-1 promotor parçaları pMetLuc vektörü içindeki lusiferaz raportör genin üst kısmına klonlandı. Promotor parçalarının dizi analizi ile kontrolleri yapıldıktan sonra endo-free maxi prep kiti ile saflaştırılarak, transfeksiyonları yapıldı.

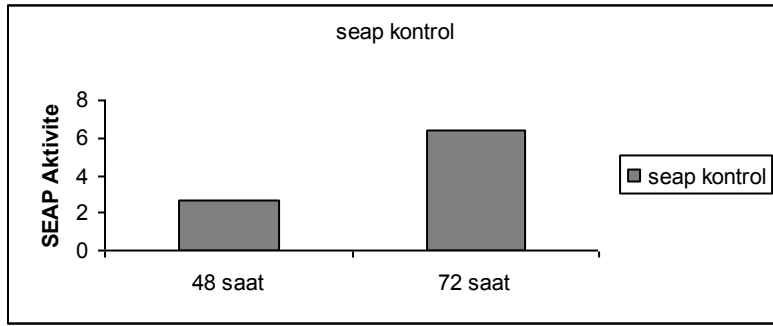
### 3.6.1 Lusiferaz/SEAP optimizasyonları

Lusiferaz enzim aktivitesini belirlemek için 'Clontech Ready-To-Glow™ Secreted Luciferase System' kullanıldı. Ölçümler Luminoskan Ascent marka luminometre ile alındı. Lusiferaz aktivitesi SEAP aktivitesine oranlanarak sonuçlar normalize edildi. Hücrelere promotor parçasını içeren rekombinant plazmitler ile birlikte transfeksiyon etkinliğinin analiz edilmesi amacıyla 0,5 µg SEAP (secreted alkaline fosfatase) vektörü de transfekte edildi. Transfeksiyon etkinliği pmetluc kontrol vektörü ve SEAP vektörünün ayrı transfeksiyonu ile değerlendirildi (Şekil 3.29 ve Şekil 3.30). Promotor parçası içermeyen boş pmetluc reporter vektörü arkaplan olarak kullanıldı. Transfeksiyondan 24, 48 ve 72 saat sonra medyumdan örnek alınarak bölüm 2.2.4.9 ve bölüm 2.2.4.10'da belirtildiği şekilde lusiferaz ve SEAP aktiviteleri ölçüldü.

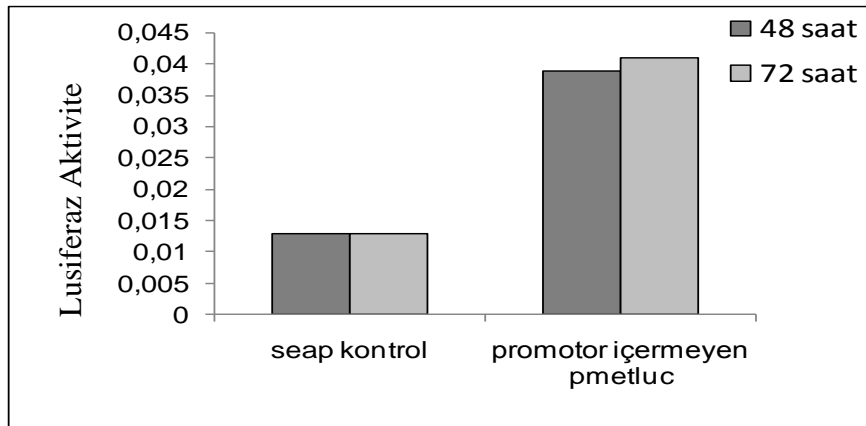
En büyük promotor parçası olan 1834bç (-1415/+419) ile konsantrasyon optimizasyonu yapıldı. Bu amaçla 0,5 µg 1 µg ve 2 µg, 1834bç (-1415/+419) promotor parçası Hep3B hücrelerine kalsiyum fosfat presipitasyon yöntemi ile transfekte edildi. 0,5 µg promotor parçası uygulamasının lusiferaz ölçümü değerlendirilmesinde yeterli olduğu görüldüğü için kotransfeksiyonlarda 0,5 µg promotor parçası uygulamasına karar verildi.



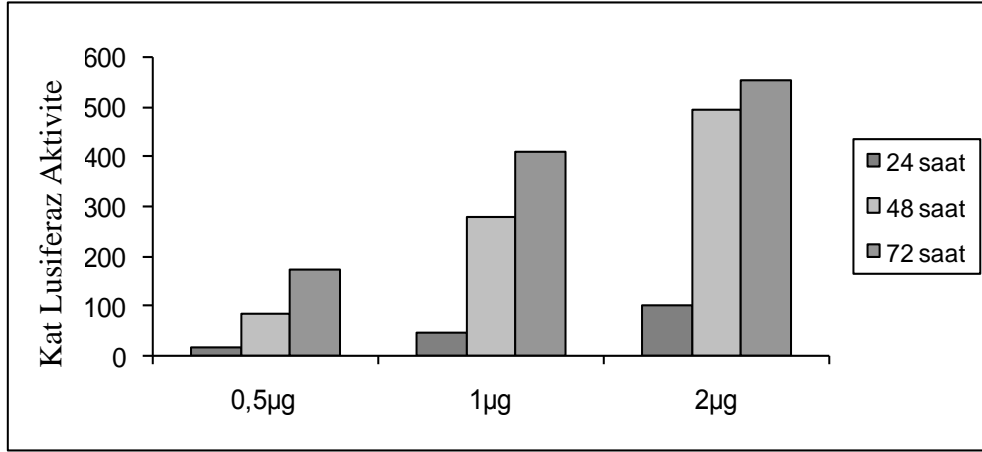
Şekil 3.29: pmetluc kontrol vektörünün lusiferaz sonuçları



Şekil 3.30: SEAP kontrol vektörünün seap sonuçları



Şekil 3.31: SEAP kontrol ve promotor içermeyen pmetluc reporter vektörlerin lusiferaz aktivite sonuçları



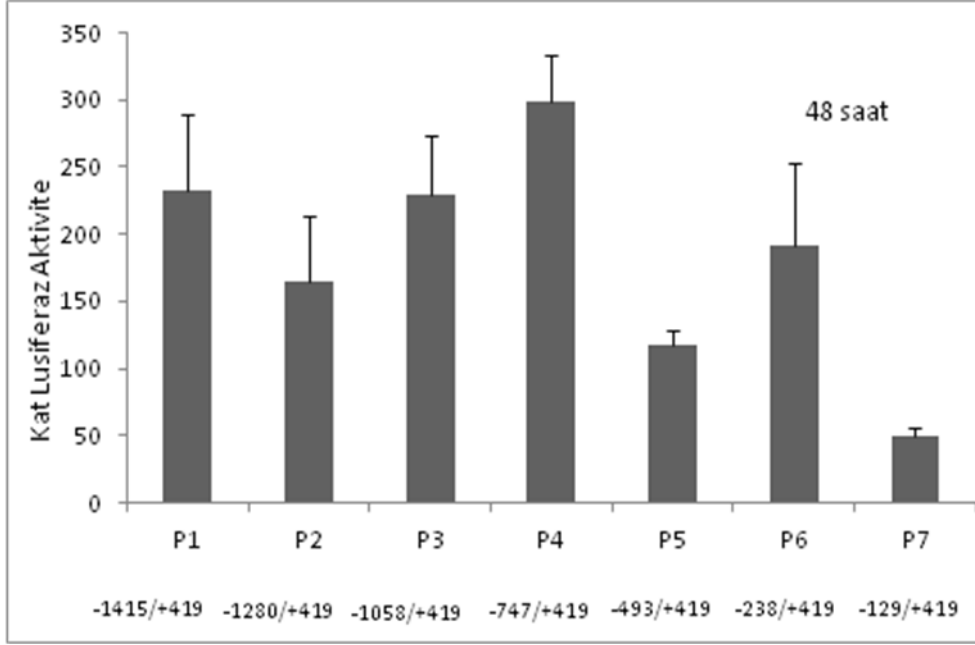
**Şekil 3.32:** 2 µg, 1 µg ve 0,5 µg 1834bç (-1415/+419) promotor parçasının Lusiferaz/SEAP aktivitesi optimizasyon sonuçları

### 3.6.2 Bazal Promotor Aktivitesinin Belirlenmesi

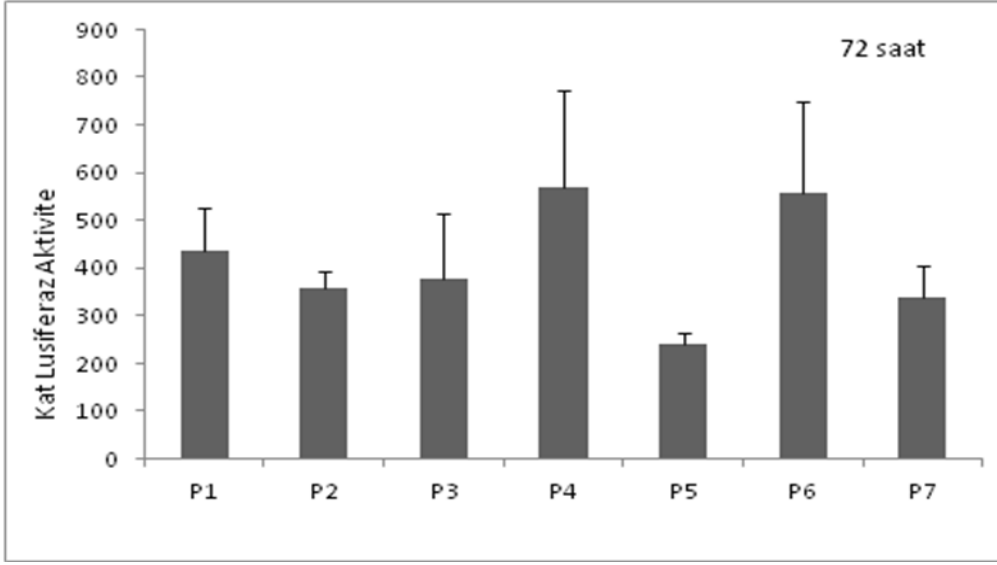
Öncelikle yedi farklı uzunlukta, kısaltılarak hazırlanmış insan ADAMTS-1 promotor parçalarının bazal transkripsiyonel aktiviteleri belirlendi. Hep3B modeline aktarımda kalsiyum fosfat transfeksiyon yöntemi kullanıldı ve lusiferaz vektör sistemiyle aktivite belirlendi. Hücrelere 0,5µg promotor parçaları içeren rekombinant plazmitler ile birlikte transfeksiyon etkinliğinin analiz edilmesi amacıyla 0,5µg SEAP vektörü de transfekte edildi. Lusiferaz ölçümlerinin kontrolü ve transfeksiyon etkinliğinin kontrolü için pMetLuc Kontrol plazmiti ve salınan alkalın fosfataz aktivitesinin kontrolü için de SEAP Kontrol vektörleri pozitif kontrol olarak kullanıldı. Negatif kontrol olarak promotor parçası içermeyen pMetLuc vektörü hücrelere transfekte edildi. Pozitif kontrol olarak pMetLuc vektörü kullanılmasının nedeni, bu vektörün lusiferaz geninin önünde kontrol promotor taşıdığı için yüksek lusiferaz aktivitesi göstermesidir. Transfeksiyondan 48 saat sonra transfekte edilmiş hücrelerden medyum toplanarak bölüm 2.2.4.9 ve bölüm 2.2.4.10'da belirtildiği şekilde lusiferaz ve alkalın fosfataz aktiviteleri ölçüldü. Lusiferaz aktivitesi SEAP aktivitesine oranlanarak sonuçlar normalize edildi. Transfeksiyon deneyleri 12 kuyulu plakalarda 3 tekrarlı olarak çalışıldı ve birbirinden bağımsız 3 deney yapıldı.

Şekil 3.33'da ve Şekil 3.34'de görüldüğü gibi zamana bağlı olarak lusiferaz aktivitesinde artış gözlemlendi. Tüm promotor parçalarında gözlenen aktivite, en küçük parça olan 548bç [-129/+419 ] uzunluğundaki promotor parçasının, insan ADAMTS-

1 promotorunun bazal aktivitesi için yeterli olduğunu gösterdi. İnsan ADAMTS-1 promotorunun -747/+419 bölgelerini içeren [-1251/+38] uzunluğundaki promotor parçası ve 304 bç [-266/38] uzunluğundaki promotor parçaları ise en yüksek aktiviteyi gösterdi.

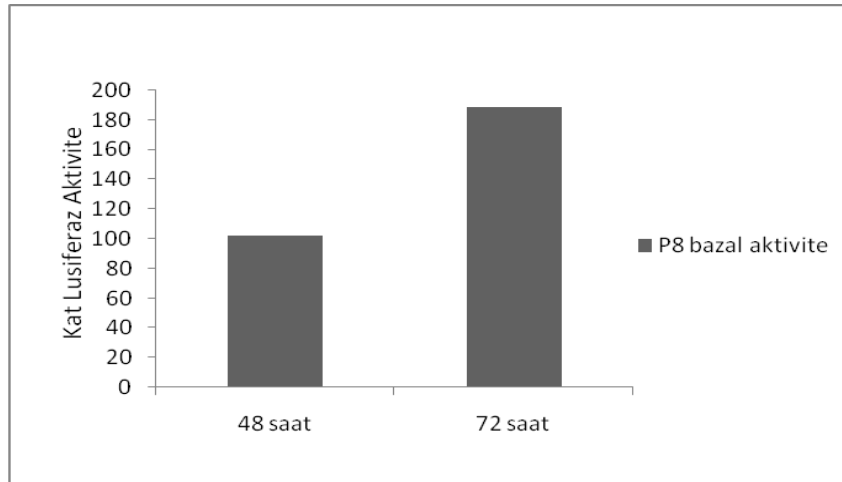


**Şekil 3.33:** Promotor parçalarının 48 saat bazal aktivitelerinin istatistiksel analizi; P1: 1834 bç (-1415/+419), P2: 1699 bç (-1280/+419), P3: 1058 bç (-1271/+419), P4: 1166 bç (-747/+419), P5: 912 bç (-493/+419), P6: 657 bç (-238/+419) ve P7: 548 bç (-129/+419)



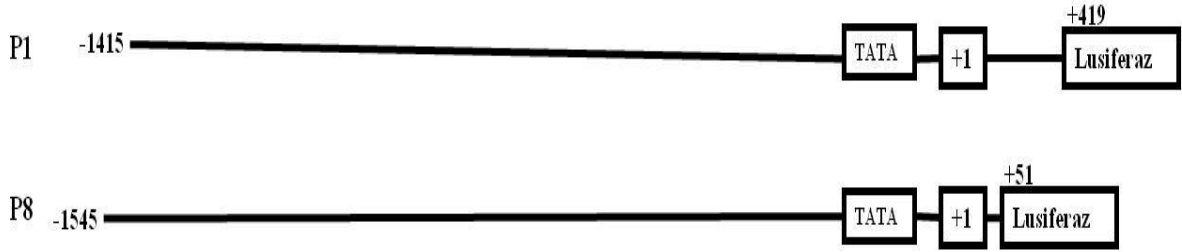
**Şekil 3.34:** Promotor parçalarının 72 saat bazal aktivitelerinin istatistiksel analizi; P1: 1834 bç (-1415/+419), P2: 1699 bç (-1280/+419), P3: 1058 bç (-1271/+419), P4: 1166 bç (-747/+419), P5: 912 bç (-493/+419), P6: 657 bç (-238/+419) ve P7: 548 bç (-129/+419)

Ayrıca en büyük iki promotor parçasının bazal aktiviteleri de karşılaştırıldı. 5' uçtan yaklaşık 368 bazlık bir eksik bölge taşıyan P8'in P1 'e göre daha düşük aktivite gösterdiği tespit edildi. Aktivitedeki bu azalmanın bu bölgede bulunan önemli transkripsiyon faktörü bağlanma bölgelerinden kaynaklı olduğu düşünülmektedir.

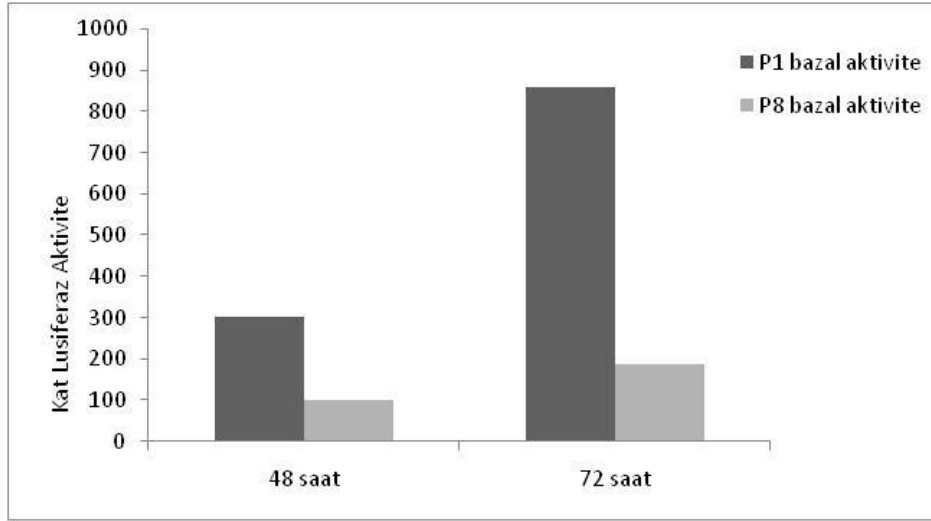


**Şekil 3.35:** P8 1596 bç (-1545/+51) promotor parçasının bazal aktivitesi





**Şekil 3.36:** İki büyük promotor parçasının temsili şekli



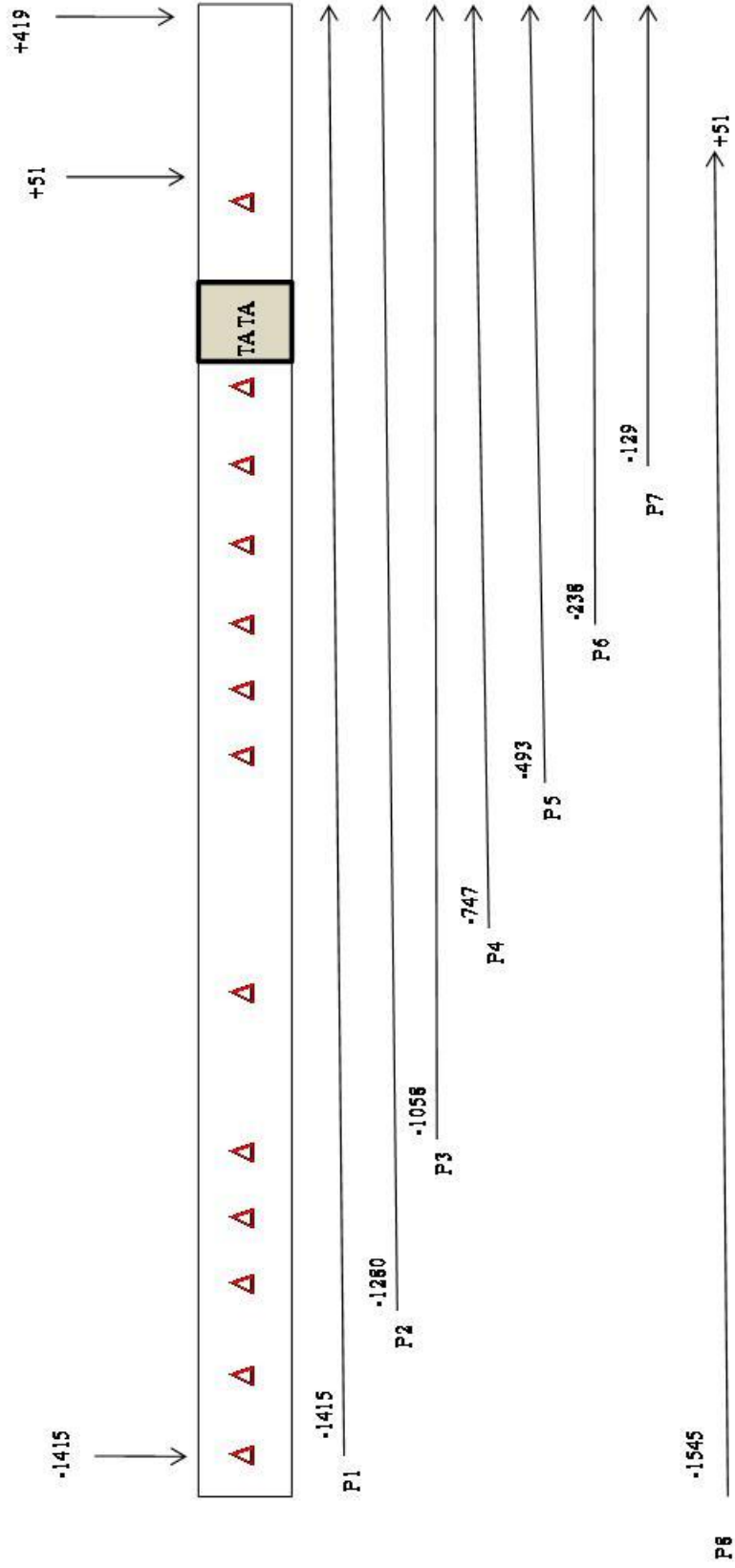
**Şekil 3.37:** İki büyük promotor parçasının bazal aktivitelerinin karşılaştırılması

### 3.6.3 SP1 Transkripsiyon Faktörünün ADAMTS-1 üzerindeki Etkisinin Belirlenmesi

#### 3.6.3.1 SP1 Transkripsiyon Faktörünün ADAMTS-1 promotor parçaları üzerindeki Etkisinin Belirlenmesi

PCR'a dayalı teknikle klonlanan ADAMTS-1 promotoru web bazlı bir program olan TRANSFACT programı kullanılarak ön analizden geçirildi. Bölüm

3.5’de bahsedildiği gibi yüzlerce farklı potansiyel transkripsiyon faktörü bağlanma bölgeleri bulundu. Bu transkripsiyon faktörü bağlanma bölgelerinin bulunması hepsinin promotora bağlanacağı anlamına gelmemektedir. Fonksiyonel deneylerle bunun desteklenmesi gerekmektedir. Kotransfeksiyon analizleri bunları sağlar. Kotransfeksiyon analizleri ilgili transkripsiyon faktörün kodlayan genin bir ekspresyon vektörüne klonlanması ile oluşturulan ekspresyon vektörü ile promotor parçalarının aynı anda transfeksiyonunun yapılması demektir.



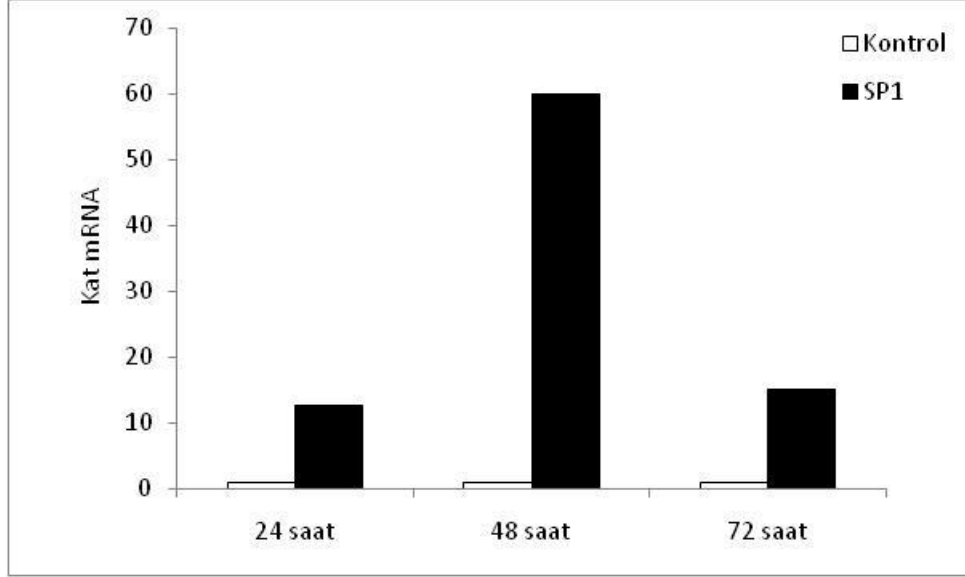
Şekil 3.38: Promotor Parçaları üzerinde SP1 bağlanma bölgelerinin gösterilmesi

SP1 transkripsiyon faktörlerini taşıyan ekspresyon vektörleri Dr.Dipak Ramji Cardiff Üniversitesi U.K.'den temin edilmiştir. Ekzojen olarak ekspre olmuş transkripsiyon faktörlerinin direkt olarak ADAMTS-1'in transkripsiyonel aktivitesini etkileyip etkilemediklerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla farklı promotor parçaları ile transkripsiyon faktörlerini içeren ekspresyon plasmitleri aynı anada Hep3B hücrelerine transfekte edildi. Hep3B hücrelerinde promotor parçalarının farklı inkübasyon aralıklarında transkripsiyonel aktiviteleri belirlendi. SP1'in promotor parçaları üzerindeki etkisinin araştırılmasında 48 ve 72 saat dilimleri kullanıldı. Bunun nedeni promotor parçaları ile birlikte transfekte edilen transkripsiyon faktörlerini taşıyan ekspresyon vektörlerinin yeterli protein üretiminin oluşması ve promotor ile etkileşmesinin olabilmesi içindir.

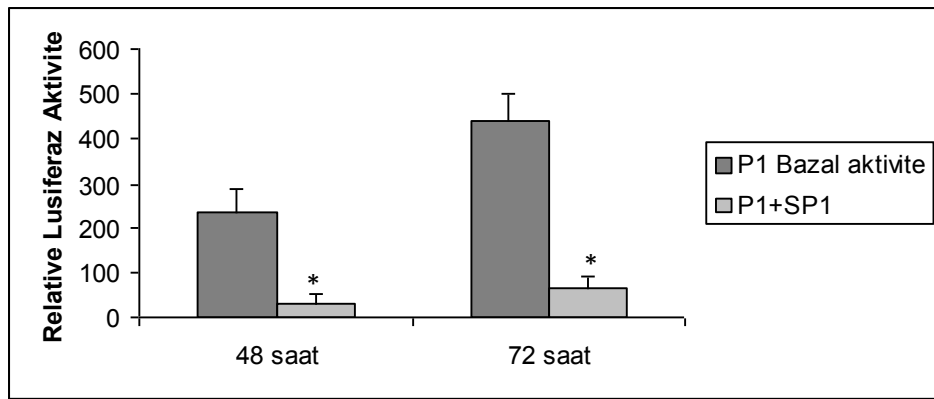
SP1 transkripsiyon faktörünün Hep3B hücrelerindeki ektopik olarak ifade olup olmadığını kontrol için SP1 için spesifik primerler kullanılarak gerçek zamanlı PZR ile kontrol edildi. mRNA ve protein analizlerinde 25cm<sup>2</sup> flasklarda transfeksiyondan 24 saat önce hücreler yaklaşık 2.000.000 olacak şekilde yayıldı ve transfekte edilecek ekspresyon vektörü 10 µg son konsantrasyonda olacak şekilde uygulandı. Hücrelerden total RNA izole edildi ve bölüm 2.2.5 de anlatıldığı şekilde cDNA eldesi gerçekleştirildi. Ekspresyon vektörü transfekte edilmeyen hücreler kontrol olarak kullanılarak gerçek zamanlı PZR gerçekleştirildi. Sonuçlar Livak metoduna göre değerlendirildi. Ektopik olarak üretilen SP1'in mRNA ifadesi gerçek zamanlı PZR ile belirlendi. Buna göre SP1 ekspresyon vektörü ile geçici ifadesinin hücrelerde oldukça başarılı olduğu SP1 mRNA miktarının endojen SP1 miktarına göre oldukça artmış olduğu görüldü (Şekil 3.39).

Transfeksiyonlarda 0,5 µg promotor parçası taşıyan pMetluc vektörü, 0,5 µg pSEAP vektörü ve 2 µg SP1 transkripsiyon faktörü taşıyan ekspresyon vektörü kalsiyum fosfat presipitasyon metoduna göre Hep3B hücrelerine transfekte edildi. Transfeksiyon deneyleri 12 kuyulu plakalarda 3 tekrarlı olarak çalışıldı ve birbirinden bağımsız 3 deney yapıldı. Ayrıca aynı deneyde tüm promotor parçalarının bazal aktiviteleri de çalışıldı. Kotransfeksiyonlarda elde edilen Lusiferaz aktivitelerinin SEAP aktivitelerine oranlanmasıyla elde edilen deney sonuçları, promotor parçalarının bazal aktiviteleriyle elde edilen deney sonuçlarıyla karşılaştırıldı. SP1 transkripsiyon faktörünün her bir promotor parçasına olana etkisi

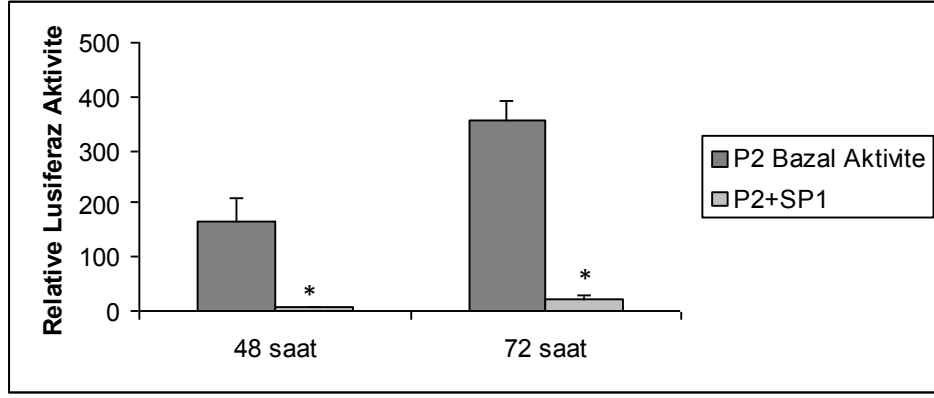
istatistiksel olarak değerlendirildi. SP1 transkripsiyon faktörünün promotor parçaları üzerinde transkripsiyonu azaltıcı etki gösterdiği sonucuna varıldı. Sonuçlar şekil 3.40 ile 3.46 arasında gösterilmiştir.



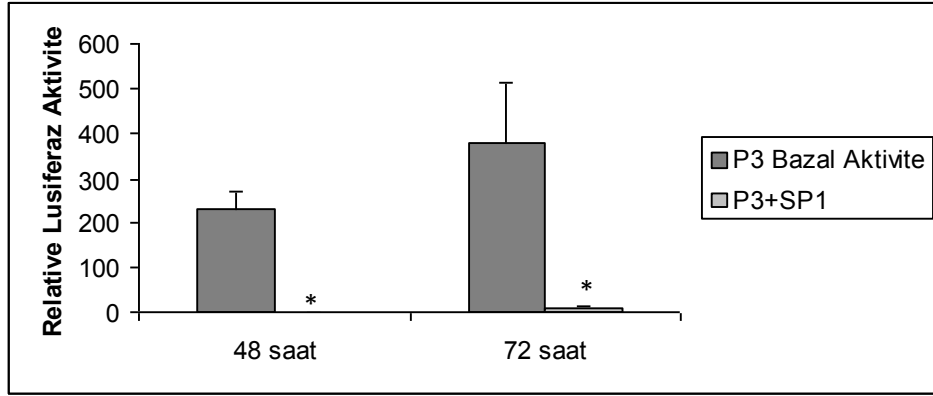
**Şekil 3.39:** Ektopik olarak üretilen SP1'in mRNA ifadesinin gerçek zamanlı PZR ile gösterilmesi



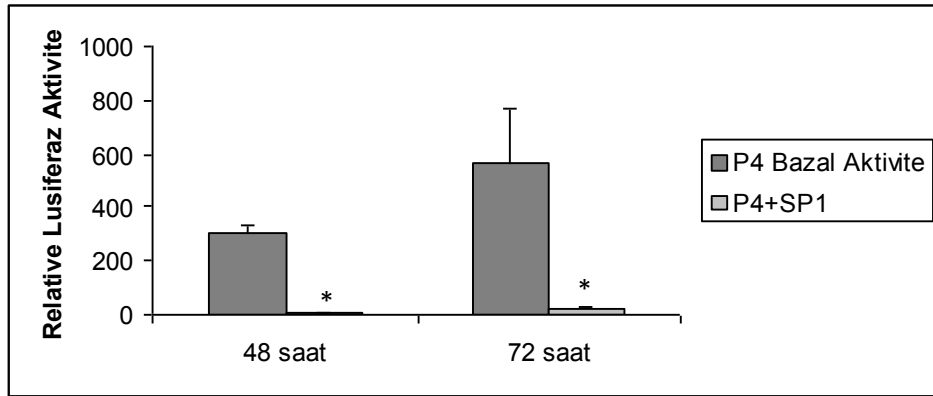
**Şekil 3.40:** P1 (1834 bç) ADAMTS-1 promotor parçasına SP1 transkripsiyon faktörünün 48 ve 72 saatteki etkisi  $p < 0,05$



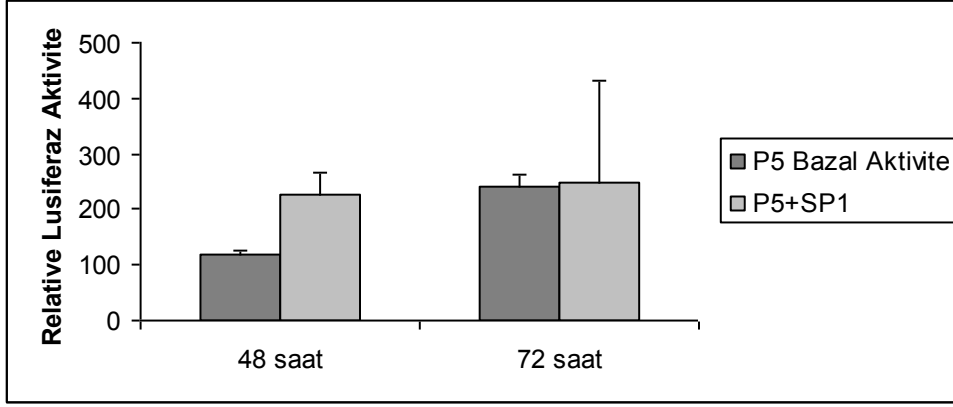
**Şekil 3.41:** P2 (1699 bç) ADAMTS-1 promotor parçasına SP1 transkripsiyon faktörünün 48 ve 72 saatteki etkisi p<0,05



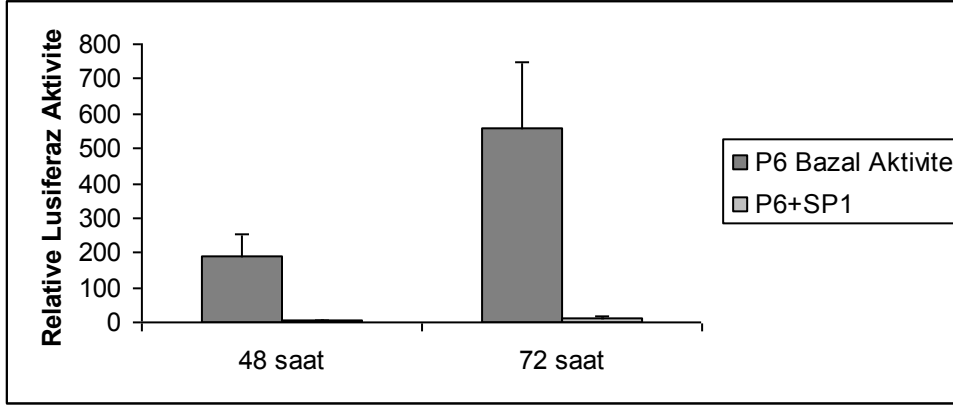
**Şekil 3.42:** P3 (1477 bç) ADAMTS-1 promotor parçasına SP1 transkripsiyon faktörünün 48 ve 72 saatteki etkisi p<0,05



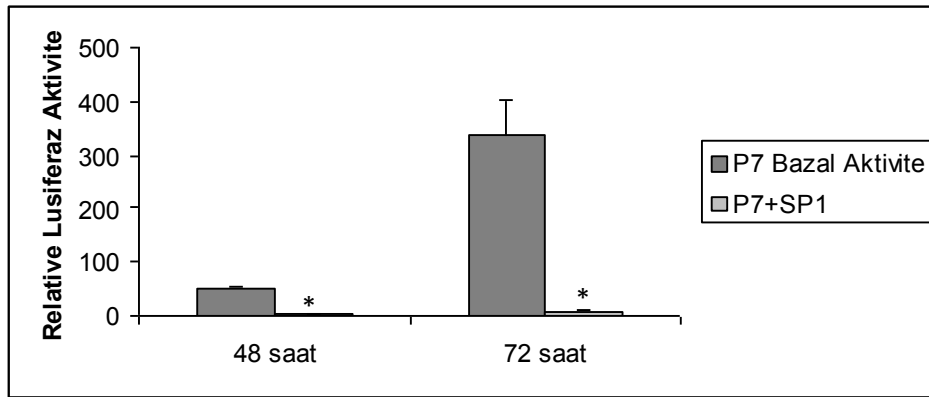
**Şekil 3.43:** P4 (1166 bç) ADAMTS-1 promotor parçasına SP1 transkripsiyon faktörünün 48 ve 72 saatteki etkisi p<0,05



**Şekil 3.44:** P5 (912 bç) ADAMTS-1 promotor parçasına SP1 transkripsiyon faktörünün 48 saatteki etkisi  $p>0,05$



**Şekil 3.45:** P6 (657 bç) ADAMTS-1 promotor parçasına SP1 transkripsiyon faktörünün 48 saatteki etkisi  $p=0,05$



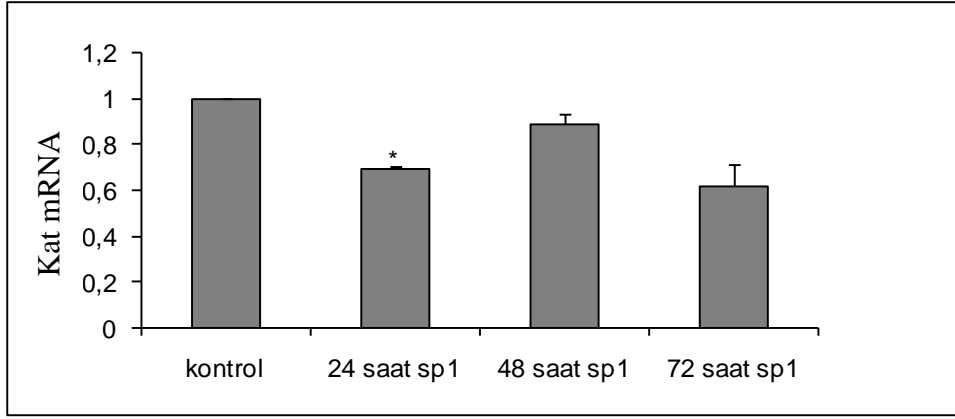
**Şekil 3.46:** P7 (548 bç) ADAMTS-1 promotor parçasına SP1 transkripsiyon faktörünün 48 saatteki etkisi  $p<0,05$

### **3.6.3.2 SP1 Transkripsiyon Faktörünün ADAMTS-1 mRNA Düzeyine Olan Etkilerinin Gerçek Zamanlı PZR (Q-PZR) ile Belirlenmesi**

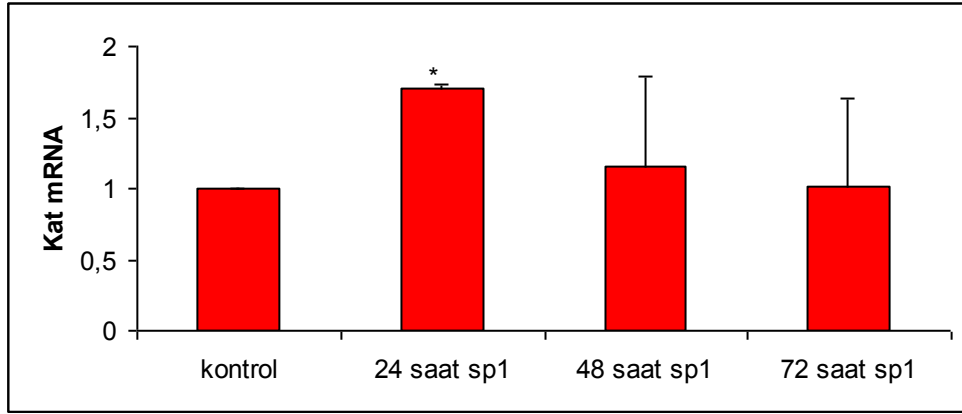
Farklı transkripsiyon faktörlerinin insan ADAMTS-1 ekspresyon seviyesine etkilerinin belirlenmesi için ADAMTS-1 ifadesinin tarafımızca gösterildiği hücre hattı olan Hep3B hücre hattı kullanıldı. Hep3B hücrelerinde ADAMTS-1 ifadesi üzerine seçtiğimiz transkripsiyon faktörlerinin etkisi hem normal hemde hipoksik koşullarda çalışıldı. Bu amaçla SP1 transkripsiyon faktörü Hep3B hücrelerine transfekte edilerek ADAMTS-1 mRNA düzeyindeki etkili olup olmadığı belirlendi. 25cm<sup>2</sup> flasklarda transfeksiyondan 24 saat önce hücreler yaklaşık 2.000.000 olacak şekilde yayıldı ve transfekte edilecek transkripsiyon faktörleri 10 µg son konsantrasyonda olacak şekilde hem normal oksijen koşullarında hemde CoCl<sub>2</sub> ile oluşturulmuş hipoksik koşullarda uygulandı. Hücrelerden total RNA izole edildi ve bölüm 2.2.5 da anlatıldığı şekilde cDNA eldesi gerçekleştirildi. Daha sonra her deney seti için 2 tekrarlı olarak aşağıda Bioneer gerçek zamanlı PZR kiti kullanılarak bölüm 2.2.5.6'da belirtilen koşullarda gerçek zamanlı PZR yapıldı. Sonuçlar Livak metoduna göre bölüm 2.2.5.6'da anlatıldığı şekilde değerlendirildi.

Gerçek zamanlı qRT-PZR sonuçları analiz edildiğinde zamana bağlı olarak SP1 transkripsiyon faktörüne ait grafikler şekil 3.47 ve şekil 3.48'de görülmektedir. Kontrol gruplarıyla deneylerin arasındaki farkın istatistiki olarak önemli olup olmadığı One way ANOVA testi kullanılarak belirlendi. SP1 transkripsiyon faktörünün 24 saatte istatistiksel olarak anlamlı bir azalışa sebep olduğu ancak hipoksik koşullarda tersi bir etki gözlemlendi.





Şekil 3.47: SP1'in ADAMTS-1 ekspresyonuna olan etkisi (Normal oksijen koşulları)



Şekil 3.48: SP1'in ADAMTS-1 ekspresyonuna olan etkisi (Hipoksik koşullar)

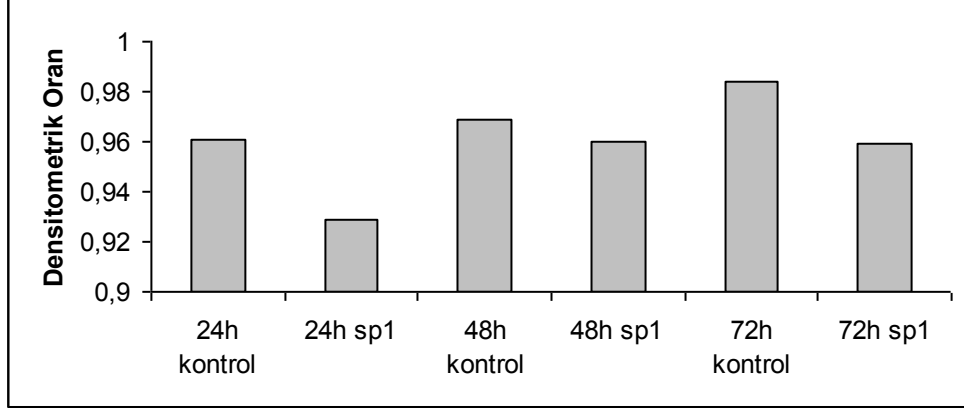
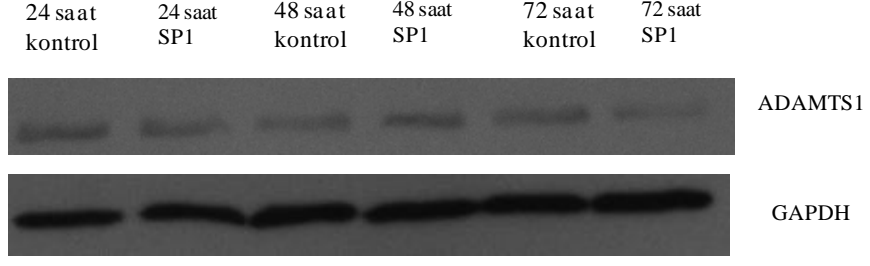
### 3.6.3.3 SP1 Transkripsiyon Faktörünün ADAMTS-1 Protein Seviyesine Etkilerinin Belirlenmesi

Hep3B hücrelerinde ADAMTS-1 ifadesi üzerine protein düzeyinde etkisinin belirlenmesi için western Blot analizi kullanıldı. SP1 transkripsiyonunun ADAMTS1 genine protein düzeyinde etkisi hem normal hemde hipoksik koşullarda çalışıldı. Bu amaçla SP1 Hep3B hücrelerine transfekte edilerek ADAMTS-1 protein düzeyinde etkili olup olmadığı belirlendi. 25cm<sup>2</sup> flasklarda transfeksiyondan 24 saat önce hücreler yaklaşık 2.000.000 olacak şekilde yayıldı ve transfekte edilecek

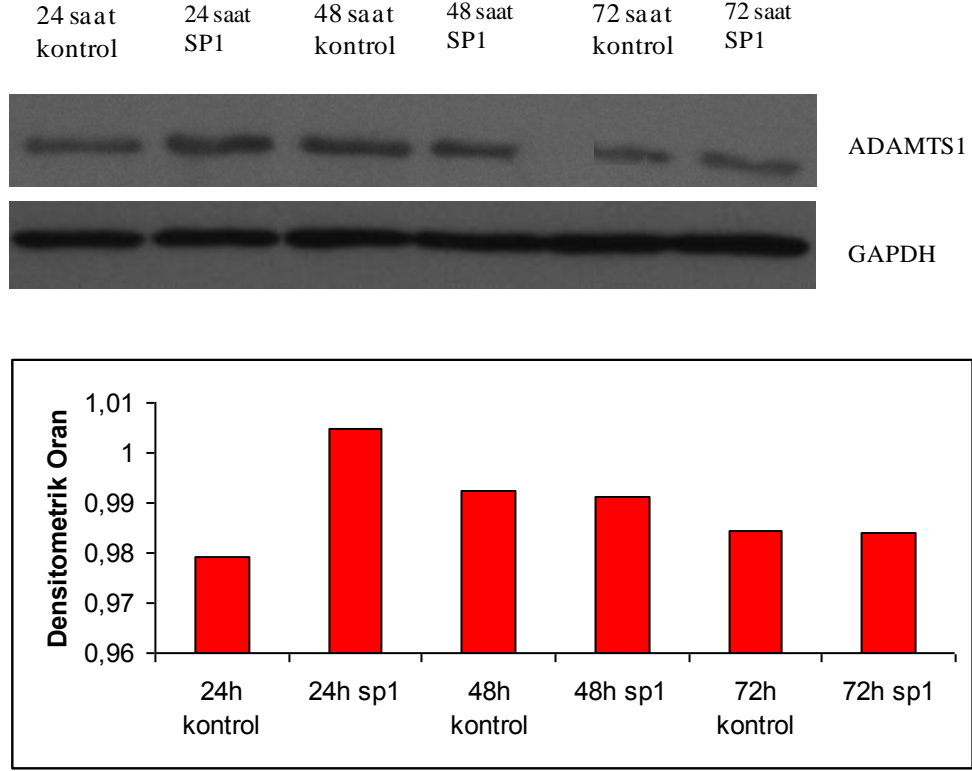
transkripsiyon faktörleri 10 µg son konsantrasyonda olacak şekilde hem normal oksijen koşullarında hemde CoCl<sub>2</sub> ile oluşturulmuş hipoksik koşullarda uygulandı. 24, 48 ve 72 zaman dilimleri sonunda Bölüm 2.2.6.2’de anlatıldığı şekilde Laemli buffer kullanılarak protein örnekleri hazırlandı. Daha sonra örnekler bölüm 2.2.6.3’de SDS PAGE metoduna göre yürütüldü. Örneklerin jelde yürümesi tamamlandıktan sonra SDS jelinin blotlaması Bölüm 2.2.5.4’de anlatıldığı şekilde yapıldı.

Transfer sonrası membrana immuno blotlama işlemi uygulandı. Membranlar sırasıyla primer antikor ve sekonder antikor ile muamele edildi. Ayrıca semi kantitatif çalışmalarında ADAMTS-1 bantları normalizasyon amaçlı β-aktin bantlarıyla oranlanmıştır. Proteinlerin belirlenmesi ve sonuçların filme aktarımı Bölüm 2.2.5.6’da anlatıldığı gibi yapıldı. Otoradyografi ile elde edilen sinyaller densitometrik analiz ile değerlendirildi. Western blot deneyinin film üzerindeki ADAMTS-1 ve β-Aktin bantları denstometrik olarak analiz edildi.

SP1 transkripsiyon faktörünün protein seviyesinde özellikle 24 saatte azalışa sebep olduğu gözlemlendi ancak hipoksik koşullarda tersi olarak bir artışa sebep olduğu gözlemlendi.



**Şekil 3.49:** SP1 transkripsiyon faktörünün normal oksijen koşullarında ADAMTS-1 Protein Seviyesine Etkisi



**Şekil 3.50:** SP1 transkripsiyon faktörünün hipoksik koşullarda ADAMTS-1 Protein Seviyesine Etkisi

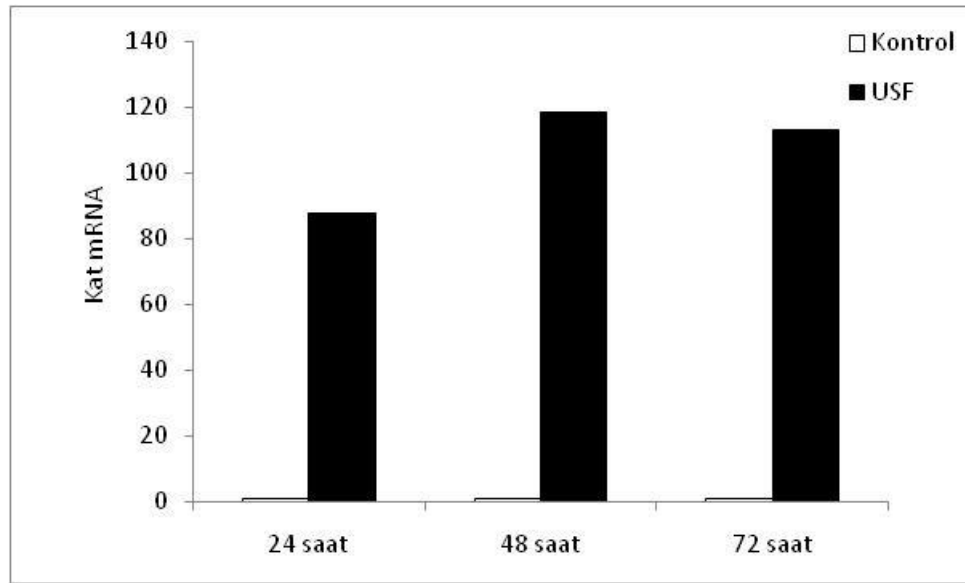
### 3.6.4 USF Transkripsiyon Faktörünün ADAMTS-1 üzerindeki Etkisinin Belirlenmesi

#### 3.6.4.1 USF Transkripsiyon Faktörünün ADAMTS-1 promotor parçaları üzerindeki Etkisinin Belirlenmesi

USF (Upstream stimulatory factor 1) olarak adlandırılan bir transkripsiyon faktörüdür. ADAMTS-1 promotor bölgesinde 2 muhtemel USF bağlanma bölgesi bulunmaktadır. USF transkripsiyon faktörlerinin ADAMTS1 promotor parçaları üzerinde etkilerini belirlemek, mRNA ve protein düzeyinde herhangi bir etkisi olup olmadığını belirlemek için USF taşıyan ekspresyon vektörünün Hep3B hücrelerinde ektopik olarak ifade edildi. Ekspresyon plasmidi Dr.Dipak Ramji Cardiff Üniversitesi U.K.'den temin edilmiştir. Bu amaçla farklı promotor parçaları ile transkripsiyon faktörünü içeren ekspresyon plasmiti aynı anda Hep3B hücrelerine

transfekte edildi. Hep3B hücrelerinde promotor parçalarının farklı inkübasyon aralıklarında transkripsiyonel aktiviteleri belirlendi.

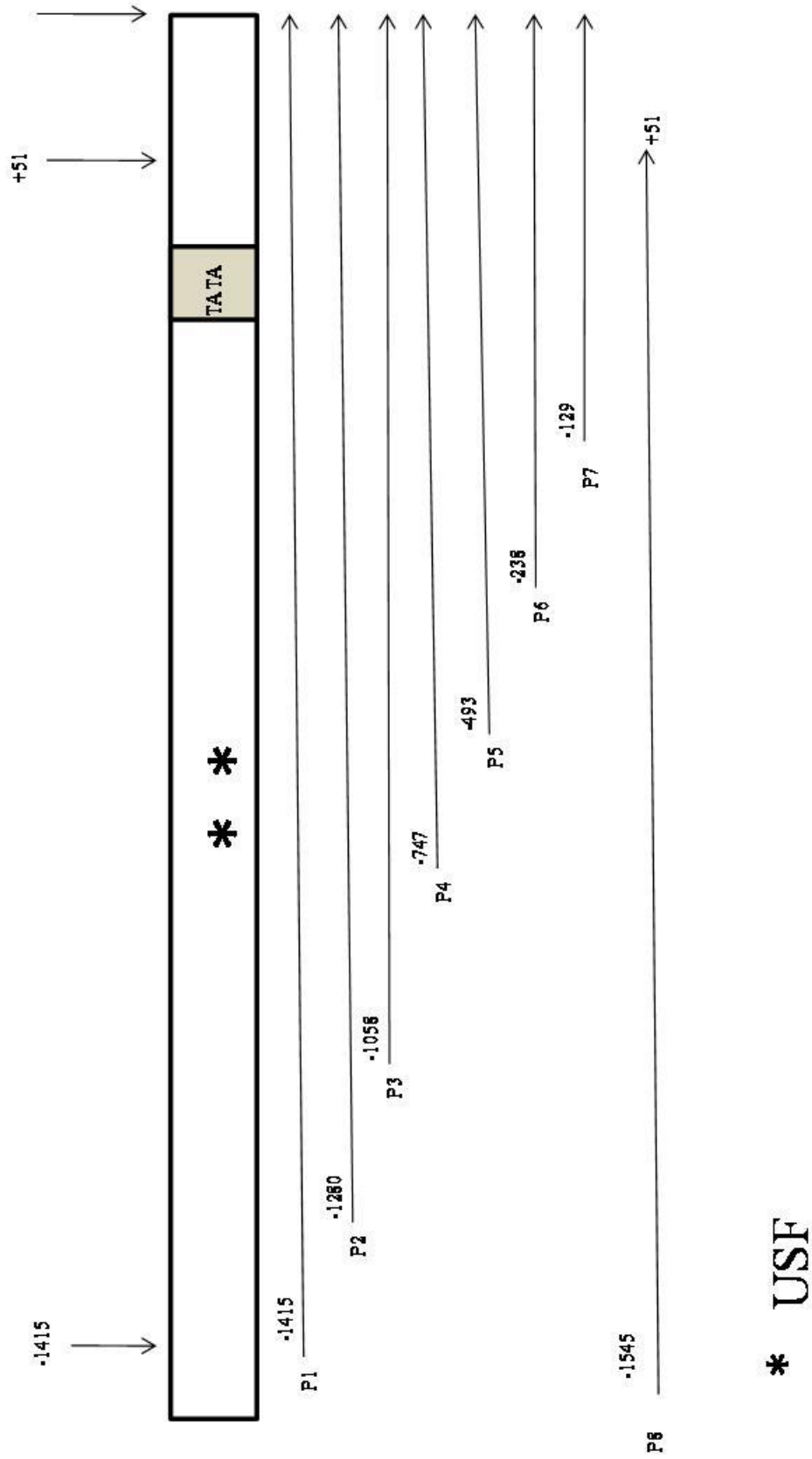
USF transkripsiyon faktörünün Hep3B hücrelerindeki ekspresyonu USF için spesifik primerler kullanılarak gerçek zamanlı PZR ile kontrol edildi (Şekil 3.51). Ekspresyon vektörü transfekte edilmiş Hep3B hücrelerinden total RNA izole edildi ve bölüm 2.2.5 da anlatıldığı şekilde cDNA eldesi gerçekleştirildi. Ekspresyon vektörü transfekte edilmeyen hücreler kontrol olarak kullanılarak gerçek zamanlı PZR gerçekleştirildi. Sonuçlar Livak metoduna göre değerlendirildi. Şekil 3.50’de görüldüğü üzere ektopik olarak USF ‘in hücrelerde oldukça iyi bir şekilde ifade olduğu mRNA düzeyinde tespit edildi.



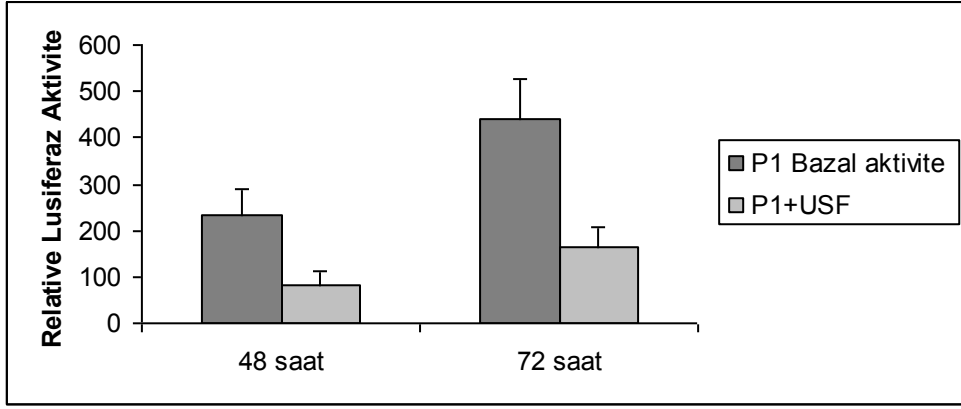
**Şekil 3.51:** Ektopik olarak üretilen USF’nin mRNA ifadesinin gerçek zamanlı PZR ile gösterilmesi

Transfeksiyonlarda 0,5 µg promotor parçası taşıyan pmetluc vektörü, 0,5 µg pSEAP vektörü ve 2 µg USF transkripsiyon faktörü taşıyan ekspresyon vektörü kalsiyum fosfat presipitasyon metoduna göre Hep3B hücrelerine transfekte edildi. Ayrıca aynı deneyde tüm promotor parçalarının bazal aktiviteleri de çalışıldı. Kotransfeksiyonlarda elde edilen Lusiferaz aktivitelerinin SEAP aktivitelerine oranlanmasıyla elde edilen deney sonuçları, promotor parçalarının bazal aktiviteleriyle elde edilen deney sonuçlarıyla karşılaştırıldı. USF transkripsiyon

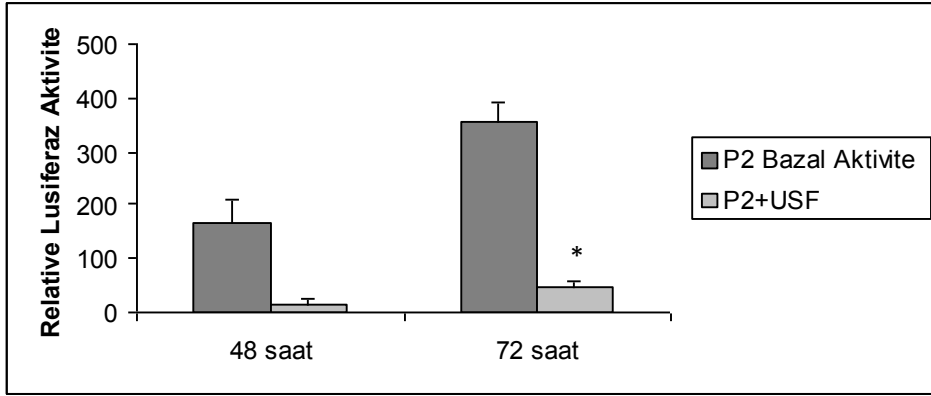
faktörünün promotor parçaları üzerinde transkripsiyonu azaltıcı etki gösterdiği sonucuna varıldı. Sonuçlar şekil 3.53 ile 3.59 arasında gösterilmiştir.



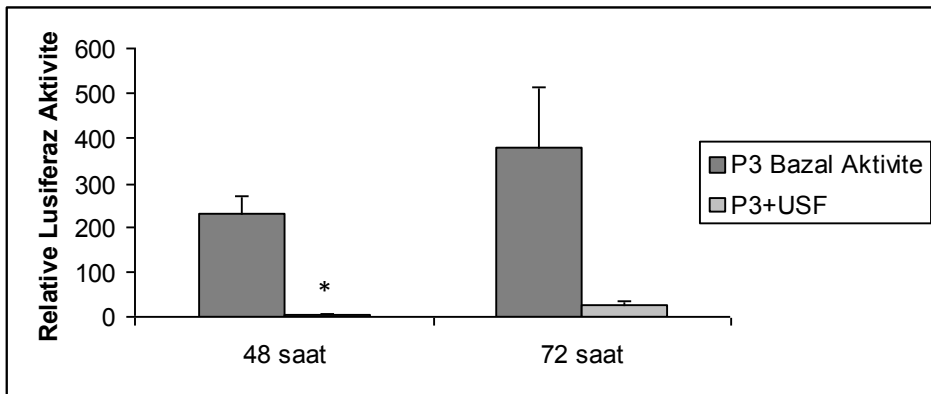
Şekil 3.52: USF transkripsiyon faktörü bağlanma bölgeleri



**Şekil 3.53:** P1 (1834 bç) ADAMTS-1 promotor parçasına USF transkripsiyon faktörünün 48 ve 72 saatteki etkisi 48 saatteki  $p>0,05$ , 72 saatteki  $p=0,05$

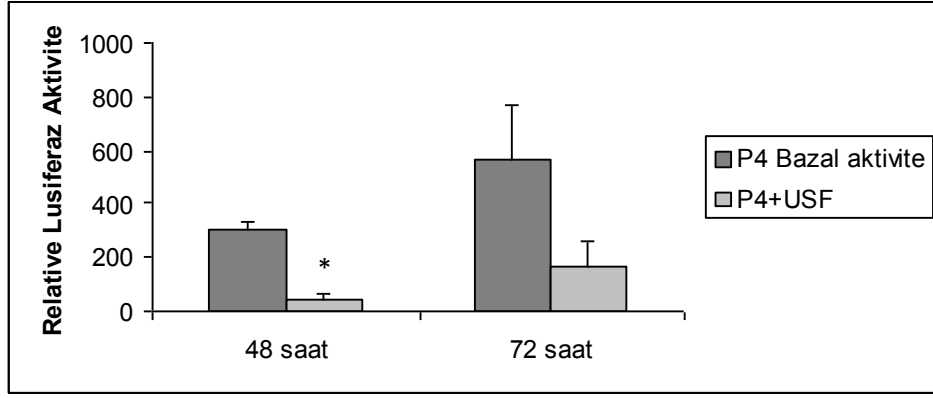


**Şekil 3.54:** P2 (1699 bç) ADAMTS-1 promotor parçasına USF transkripsiyon faktörünün 48 ve 72 saatteki etkisi 48 saat için  $p=0,05$ ; 72 saat için  $p<0,05$

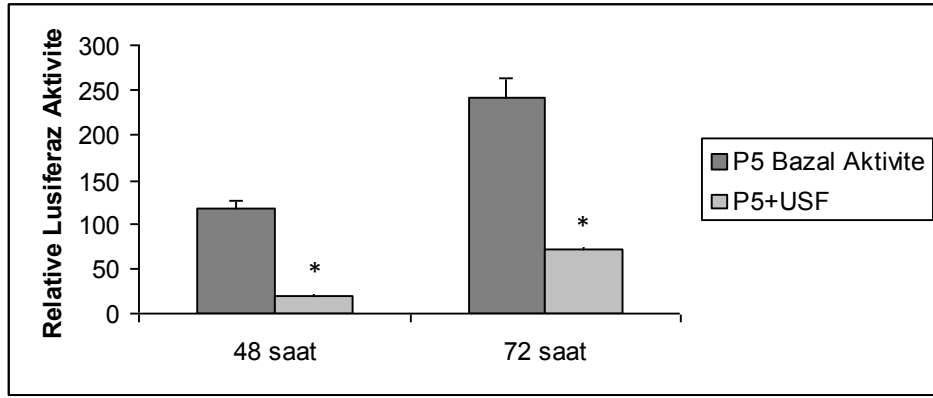


**Şekil 3.55:** P3 (1477 bç) ADAMTS-1 promotor parçasına USF transkripsiyon faktörünün 48 ve 72 saatteki etkisi. (48 saat  $p<0,05$ ; 72 saat  $p>0,05$ )

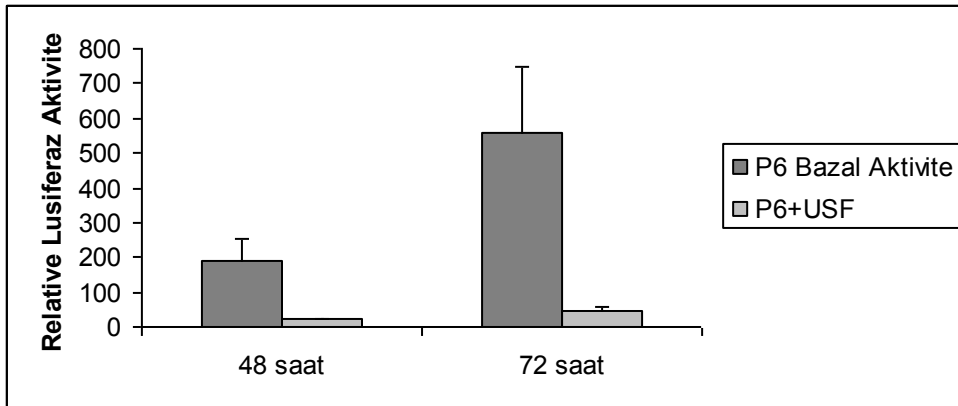




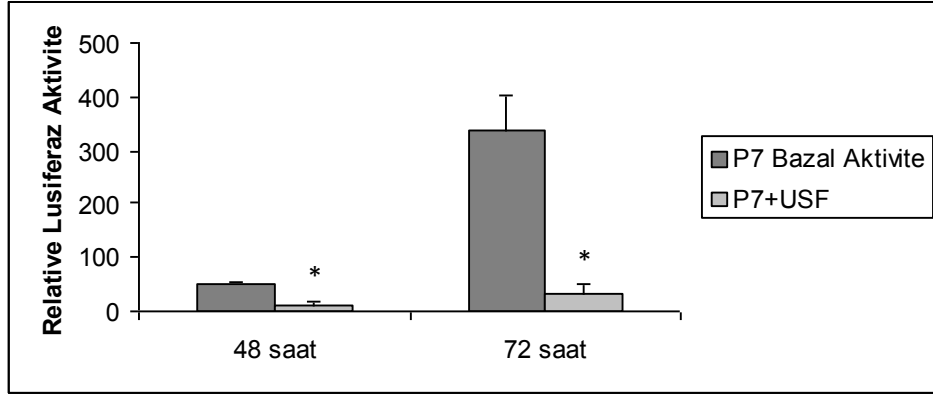
**Şekil 3.56:** P4 (1166 bç) ADAMTS-1 promotor parçasına USF transkripsiyon faktörünün 48 ve 72 saatteki etkisi 48 saat için  $p<0,05$ ; 72 saat için  $p>0,05$



**Şekil 3.57:** P5 (912 bç) ADAMTS-1 promotor parçasına USF transkripsiyon faktörünün 48 saatteki etkisi  $p<0,05$



**Şekil 3.58:** P6 (657 bç) ADAMTS-1 promotor parçasına USF transkripsiyon faktörünün 48 ve 72 saatteki etkisi  $p>0,05$



**Şekil 3.59:** P7 (548 bç) ADAMTS-1 promotor parçasına USF transkripsiyon faktörünün 48 ve saatteki etkisi  $p < 0,05$

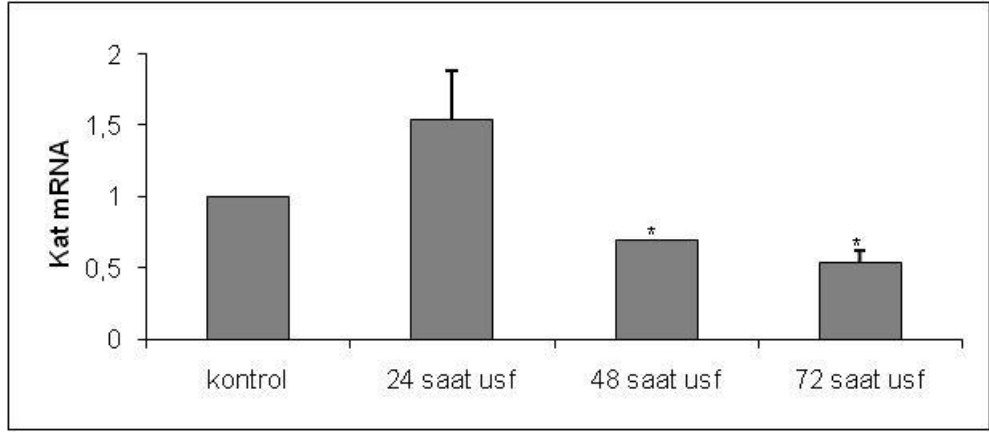
#### **3.6.4.2 USF Transkripsiyon Faktörünün ADAMTS-1 mRNA Düzeyine Olan Etkilerinin Gerçek Zamanlı PZR (Q-PZR) ile Belirlenmesi**

Hep3B hücrelerinde ADAMTS-1 ifadesi üzerine seçtiğimiz transkripsiyon faktörlerinin etkisi hem normal hemde hipoksik koşullarda çalışıldı. Bu amaçla USF transkripsiyon faktörleri Hep3B hücrelerine transfekte edilerek ADAMTS-1 mRNA düzeyindeki etkili olup olmadığı belirlendi. USF ekspresyon vektörü transfekte edilmiş hücrelerden total RNA izolasyonu yapıldı. Daha sonra her deney seti için 2 tekrarlı olarak aşağıda Bioneer gerçek zamanlı PZR kiti kullanılarak bölüm 2.2.5.6'da belirtilen koşullarda gerçek zamanlı PZR yapıldı. Sonuçlar Livak metoduna göre bölüm 2.2.5.6'da anlatıldığı şekilde değerlendirildi.

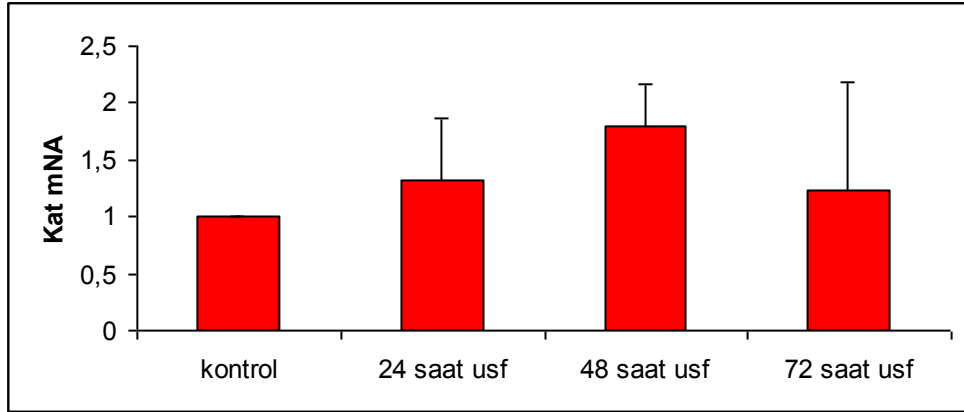
Gerçek zamanlı qRT-PZR sonuçları analiz edildiğinde zamana bağlı olarak USF transkripsiyon faktörüne ait grafikler şekil 3.60 ve şekil 3.61'de görülmektedir. Kontrol gruplarıyla deneylerin arasındaki farkın istatistiki olarak önemli olup olmadığı One way ANOVA testi kullanılarak belirlenmiştir.

USF uygulamasının Hep3B hücrelerinde 48 ve 72 saatte ADAMTS-1 mRNA seviyesinde azalışa sebep olduğu gözlemlendi. Farklı uzunluklardaki ADAMTS-1 promotor parçalarının transkripsiyonel aktivitesinde de azalışa sebep olmaktadır. Hipoksik koşullarda ADAMTS-1 ifadesinde artış tüm uygulanan USF ve SP1 transkripsiyon faktörlerinde tespit edildi. Bu durumun ADAMTS-1 hipoksik

durumlarda artışı ile ilgili olduğu ve bu transkripsiyon faktörlerinin etkisinden bağımsız olduğunu düşündürmektedir.



**Şekil 3.60:** USF'in ADAMTS-1 ekspresyonuna olan etkisi (Normal oksijen koşulları)

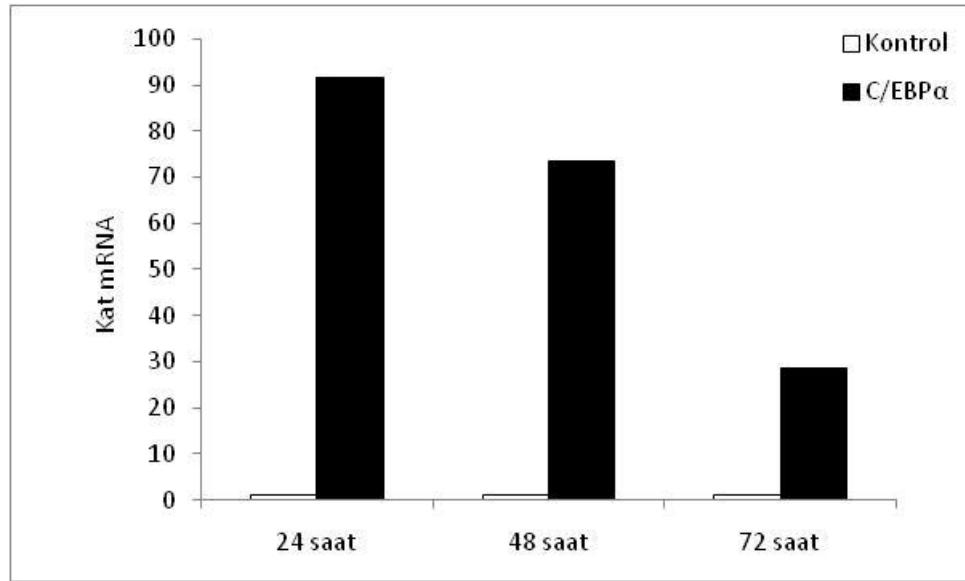


**Şekil 3.61:** USF'in ADAMTS-1 ekspresyonuna olan etkisi (Hipoksik koşullar)

### 3.6.5 C/EBP $\alpha$ Transkripsiyon Faktörünün ADAMTS-1 üzerindeki Etkisinin Belirlenmesi

#### 3.6.5.1 C/EBP $\alpha$ Transkripsiyon Faktörünün ADAMTS-1 promotör parçaları üzerindeki Etkisinin Belirlenmesi

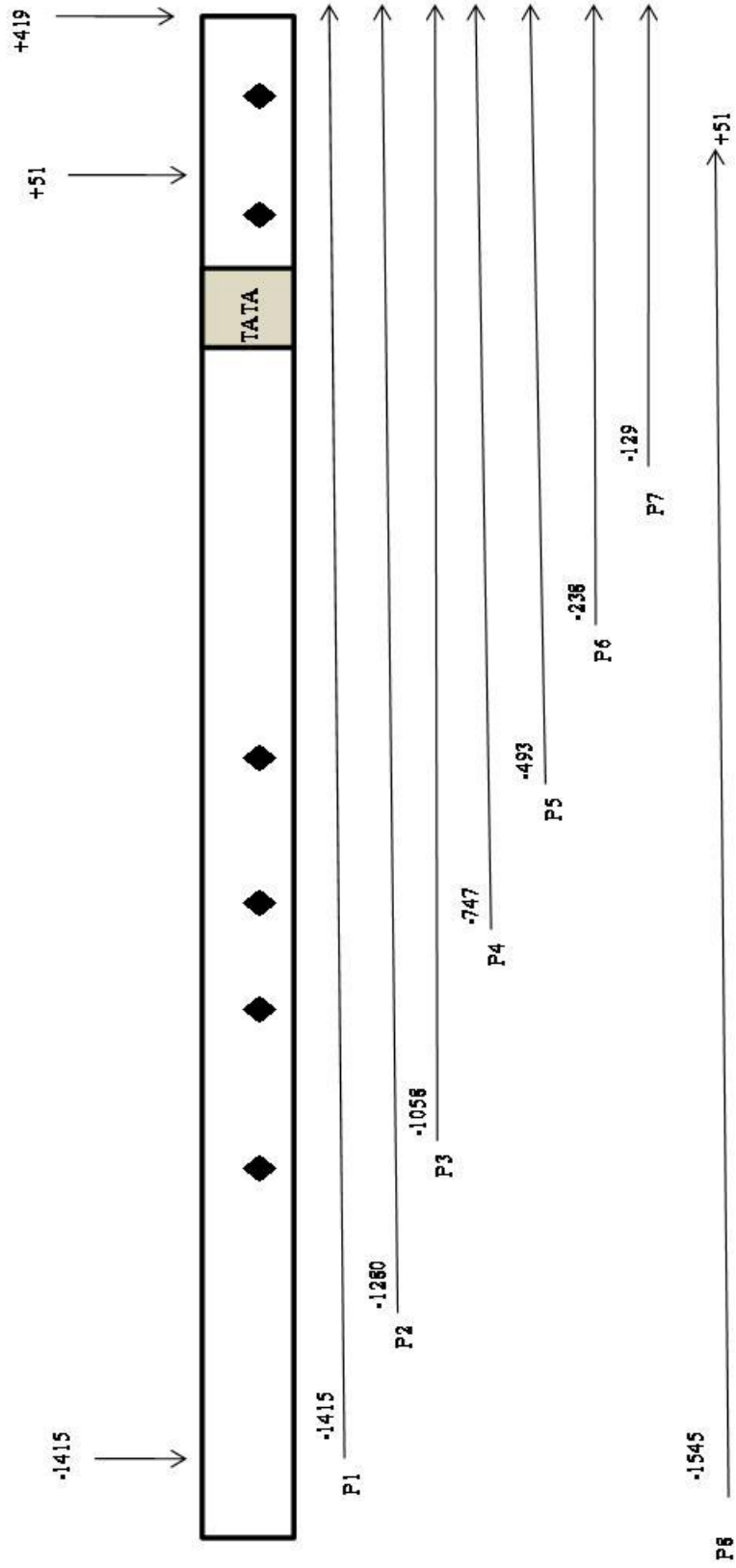
C/EBP $\alpha$  (CCAAT/Enhanser Binding Protein) hücre farklılaşmasında önemli görevleri olan bir transkripsiyon faktörüdür. C/EBP $\alpha$  transkripsiyon faktörlerini taşıyan ekspresyon vektörleri Dr.Dipak Ramji Cardiff Üniversitesi'nden temin edilmiştir. Ekzojen olarak ekspre olmuş transkripsiyon faktörlerinin direkt olarak ADAMTS-1'in transkripsiyonel aktivitesini etkileyip etkilemediklerinin belirlenmesi amaçlandı. C/EBP $\alpha$  transkripsiyon faktörünün Hep3B hücrelerindeki ekspresyonu C/EBP $\alpha$  için spesifik primerler kullanılarak gerçek zamanlı PZR ile kontrol edildi (Şekil 3.62).



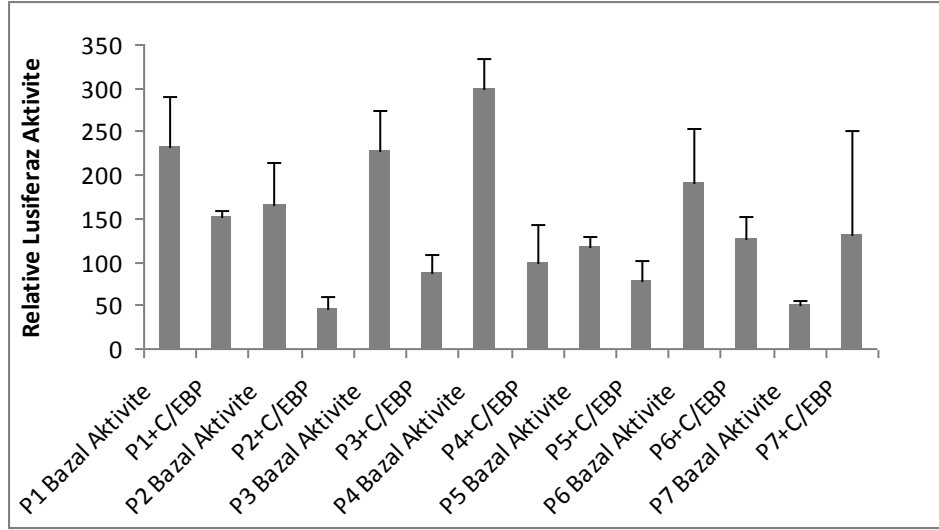
**Şekil 3.62:** Ektopik olarak üretilen C/EBP $\alpha$ 'nın mRNA ifedisinin gerçek zamanlı PZR ile gösterilmesi

mRNA ve protein analizlerinde 25 cm<sup>2</sup> flasklarda transfeksiyondan 24 saat önce hücreler yaklaşık 2.000.000 olacak şekilde yayıldı ve transfekte edilecek ekspresyon vektörü 10  $\mu$ g son konsantrasyonda olacak şekilde uygulandı. Hücrelerden total RNA izole edildi ve bölüm 2.2.5'de anlatıldığı şekilde cDNA

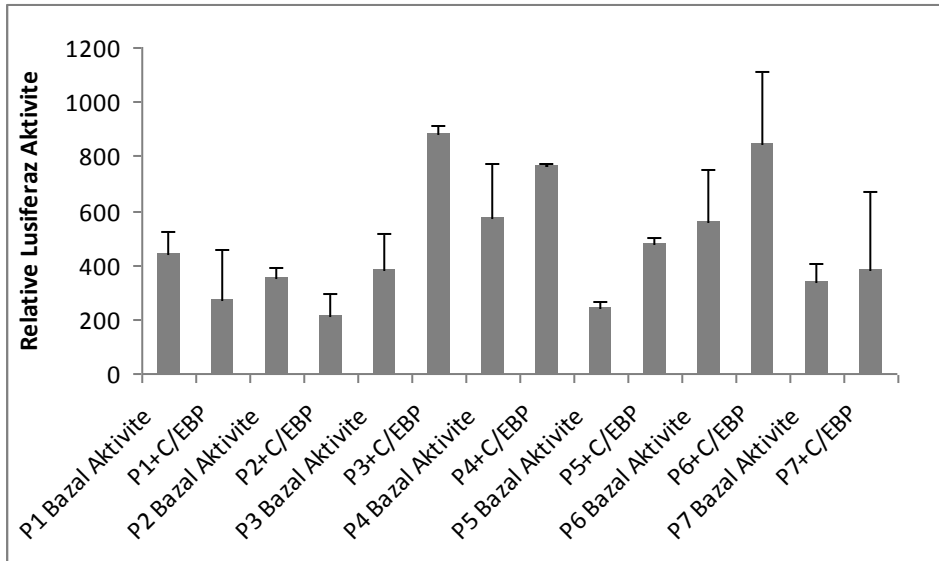
eldesi gerçekleştirildi. Ekspresyon vektörü transfekte edilmeyen hücreler kontrol olarak kullanılarak gerçek zamanlı PZR gerçekleştirildi. Sonuçlar Livak metoduna göre değerlendirildi. Bu amaçla farklı promotor parçaları ile transkripsiyon faktörünü içeren ekspresyon plasmiti aynı anda Hep3B hücrelerine transfekte edildi. Hep3B hücrelerinde promotor parçalarının farklı inkübasyon aralıklarında transkripsiyonel aktiviteleri belirlendi. Transfeksiyonlarda 0,5 µg promotor parçası taşıyan pmetluc vektörü, 0,5 µg pSEAP vektörü ve 2 µg C/EBPα transkripsiyon faktörü taşıyan ekspresyon vektörü kalsiyum fosfat presipitasyon metoduna göre Hep3B hücrelerine transfekte edildi. Transfeksiyon deneyleri 12 kuyulu plakalarda 3 tekrarlı olarak çalışılmış ve birbirinden bağımsız 3 deney yapıldı. Ayrıca aynı deneyde tüm promotor parçalarının bazal aktiviteleri de çalışıldı. Kotransfeksiyonlarda elde edilen Lusiferaz aktivitelerinin SEAP aktivitelerine oranlanmasıyla elde edilen deney sonuçları, promotor parçalarının bazal aktiviteleriyle elde edilen deney sonuçlarıyla karşılaştırıldı. C/EBPα transkripsiyon faktörünün her bir promotor parçasına olan etkisi istatistiksel olarak değerlendirildi. C/EBPα Transkripsiyon Faktörünün ADAMTS-1 promotor parçaları üzerinde istatistiksel olarak anlamlı etkisi saptanmamıştır. Tüm istatistiki analizler değerlendirildiğinde 48. Saatte 4. Promotor bölgesi dışında diğer bölgeler  $p>0,05$  bulundu. Ancak 72. Saatte 4. Promotor bölgesindeki anlamlı görülen etki yok olmuştur. Delesyon promotor parçalarının değerlendirilmesindeki bu sınırdaki etki anlamlı olarak bulunmamıştır.



Şekil 3.63: C/EBP $\alpha$  transkripsiyon faktörünün bağlanma bölgeleri



**Şekil 3.64:** Promotor parçalarına C/EBP $\alpha$  transkripsiyon faktörünün 48 saatteki etkisi  $p>0,05$

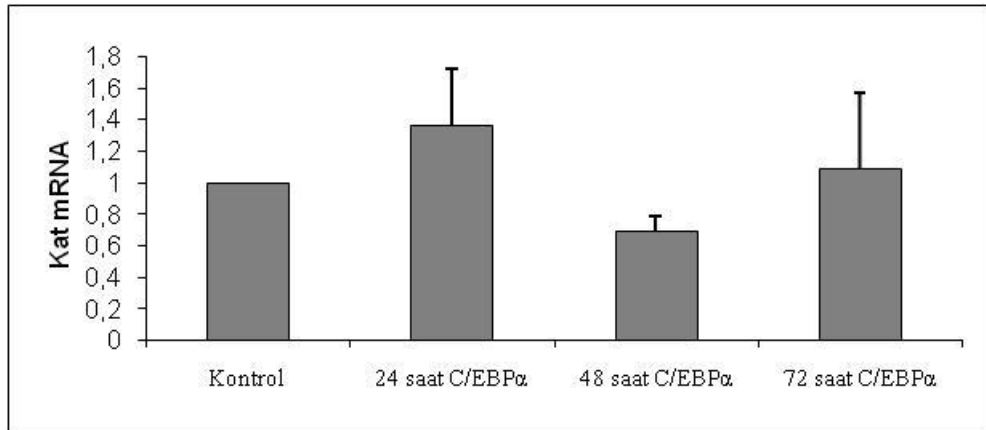


**Şekil 3.65:** Promotor parçalarına C/EBP $\alpha$  transkripsiyon faktörünün 72 saatteki etkisi  $p>0,05$

### 3.6.5.2 C/EBP $\alpha$ Transkripsiyon Faktörünün ADAMTS-1 mRNA Düzeyine Olan Etkilerinin Gerçek Zamanlı PZR (Q-PZR) ile Belirlenmesi

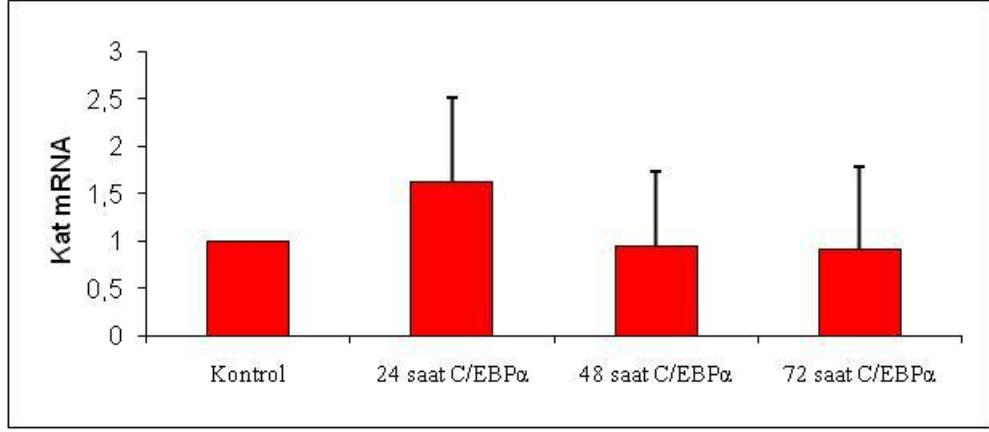
Hep3B hücrelerinde ADAMTS-1 ifadesi üzerine seçtiğimiz C/EBP $\alpha$  transkripsiyon faktörlerinin etkisi hem normal hemde hipoksik koşullarda çalışıldı. Bu amaçla 25cm<sup>2</sup> flasklarda transfeksiyon yapıldı, hem normal oksijen koşullarında hemde CoCl<sub>2</sub> ile oluşturulmuş hipoksik koşullarda uygulandı. Hücrelerden total RNA izole edildi ve Bioneer gerçek zamanlı PZR kiti kullanılarak bölüm 2.2.5.6'da belirtilen koşullarda gerçek zamanlı PZR yapıldı. Sonuçlar Livak metoduna göre değerlendirildi ve istatistiksel analizleri yapıldı.

C/EBP $\alpha$  transkripsiyon faktörünün ne normal koşullarda nede hipoksik koşullarda ADAMTS-1 ekspresyonuna istatistiksel olarak anlamlı bir etkisi bulunmamıştır.



**Şekil 3.66:** C/EBP $\alpha$ 'in ADAMTS-1 ekspresyonuna olan etkisi (Normal oksijen koşulları)





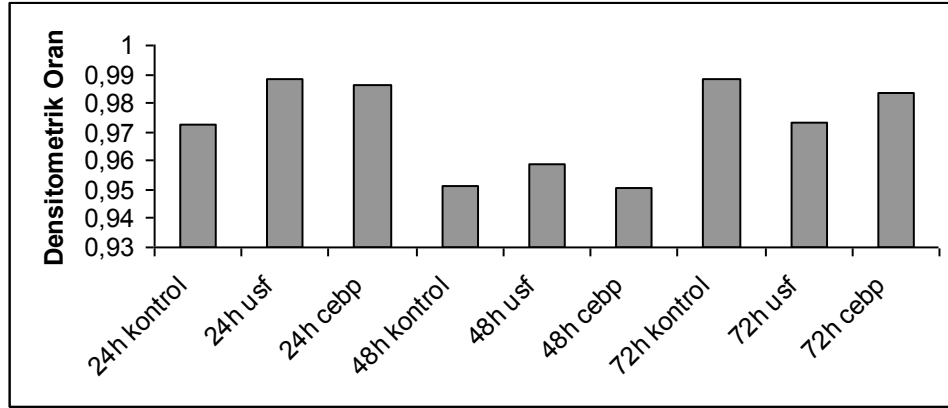
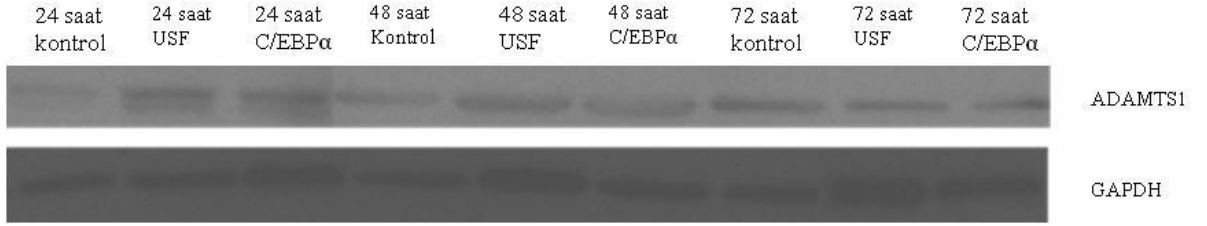
**Şekil 3.67:** C/EBPα 'in ADAMTS-1 ekspresyonuna olan etkisi (Hipoksik koşullar)

### 3.6.5.3 USF ve C/EBPα Transkripsiyon Faktörünün ADAMTS-1 Protein Seviyesine Etkilerinin Belirlenmesi

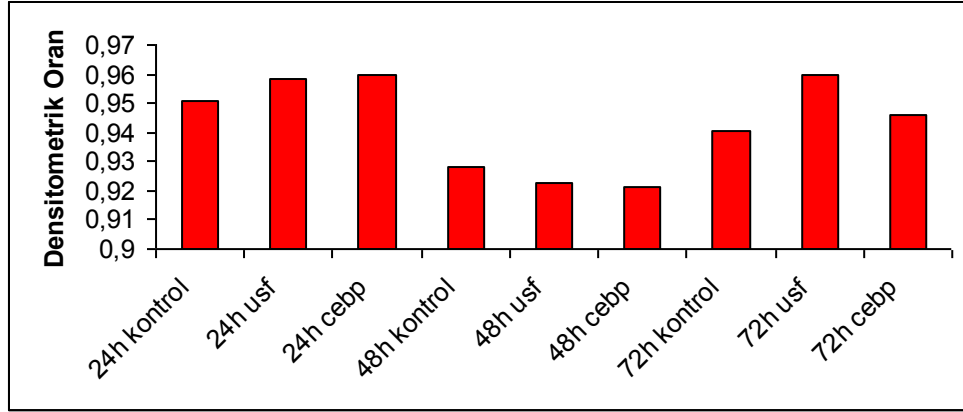
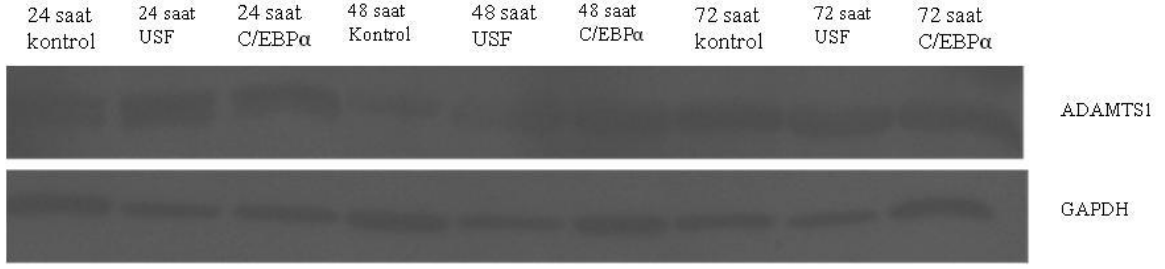
Bu amaçla USF ve C/EBPα transkripsiyon faktörleri Hep3B hücrelerine transfekte edilerek ADAMTS-1 protein düzeyinde etkili olup olmadığı belirlendi. 25cm<sup>2</sup> flasklarda transfeksiyondan 24 saat önce hücreler yaklaşık 2.000.000 olacak şekilde yayıldı ve transfekte edilecek transkripsiyon faktörleri 10 µg son konsantrasyonda olacak şekilde hem normal oksijen koşullarında hemde CoCl<sub>2</sub> ile oluşturulmuş hipoksik koşullarda uygulandı. 24, 48 ve 72 zaman dilimleri sonunda Bölüm 2.2.6.2'de anlatıldığı şekilde Laemli buffer kullanılarak protein örnekleri hazırlandı. Daha sonra örnekler bölüm 2.2.6.3'de SDS PAGE metoduna göre elektrik akımında yürütüldü. Örneklerin jelde yürümesi tamamlandıktan sonra SDS jelinin blotlaması Bölüm 2.2.5.4'de anlatıldığı şekilde yapıldı.

Proteinlerin belirlenmesi ve sonuçların filme aktarımı Bölüm 2.2.5.6'da anlatıldığı gibi yapıldı. Westren blot deneyinin film üzerindeki ADAMTS-1 ve β-Aktin bantları denstrometrik olarak analiz edildi.

USF transkripsiyon faktörünün normal oksijen koşullarında sadece 72 saatte azalışa sebep olduğu ancak hipoksik koşullarda 24 saatte artışa sebep olduğu görüldü. C/EBPα transkripsiyon faktörünün normal koşullarda herhangi bir etkisi görülmezken, hipoksik koşullarda ADAMTS-1 protein seviyesinde USF ve SP1'de olduğu gibi artış etkisi gözlemlendi.



**Şekil 3.68:** USF ve C/EBP $\alpha$  transkripsiyon faktörünün normal oksijen koşullarında ADAMTS-1 Protein Seviyesine Etkisi (1: 24 saat kontrol, 2: 24 saat USF uygulanan, 3: 24 saat C/EBP $\alpha$  uygulanan, 4: 48 saat kontrol, 5: 48 saat USF uygulanan, 6: 48 saat C/EBP $\alpha$  uygulanan, 7: 72 saat kontrol, 8: 72 saat USF uygulanan, 9: 72 saat C/EBP $\alpha$  uygulanan; üst film ADAMTS-1, alt film GAPDH)



**Şekil 3.69:** USF ve C/EBP $\alpha$  transkripsiyon faktörünün hipoksik koşullarda ADAMTS-1 Protein Seviyesine Etkisi (1: 24 saat kontrol, 2: 24 saat USF uygulanan, 3: 24 saat C/EBP $\alpha$  uygulanan, 4: 48 saat kontrol, 5: 48 saat USF uygulanan, 6: 48 saat C/EBP $\alpha$  uygulanan, 7: 72 saat kontrol, 8: 72 saat USF uygulanan, 9: 72 saat C/EBP $\alpha$  uygulanan; üst film ADAMTS-1, alt film GAPDH)

#### 4. SONUÇ VE ÖNERİLER

Ekstraselüler matriksin proteolitik yıkımında proteaz aktivitesine sahip çok sayıda molekül görev alır. Bu moleküller domain yapılarına göre çok sayıda protein ailesi olarak gruplandırılır. ADAM ailesi proteinlerinin geniş ölçüde tanımlanmasının ardından ADAM-ilişkili yeni bir grup proteinin varlığı Kuno ve arkadaşları [3] tarafından 1997 yılında gösterilmiştir. Kuno ve arkadaşları farelere, enjekte ettikleri bir hücre hattıyla kaşeksik kolon kanseri modeli oluşturmuşlar ve bu kanser türünde ifade olan genleri belirlemişlerdir. Bu çalışmada, ADAM protein ailesinin üyelerine çok benzeyen, trombospondin tip 1 (TSP1) motifleri taşıyan ve inflamasyonla ilişkili olan bir protein klonlanmıştır. Araştırmacılar, bu yeni üyeyi tanımlamak için ADAMTS (a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs) adını kullanmışlardır. ADAM ailesi üyelerinin aksine, hücre membranında yer almayıp, ekstraselüler matrikse salgılanan ADAMTS'ler; ADAM ailesi üyelerinin sahip oldukları tüm domainleri içermelerine rağmen, kendilerine özgü TSP1 motifleri de buldukları için ADAM üyeleri olarak kabul edilmemiştir ve yeni bir aileyi oluşturmuşlardır [3].

İlk olarak Kuno ve arkadaşları tarafından 1997 yılında tanımlanmış olan ADAMTS-1 ilk üyesi olması nedeniyle diğer üyelere göre daha fazla çalışmalar yapılmıştır. 1999 yılında ADAMTS-1 vasküler endotelial büyüme faktörünün (VEGF) uyardığı anjiyogenezi inhibe ettiği ve fibroblast büyüme faktörü 2'nin uyardığı vaskülarizasyonu baskıladığı bulunmuştur. Bu özelliği nedeniyle anti-anjiyogenetik üyesi olarak tanımlanmıştır. Daha sonra ADAMTS-8'inde bu aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir [74]. ADAMTS-1 ve -8'in anti-anjiyogenetik aktivitelerine TS motiflerinin aracılık ettiği düşünülmektedir. Bu tekrar motifleri, trombospondin ailesinin beş üyesinden sadece TSP1 ve TSP2'de mevcut olan özel motiflerdir ve trombospondin ailesinin TS motifleri içermeyen diğer üç üyesi anti-anjiyogenetik etkiye sahip değildir. Son yıllarda elde edilen bulgular, ADAMTS-1'in anti-anjiyogenetik etkisinden sorumlu olan bölgenin C-terminalindeki iki TS motifi tekrarı olduğunu ve proteinin bu bölgeler sayesinde VEGF165'e bağlandığını göstermiştir [15, 69]. Yine, ADAMTS-1 ve -8'in birinci C-terminal TS tekrarında

bulunan ve ADAMTS-1 ile -8 dışındaki ADAMTS'ların hiçbirinde mevcut olmayan GWQRRL/TVECRD motifinin önemli bir role sahip olması olasılığı son derece yüksektir [12].

ADAMTS-1 proteinin Anti-anjiyogenetik etkisinin yanı sıra agrekanaz aktivitesine sahip olduğu çeşitli araştırmacılar tarafından gösterilmiştir. ADAMTS-1'in ayrıca agrekanın yanı sıra versikanı parçalayabildiği de bilinmektedir [19]. Yapılan bazı çalışmalar ADAMTS-1'in ekstrasellüler matriks üzerindeki etkisinin follikül üretilmesi için, versikanı degrades edici etkisinin ise ovülasyonun gerçekleşebilmesi için zorunlu olduğunu düşündürmektedir [19-22].

Anti-anjiyogenetik aktivitesi olan ADAMTS-1'in kanser tiplerindeki rolünün araştırılması gerekliliği ortaya çıkmıştır. ADAMTS-1'in kanserdeki rolleri ile yapılan çalışmaların çoğu bu üyenin farklı hücrelerde mRNA ya da protein düzeyinde ifadesinin belirlenmesine odaklanmıştır. Yapılan bu çalışmalarla, ADAMTS-1'in antianjiyogenetik etkisi ve rolü de gösterilmiştir. 2006 yılında yayınladıkları çalışmalarında, Rocks ve arkadaşları, insan küçük hücreli olmayan akciğer kanserlerinde (non-small-cell lung carcinomas, NSCLC) ADAMTS-1 ekspresyonunu, sağlıklı dokulara oranla anlamlı olarak daha az bulduklarını bildirmişlerdir [77]. ADAMTS-1'in kanserdeki rolleri ile yapılan çalışmaların çoğu bu üyenin farklı hücrelerde mRNA ya da protein düzeyinde ifadesinin belirlenmesine odaklanmıştır. Transkripsiyonel regülasyonu ile ilgili sınırlı sayıda bilgi bulunmaktadır. İlk bilinen üyesi olmasına rağmen ADAMTS-1'in transkripsiyonel regülasyonu konusunda bilgi çok sınırlıdır. Fare ADAMTS-1 geninin promotörü 1997 yılında klonlanarak karakterize edilmiştir [3]. 2006 yılında Lind ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada DNA metilasyonunun fare ADAMTS-1 aktivitesini azalttığı belirtilmiştir. Bu da farede aktivitesinin transkripsiyonel olarak promotör seviyesinde kontrol edildiğini göstermektedir. Kanser spesifik hipermetilasyona uğradığı düşünülmektedir [2]. Fare ADAMTS-1 promotörüne HDAC inhibitörü olan TSA uygulamasından sonra SP1 ve HDAC6 bağlanmasının azaldığını bulmuşlardır. Proksimal bölgedeki GC kutularının inaktivasyon için gerekli olduğu tespit edilmiştir. SP1 in ADAMTS-1 ekspresyonunu azalttığı açıklanmıştır [4, 5]. SP1 birçok hücrel ve viral genlerin promotörlerine bağlanan diziye spesifik DNA bağlanma proteini olup çok iyi karakterize edilmiştir. Farklı dokulardaki SP1

ekspresyonları farklılık gösterir ve SP1'in DNA'ya bağlanma afinitesi büyüme faktörleri tarafından değiştirilebilir.

2009 yılında Hatipoğlu ve arkadaşları tarafından hipoksiyanın ADAMTS-1'i indükleyip indüklediği ve regülasyon mekanizması araştırılmıştır. Endotel hücrelerde, hipoksiya durumunda, ADAMTS-1 mRNA ve protein ekspresyon seviyesi hızlı bir şekilde arttığı fakat diğer hücre tiplerinde böyle bir durum tespit edilmemiştir. İlginç bir şekilde ADAMTS-1'in hipoksiya ile indüklenmesi geçici bir durum olmasına rağmen HUVEC hücrelerinde, VEGF'un hipoksiya ile indüklenmesi zamana bağlı olarak artmaktadır. Endotel hücrelerde ADAMTS-1 hipoksiya durumunda geçici olarak indüklendiği ve HIF-1 $\alpha$ 'in bağlanması aracılığıyla transkripsiyonu yapıldığı tespit edilmiştir. Sonuç olarak ADAMTS-1 in yeni bir akut hipoksiya ile regüle edilen bir gen olduğu gösterilmiştir [6].

Bütün bu ekspresyon çalışmalarının ışığında bu tez çalışmasının amacı hem farklı kanser tiplerinde ekspresyonunun değiştiği bilinen ADAMTS-1'in farklı dokulara ait kanser hücre hatlarındaki ve normal dokulardaki ekspresyon durumu incelenmesi hemde ADAMTS-1 promotörünün klonlanılarak promotör bölgesinin detaylı analizi ile farklı transkripsiyon faktörlerine karşı cevabın belirlenmesi ve bu cevabın hem mRNA hem de protein düzeyinde de araştırılması gerçekleştirilmiştir.

ADAMTS-1 ekspresyonunu incelemek için Hep3B (İnsan karaciğer karsinomu), MCF7 (İnsan meme karsinomu), PC3 (İnsan prostat karsinomu), DU145 (İnsan prostat karsinomu), HT-29 (İnsan kolon karsinomu), MG63 (İnsan kemik karsinomu), Saos-2 (İnsan kemik karsinomu), Ishikawa (human endometrial adenokarsinom) ve HUVEC (İnsan umbilikal venlerinden elde edilen endotel hücre) hücre hatları kullanılmıştır. ADAMTS-1'in Hep3B, PC3, MG-63, SAOS, HUVEC, ISC hücre hatlarında ekspre edildiği ancak MCF-7, DU145 ve HT-29 hücre hatlarında ifade edilmediği belirlenmiştir.

Prostat stroma hücreleri ile LNCaP, PC3, DU145 gibi prostat kanseri hücre hatlarında ADAMTS-1, -4, -5, -9, -15 ve TIMP-3 ekspresyonlarının incelendiği bir çalışmada stroma hücrelerinin bu proteinleri sürekli olarak eksprese ettikleri ancak hücre hatlarındaki ekspresyonunun değiştiğini göstermişlerdir [78]. Gustavsson ve arkadaşlarının deneysel androjen-bağımsız ve bağımlı prostat kanserlerinde

angiyojenezi regüle eden genlerin ekspresyonunu araştırdıkları ve 2008’de yayınladıkları çalışma ise ADAMTS-1 ekspresyonunun azaldığı bulunmuştur [79]. Ayrıca tez çalışması kapsamında (DU-145) ve PC3 insan prostat kanserlerinde hem ADAMTS-1 hemde ADAMTS-1 substratı olan VEGF ifadesi araştırılmıştır. PC3 hücreleri DU145’lere göre daha metastatik karakterde Prostat spesifik antijen (PSA) ifade eden bir hücre grubudur. DU145’ler ise daha az metastatik özellikte, PSA ifade etmeyen bir hücre hattı olma özelliğine sahiptir. Bu farklılıklara rağmen, PC3 ve DU145 hücre hattında VEGF ekspresyonu görülürken ADAMTS-1 ekspresyonu sadece PC3 hücre hattında tespit edilmiştir [80].

Ayrıca meme kanser modeli olan MCF-7 hücre hattında ADAMTS-1 ifadesi araştırılmış ancak bu hücre hattında ifade edilmediği yada saptanamayacak kadar çok az ifade ediliyor olacağı RT-PCR alışması ile gösterilmiştir [80]. Porter ve arkadaşları insan meme kanserinde, neoplastik olmayan meme dokusunda ve meme kanseri hücre hatlarında gerçekleştirdikleri ve ADAMTS-1-20’nin ekspresyon profilini inceledikleri çalışmada; meme karsinomu vakalarında, tümörün heterojenitesinden, tipinden ve derecesinden bağımsız olarak, ADAMTS genlerinden yedi tanesinin (ADAMTS-1, 3, 5, 8, 9, 10 ve 18) sürekli olarak ekspresyonun azaldığını bulmuşlardır [81].

Literatürde karaciğer kanserlerinde ADAMTS proteinlerinin ekspresyonunun incelendiği tek alışma Masui ve arkadaşlarının hepatoselüler karsinomalarda (HCC) ADAMTS-1’in mRNA ekspresyonunu araştırdıkları çalışmadır. Araştırmacılar inceledikleri 16 HCC vakasında kanser dokusunda ADAMTS-1 ekspresyonu düzeylerini belirlemişler ve bunu siroz hastalarından elde edilen karaciğer dokusundaki ADAMTS-1 ekspresyonu ile karşılaştırdıklarında, HCC’da ADAMTS-1 ekspresyonunun anlamlı olarak azaldığını tespit etmişlerdir [7]. Ayrıca yine bu tez çalışmasında ilk kez ADAMTS-1 varlığı karaciğer hücre hattı olan Hep3B hücrelerinde tarafımızca gösterilmiştir [8].

ADAMTS proteinlerinin mide ve bağırsak kanserlerinde ekspresyonu ile ilgili çok fazla bilgi mevcut değıldir. Yapılan bir çalışmada kolorektal tümörlerde ADAMTS-1’in promotor hipermetilasyonu yoluyla inaktive edildiği ortaya konulmuştur [2]. Ayrıca yine bu tez çalışmasında ilk kez ADAMTS-1’in kolon

kanseri hücre hattı olan HT-29 hücrelerinde ifade edilmediği yada saptanamayacak kadar az ifade ediliyor olabileceği gösterilmiştir [80].

ADAMTS-1'in HUVEC hücrelerinde erken hipoksik cevapta önemli bir gen olduğu Hatipoğlu ve arkadaşlarınca gösterilmiştir. Hatipoğlu ve arkadaşlarınca hipoksik model olarak, endotel ve endotel olmayan hücre hatları kullanılarak ADAMTS-1 ifadesinin hipoksik koşullardaki değişimi incelenmiştir. HUVEC, HPAEC ve HMEC (Endotel hücreleri) 'da ADAMTS-1 ifadesinin hipoksik durumda artmış olduğunu göstermişlerdir. ARPE (Retinal Pigment epitelyum) artmadığını ancak yine fibroblast (Endotel olmayan hücreler) hücrelerinde ADAMTS1 ifadesi hipoksik koşullarda arttığını göstermişlerdir. Sonuçta ADAMTS1 'in hipoksikiya ile hücre spesifik olarak regüle olduğu önerilmiştir [6]. Bu tez çalışmasında ifadesi bizim tarafımızdan gösterilen insan Hepatoma modeli olan Hep3B'de ADAMT-1 ifadesi incelenmiştir. Bunun için hipoksik koşullar  $CoCl_2$  ile Hep3B hücrelerinde başarılı bir şekilde oluşturulmuştur. Hipoksik koşullar HIF-1a seviyesi ile kontrol edilmektedir. Çünkü HIF1a arttığı zaman hipoksik koşullarda regüle olan genlerin promotorlarında HRE (Hypoxia Response Element) elementlere bağlanarak bu genlerin ifadesinde artışa neden olacaktır. Bizim çalışmamızda 24 ve 48 saatlerde normal koşullara oranla hipoksik koşullarda HIF-1 ekspresyonunun arttığı tespit edilmiştir. Hipoksik koşul oluşumu doğrulanmıştır.

HIF-1 ekspresyonunda artışa ADAMTS-1 ekspresyonundaki artış eşlik etmiştir. Sonuç olarak bizim çalışmamızda Hep3B hücrelerinde  $CoCl_2$  uygulaması ile hipoksik koşul oluşturulmuş ve ilk kez hipoksik koşullarda bu hücre hattında hem HIF-1 hemde ADAMTS-1 ekspresyonunun mRNA düzeyinde ve protein düzeyinde arttığı gösterilmiştir.

RNA analizlerinde internal kontrolün seçimi oldukça önemlidir. Özellikle farklı koşullarda yapılan çalışmalarda çalışılan koşuldaki etkilenmeyecek bir internal kontrolün seçimi gerekmektedir. Çalışmamızda  $CoCl_2$  ile indüklenen hipoksik koşullarda çalışmalarımız yürütüldüğü için bu koşullarda GAPDH,  $\beta$ -Aktin ve H- $\beta$ -2-Mikrogloblin mRNA seviyeleri hem Hep3B hemde PC3 hücre hatlarında analiz edilmiştir. GAPDH ve  $\beta$ -Aktin mRNA seviyesi değişkenlik gösterirken H- $\beta$ -2-Mikrogloblin seviyesi ne Hep3B ne de PC3 hücre hattında değişmediği yapılan RT-PZR analizleri ile gösterilmiştir. Literatür incelendiğinde Hua Zeng ve arkadaşlarının



1999 yılında farklı hücre hatlarını kullanarak yaptıkları çalışmalarında 28S RNA'nın hipoksik koşullar altında internal kontrol olarak analizlerde kullanılabilmesini ancak HIF-1 tarafından düzenlenen hipoksik koşullarda GAPDH'in internal kontrol olarak seçiminin uygun olmayacağını göstermişlerdir [89]. Harun Said ve arkadaşlarının 2006 yılında GAPDH ile yaptıkları bir başka çalışmada Glioma hücre hattında hipoksik koşullar altında bu genin internal kontrol olarak kullanımının uygun olduğunu göstermişlerdir [90]. Ayrıca yaptıkları bu çalışmada 2006 yılına kadar internal kontroller ile ilgili yapılan çalışmalar için bir özet yapmışlar ve LNCap, ATII, SiHa, MBEC4, EC4, tavşan iskelet kası hücrelerinde hipoksik koşullar altında GAPDH'in internal kontrol olarak kullanımının uygun olmadığı gösterilmiştir [90]. Yine bir başka araştırma grubu olan Trine ve arkadaşları 1998 yılında yaptıkları bir çalışmada internal kontrol amaçlı kullanılan çok sayıda geni analiz etmişlerdir. Bu çalışmada 18S RNA ve  $\beta$ -Aktin'in büyüme ve farklılaşma koşullarında adipoz kökenli primer hücre kültüründe kullanımının uygun olmadığını göstermişlerdir [91].

Farklı uzunluklarda promotor parçalarıyla transfeksiyonlar gerçekleştirilmiş ve bazal promotor aktiviteleri belirlenmiştir. İki büyük promotor parçası karşılaştırılmış ve P8'in P1'e göre daha düşük aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Bu sonuç P8'de yaklaşık 368 bazlık bir bölgenin delesyonundan ve bu bölgedeki önemli transkripsiyon faktörü bağlanma bölgelerinin kaybindan kaynaklandığı düşünülmektedir.

İnsan ADAMTS1 Promotoru incelendiğinde, promotor üzerinde çok sayıda muhtemel transkripsiyon faktörü bağlanma bölgesi bulunmuştur (bkz ek). Özellikle hedef bağlanma dizileri olan SP1, USF ve C/EBP $\alpha$  bağlanma dizilerinin ADAMTS-1 promotoru üzerinde çok sayıda bağlandığı bulunmuştur. Bu transkripsiyon faktörleri içinde çok fazla olası bağlanma bölgesi olan SP1 transkripsiyon faktörü öncelikle seçilmiştir. SP1 transkripsiyon faktörünü seçmemizin diğer bir temel nedeni, bu transkripsiyon faktörünün fare ADAMTS-1 üzerinde azaltan bir etki göstermesidir. Bilindiği üzere pek çok transkripsiyon faktörünün türe özgü spesifik regülasyonu bulunmaktadır. Köçkar ve arkadaşları daha önceki çalışmalarında xenopus C/EBP $\alpha$ 'nın fare C/EBP $\alpha$  alfadan daha farklı regülasyon mekanizması kullandığını göstermişlerdir [92]. Türe özgü olabileceğini gösteren diğer bir kanıt ise fare ve insan ADAMTS-1 promotorlarının dizileri karşılaştırıldığında farede önerilen SP1

bağlanma bölgesinin insan promotorunda korunmuş olmamasıdır. Diğer USF ve C/EBP $\alpha$  transkripsiyon faktörlerinin seçmemizin nedeni ise yine bu transkripsiyon faktörlerine ait pek çok olası bağlanma bölgelerinin bulunmasıdır. Diğer bir önemli etken ise özellikle C/EBP $\alpha$  karaciğer spesifik gen ifadesinde dominant olarak görev alan bir transkripsiyon faktörü olmasıdır. C/EBP $\alpha$  ilk olarak sıçan karaciğer nükleusunda ısıya dayanıklı bir çekirdek proteini olarak tanımlanmıştır. Herpes simpleks virüs timidin kinaz geninin promoter bölgesindeki CCAAT elementi ve birçok tümör virüslerinin enhancer bölgeleri ile bağlantı kurabilen bir proteindir [93]. Daha sonra özellikle başlıca karaciğer rejenerasyonu dahil olmak üzere karaciğere spesifik pek çok genin transkripsiyonunun düzenlediği belirlenmiştir. Bu yüzden bu transkripsiyon faktörleri karaciğer modelinde detaylı incelemeye alınmıştır. Bunun için hangi bölgelerin bu anlamda önemli olduğunu analiz edebilmek için 5' kısaltılmış promotor parçaları ve indüklemiş SP1, USF ve C/EBP $\alpha$  ekspresyon plasmidleri ile geçici transfeksiyon analizleri yapılmıştır. Ayrıca indüklenmiş SP1, USF ve C/EBP $\alpha$  ekspresyon plasmidleri ile ADAMTS-1'in mRNA ve protein seviyesine olan etkisi de geçici transfeksiyon analizleri ile araştırılmıştır. Ayrıca bu transkripsiyon faktörlerinin ADAMTS-1'e etkisinin hiposiya ile regüle olup olmadığı da araştırılmıştır.

Bu kapsamda öncelikle ADAMTS-1 geninin transkripsiyonel regülasyonunun aydınlatılması amacıyla yönelik olarak ADAMTS-1 promotorunun biyoinformatik analizi yapılmıştır. GenBank Accession numarası NT 011512 olan ADAMTS-1 geninin promotor bölgedeki translasyon başlangıç bölgesi ve transkripsiyonel başlangıç bölgesi (+1) belirlendikten sonra, NCBI sitesinden faydalanarak promotorun -1545/+51 bölgesine spesifik primerler dizayn edildi. Promotor bölgenin klonlanması için kalıp olarak kullanılacak olan DNA, kandan izole edildi. Bu amaçla kullanılan yöntem, hem iyi sonuç vermesi hem de basit ve hızlı olması nedeniyle tercih edilmiştir.

-1545/+51 baz çiftlik ADAMTS-1 promotor bölgesi PZR ile çoğaltılarak, önce pGEMT ve daha sonra sırasıyla pGEMT Easy ve pMetLuc lusiferaz raporcu vektöre klonlandı. Klonlanan bölgenin dizi analiz sonuçları NCBI'da yer alan dizi ile karşılaştırıldığında sorunsuz bir şekilde klonlamanın gerçekleştiği tespit edildi.

BioEdit Alignment Programı kullanılarak insan ADAMTS-1 promotor dizisinin *Mus musculus* ADAMTS-1 promotor dizisi ile karşılaştırılması yapılmıştır. Buna göre iki türün promotor dizleri arasında bazı bölgelerin yüksek homoloji bazı bölgelerin ise farklılıklar içerdiği tespit edilmiştir. İnsan ADAMTS-1 promotoru üzerindeki muhtemel transkripsiyon faktörleri bağlanma bölgeleri web tabanlı bir program olan TF SEARCH ve Mathinspector programları kullanılarak belirlenmiş ve çalışmamız kapsamında promotorda bağlanma bölgesi tespit edilen SP1, USF ve C/EBP $\alpha$  transkripsiyon faktörleriyle çalışılmasına karar verilmiştir.

Çalışmamızda insan ADAMTS-1 promotorunun SP1 uygulamasının normal koşullar altında Hep3B hücrelerinde mRNA ve protein düzeyinde 24 saatte azalışa sebep olduğu gösterilmiştir. Ancak hipoksik koşullar altında SP1 uygulamasının normal koşulların tersine artışa sebep olduğu mRNA ve protein düzeyinde gösterilmiştir. Bilindiği gibi hipoksik koşullar altında birçok genin ekspresyon seviyesi değişmektedir. ADAMTS-1'in hipoksik koşullar altında regülasyonunun değiştiği bilinen bir gerçektir. SP1 uygulamasının hipoksik koşullarda farklı bir etki göstermesi bu koşullar altında regüle olan birçok genin etkisi ile farklı basamaklardan ilişki kurarak gerçekleşebilmektedir. Sonuç olarak SP1 uygulaması Hep3B hücrelerinde 24 saatte hem ADAMTS-1 mRNA seviyesinde hem de ADAMTS-1 protein seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalışa sebep olurken, farklı uzunluklardaki ADAMTS-1 promotor parçalarının transkripsiyonel aktivitesinde de azalışa sebep olmaktadır. 2008 yılında Chia ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada fare ADAMTS-1 promotoruna HDAC inhibitörü olan TSA uygulamasından sonra SP1 ve HDAC6 bağlanmasının azaldığını bulmuşlardır. Proksimal bölgedeki GC kutularının inaktivasyon için gerekli olduğu tespit edilmiştir [4, 5]. SP1 birçok hücrel ve viral genlerin promotorlarına bağlanan diziye spesifik DNA bağlanma proteini olup çok iyi karakterize edilmiştir. Farklı dokulardaki SP1 ekspresyonları farklılık gösterir ve SP1'in DNA'ya bağlanma afinitesi büyüme faktörleri tarafından değiştirilebilir.

USF uygulaması Hep3B hücrelerinde 48 ve 72 saatte ADAMTS-1 mRNA seviyesinde azalışa 72 saatte protein seviyesinde azalışa sebep olduğu gözlemiştir. Farklı uzunluklardaki ADAMTS-1 promotor parçalarının transkripsiyonel aktivitesinde de azalışa sebep olmaktadır Ancak hipoksik koşullarda, ADAMTS-1

protein seviyesinde artış görülmektedir. C/EBP $\alpha$  transkripsiyon fatörünün ne mRNA düzeyinde ne de protein düzeyinde bir etkisi gözlemlenmemiştir. Farklı uzunluklardaki ADAMTS-1 promotor parçalarının transkripsiyonel aktivitesinde de istatistiksel olarak anlamlı bir etki gözlemlenmemiştir. Hipoksik koşullarda ADAMTS-1 ifadesinde artış tüm uygulanan C/EBP, USF ve SP1 transkripsiyon faktörlerinde tespit edilmiştir. Bu durumun ADAMTS-1 hipoksik durumlarda artışı ile ilgili olduğu ve bu transkripsiyon faktörlerinin etkisinden bağımsız olduğunu düşündürmektedir.

Sonuç olarak, bu çalışma literatürde sınırlı bilgi bulunan insan ADAMTS-1 geninin transkripsiyonel regülasyonu konusunda bilgi sahibi olmamızı sağlamıştır. Bu çalışma sonucu elde edilen bilgiler ADAMTS-1 geninin regülasyonu konusunda gelecekte yapılacak çalışmalara ışık tutacaktır.

## 5. KAYNAKLAR

[1] Rocks N., Paulissen G., El Hour M., Quesada F., Crahay C., Gueders M., Foidart J.M., Noel A., Cataldo D., “Emerging roles of ADAM and ADAMTS metalloproteinases in cancer”, *Biochimie*, 90, 369, (2008).

[2] Lind G.E., Kleivi K., Meling G.I., Teixeira M.R., Thiis-Evensen E., Rognum T.O., Lothe R.A., “ADAMTS1, CRABP1, and NR3C1 identified as epigenetically deregulated genes in colorectal tumorigenesis”, *Cell Oncol.*, 28, 5-6, 259, (2006).

[3] Kuno K., Kanada N., Nakashima E., Fujiki F., Ichimura F., Matsushima K., “Molecular cloning of a gene encoding a new type of metalloproteinase-disintegrin family protein with thrombospondin motifs as an inflammation associated gene”, *The Journal of Biological Chemistry*, 272, 1, 556, (1997).

[4] Kari M. H. Doyle, Darryl L. Russell, Venkataraman Sriraman, and Joanne S. Richards, “Coordinate Transcription of the ADAMTS-1 Gene by Luteinizing Hormone and Progesterone Receptor”, *Molecular Endocrinology*, 18(10):2463–2478, (2004).

[5] Chia-Wei Chou, Ching-Chow Chen., “HDAC inhibition upregulates the expression of angiostatic ADAMTS1”, *FEBS Letters*, 582, 4059–4065, (2008).

[6] Hatipoglu O F., Hirohat S., Cilek M. Z., Ogawa H., Miyoshi T., Obika M., Demircan K., Shinohata R., Kusachi S., and Ninomiya Y., “ADAMTS1 Is a Unique Hypoxic Early Response Gene Expressed by Endothelial Cells”, *The Journal of Biological Chemistry*, 284,24, 16325–16333, (2009).

[7] Masui T., Hosotani R., Tsuji S., Miyamoto Y., Yasuda S., Ida J., Nakajima S., Kawaguchi M., Kobayashi H., Koizumi M., Toyoda E., Tulachan S., Arii S., Doi R., Imamura M., “Expression of METH-1 and METH-2 in pancreatic cancer”, *Clinical Cancer Research*, 7, 3437, (2001).

[8] Sunay FB., Turkoglu SA., Kockar F., “The expressions of ADAMTS-1-2-3 and-8 in Hep3B cells”, *Febs Journal*, 276:122-122, (2009)

- [9] Kaushal G.P., Shah S.V., “The new kids on the block: ADAMTSs, potentially multifunctional metalloproteinases of the ADAM family”, *The Journal of Clinical Investigation*, 105, 10, 1335, (2000).
- [10] Tang B.L., Hong W., “ADAMTS: A novel family of proteases with an ADAM protease domain and thrombospondin 1 repeats”, *FEBS Letters*, 445, 223, (1999).
- [11] Porter S., Clark I.M., Kevorkian L., Edwards D.R., “The ADAMTS metalloproteinases”, *Biochem. J.*, 386, 15, (2005).
- [12] Tang B.L., “ADAMTS: a novel family of extracellular matrix proteases”, *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 33, 33. (2001).
- [13] Apte S., “A disintegrin-like and metalloprotease (reprolysin type) with thrombospondin type 1 motifs: the ADAMTS family”, *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 36, 981, (2004).
- [14] Jones G.C., Riley G.P., “ADAMTS proteinases: a multi-domain, multi-functional family with roles in extracellular matrix turnover and arthritis”, *Arthritis Research & Therapy*, 7, 4, 160, (2005).
- [15] Vázquez F., Hastings G., Ortega M.A., Lane T.F., Oikemus S., Lombardo M., Iruela-Arispe M.L., “METH-1, a Human Ortholog of ADAMTS-1, and METH-2 are members of a new family of proteins with angio-inhibitory activity”, *The Journal of Biological Chemistry*, 274, 33, 23349, (1999).
- [16] Roughley P.J., “Articular cartilage and changes in arthritis noncollagenous proteins and proteoglycans in the extracellular matrix of cartilage”, *Arthritis Res*, 3, 342, (2001).
- [17] Pratta M.A., Yao W., Decicco C., Tortorella M.D., Liu R.-Q., Copeland R.A., Magolda R., Newton R.C., Trzaskos J.M., Arner E.C., “Aggrecan protects cartilage collagen from proteolytic cleavage”, *The Journal of Biological Chemistry*, 278, 46, 45539, (2003).

- [18] Matthews R.T., Gary S.C., Zerillo C., Pratta M., Solomon K., Arner E.C., Hockfield S., “Brain-enriched hyaluronan binding (BEHAB)/brevican cleavage in a glioma cell line is mediated by a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs (ADAMTS) family member”, *The Journal of Biological Chemistry*, 275, 30, 22695, (2000).
- [19] Sandy J.D., Westling J., Kenagy R.D., Iruela-Arispe M.L., Verscharen C., Rodriguez-Mazaneque J.C., Zimmermann D.R., Lemire J.M., Fischer J.W., Wight T.N., Clowes A.W., “Versican V1 proteolysis in human aorta in vivo occurs at the Glu441-Ala442 bond, a site that is cleaved by recombinant ADAMTS-1 and ADAMTS-4”, *The Journal of Biological Chemistry*, 276, 16, 13372, (2001).
- [20] Brown H.M., Dunning K.R., Robker R.L., Pritchard M., Russell D.L., “Requirement for ADAMTS-1 in extracellular matrix remodeling during ovarian folliculogenesis and lymphangiogenesis”, *Developmental Biology*, 300, 699, (2006).
- [21] Russell D.L., Doyle K.M.H., Ochsner S.A., Sandy J.D., Richards J.S., “Processing and localization of ADAMTS-1 and proteolytic cleavage of versican during cumulus matrix expansion and ovulation”, *The Journal of Biological Chemistry*, 278, 43, 42330, (2003).
- [22] Richards J.S., “Ovulation: New factors that prepare the oocyte for fertilization”, *Molecular and Cellular Endocrinology*, 234, 75, (2005).
- [23] Somerville R.P.T., Longpre J-M., Jungers K.A., Engle J.M., Ross M., Evanko S., Wight T.N., Leduc R., Apte S.S., “Characterization of ADAMTS-9 and ADAMTS-20 as a distinct ADAMTS subfamily related to caenorhabditis elegans GON-1”, *The Journal of Biological Chemistry*, 278, 11, 9503, (2003).
- [24] Collins-Racie L.A., Flannery C.R., Zeng W., Corcoran C., Annis-Freeman B., Agostino M.J., Aria M., DiBlasio-Smith E., Dorner A.J., Georgiadis K.E., Jin M., Tan X-Y., Morris E.A., LaVallie E.R., “ADAMTS-8 exhibits aggrecanase activity and is expressed in human articular cartilage”, *Matrix Biology*, 23, 219, (2004).

- [25] Shindo T., Kurihara H., Kuno K., Yokoyama H., Wada T., Kurihara Y., Imai T., Wang Y., Ogata M., Nishimatsu H., Moriyama N., Oh-hashii Y., Morita H., Ishikawa T., Nagai R., Yazaki Y., Matsushima H., “ADAMTS-1: a metalloproteinase-disintegrin essential for normal growth, fertility, and organ morphology and function”, *The Journal of Clinical Investigation*, 105, 10, 1345, (2000).
- [26] Robker R.L., Russell D.L., Espey L.L., Lydon J.P., O’Malley B.W., Richards J.S., “Progesterone-regulated genes in the ovulation process: ADAMTS-1 and cathepsin L proteases”, *PNAS*, 97, 9, 4689, (2000).
- [27] Miles R.R., Sluka J.P., Halladay D.L., Santerre L.V., Hale L.V., Bloem L., Thirunavukkarasu K, Galvin R.J.S., Hock J.M., Onyia J.E., “ADAMTS-1 A cellular disintegrin and metalloprotease with thrombospondin motifs as a target for parathyroid hormone in bone”, *Endocrinology*, 141, 12, 4533, (2000).
- [28] Kashiwagi M., Enghild J.J., Gendron C., Hughes C., Caterson B., Itoh Y., Nagese H., “Altered proteolytic activities of ADAMTS-4 expressed by c-terminal processing”, *The Journal of Biological Chemistry*, 279, 11, 10109, (2004).
- [29] Llamazares M., Cal S., Quesada V., LÓpez-Otin C., “Identification and characterization of ADAMTS-20 defines a novel subfamily of metalloproteinases-disintegrins with multiple thrombospondin-1 repeats and a unique GON domain”, *The Journal of Biological Chemistry*, 278, 15, 13382, (2003).
- [30] Colige A., Sieron A.L., Li S.-W., Schwarze U., Petty E., Wertelecki W., Wilcox W., Krakow D., Cohn D.H., Reardon W., Byers P.H., Lapière C.M., Prockop D.J., Nusgens B.V., “Human Ehlers-Danlos syndrome type VII C and bovine dermatosparaxis are caused by mutations in the procollagen I N-proteinase gene”, *Am. J. Hum. Genet.*, 65, 308, (1999).
- [31] Clark M.E., Kelner G. S., Turbeville L.A., Boyer A., Arden K.C., Maki R.A., “ADAMTS9, a Novel Member of the ADAM-TS/ Metallospodin Gene Family”, *Genomics*, 67, 343, (2000).



- [32] Baker A.H., Edwards D.R., Murphy G., “Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities”, *Journal of Cell Scienc*, 115, 3719, (2002).
- [33] Handsley M.M., Edwards D.R., “Metalloproteinases and their inhibitors in tumor angiogenesis”, *Int.J.Cancer*, 115, 849, (2005).
- [34] Cawston T.E., Wilson A.J., “Understanding the role of tissue degrading enzymes and their inhibitors in development and diseases”, *Best Practice & Research Clinical Rheumatology*, 20, 5, 983, (2006).
- [35] Hashimoto T., Wen G., Lawton M.T., Boudreau N.J., Bollen A.W., Yang G.Y., Barbaro N.M., Higashida R.T., Dowd C.F., Halbach V.V., Young W.L., “Abnormal expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in brain arteriovenous malformations”, *Stroke*, 34, 925, (2003).
- [36] Kashiwagi M., Tortorella M., Nagase H., Brew K., “TIMP-3 is a potent inhibitor of Aggrecanase 1 (ADAM-TS4) and Aggrecanase 2 (ADAM-TS5)”, *The Journal of Biological Chemistry*, 276, 16, 12501, (2001).
- [37] Arner E.C., Pratta M.A., Trzaskos J.M., Decicco C.P., Tortorella M.D., “Generation and characterization of Aggrecanase”, *The Journal of Biological Chemistry*, 274, 10, 6594, (1999).
- [38] Rodríguez-Manzanaque J.C., Westling J., Thai S.N.-M., Luque A., Knauper V., Murphy G., Sandy J.D., Iruela-Arispe M.L., “ADAMTS 1 cleaves aggrecan at multiple sites and is differentially inhibited by metalloproteinase inhibitors”, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 293, 501, (2002).
- [39] Vankemmelbeke M.N., Jones G.C., Fowles C., Ilic M.Z., Handley C.J., Day A.J., Knight C.G., Mort J.S., Buttle D.J., “Selective inhibition of ADAMTS-1, -4 and -5 by catechin gallate esters”, *Eur. J. Biochem.*, 270, 2394, (2003).
- [40] Kuno K., Terashima Y., Metsushima K., “ADAMTS-1 is an active metalloproteinase associated with the extracellular matrix”, *The Journal of Biological Chemistry*, 274, 26, 18821, (1999).

- [41] Rodríguez-Manzaneque J.C., Milchanowski A.B., Dufour E.K., Leduc R., Iruela-Arispe M.L., “Characterization of METH-1/ADAMTS1 processing reveals two distinct active forms”, *The Journal of Biological Chemistry*, 275, 43, 33471, (2000).
- [42] Cal S., Argüelles J.M., Fernández P.L., López-Otín C., “Identification, characterization and intracellular processing of ADAM-TS12, a novel human disintegrin with a complex structural organization involving multiple thrombospondin-1 repeats”, *The Journal of Biological Chemistry*, 276, 21, 17932, (2001).
- [43] Kumar V., Cotran R.S., Robbins S.L., Robbins Temel Patoloji, 7. baskı, Nobel tıp Kitapevleri Ltd.Şti., İstanbul, p 218, (2003).
- [44] Li S.-W., Arita M., Fertala A., Bao Y., Kopen G.C., Langsjö T.K., Hyttinen M.M., Helminen H.J., Prockop D.J., “Transgenic mice with inactive alleles for procollagen N-proteinase (ADAMTS-2) develop fragile skin and male sterility”, *Biochem. J.*, 355, 271, (2001).
- [45] Pincus T, Koch GG, Sokka T, “A randomized, double-blind, crossover clinical trial of diclofenac plus misoprostol versus acetaminophen in patients with osteoarthritis of the hip or knee”, *Arthritis Rheum*, 44: 1587 – 1598, (2001).
- [46] Kumar V., Cotran R.S., Robbins S.L., Robbins Temel Patoloji, 7. baskı, Nobel tıp Kitapevleri Ltd.Şti., İstanbul, p 772, (2003).
- [47] Stanton H., Rogerson F.M., East C.J., Golub S.B., Lawlor K.E., Meeker C.T., Little C.B., Last K., Farmer P.J., Campbell I.K., Fourie A.M., Fosang A.J., “ADAMTS5 is the major aggrecanase in mouse cartilage *in vivo* and *in vitro*”, *Nature*, 434, 648, (2005).
- [48] Malfait A.M., Liu R.Q., Ijiri K., Komiya S., Tortorella M.D., “Inhibition of ADAM-TS4 and ADAM-TS5 prevents aggrecan degradation in osteoarthritic cartilage”, *The Journal of Biological Chemistry*, 277, 25, 22201, (2002).

[49] Glasson S.S., Askew R., Sheppard B., Carito B., Blanchet T., Ma H.-L., Flannery C.R., Peluso D., Kanki K., Yang Z., Majumdar M.K., Morris E.A., “Deletion of active ADAMTS5 prevents cartilage degradation in a murine model of osteoarthritis”, *Nature*, 434, 644, (2005).

[50] Gendron C., Kashiwagi M., Lim N.H., Enghild J.J., Thøgersen I.B., Hughes C., Caterson B., Nagase H., “Proteolytic activities of human ADAMTS-5 comparative studies with ADAMTS-4”, *The Journal of Biological Chemistry*, 282, 25, 18294, (2007).

[51] Tsilou, E., ‘Marchhesani Sydrome’, (20.01.2010),  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispmim.cgi?id=277600>

[52] Faivre L., Dollfus H., Lyonnet S., Alembik Y., Me´garbane A., Samples J., Gorlin R.J., Alswaid A., Feingold J., Merrer M.L., Munnich A., Cormier-Daire V., “Clinical Homogeneity and Genetic Heterogeneity in Weill–Marchesani Syndrome” *American Journal of Medical Genetics*, 123A, 204, (2003).

[53] Dagonneau N., Benoist-Lasselín C.,<sup>1</sup> Huber C., Faivre L., Me´garbane A., Alswaid A., Dollfus H., Alembik Y., Munnich A., Legeai-Mallet L., Cormier-Daire V., “ADAMTS10 Mutations in Autosomal Recessive Weill-Marchesani Syndrome” *Am. J. Hum. Genet.*, 75, 801, (2004).

[54] Fujikawa K., Suzuki H., McMullen B., and Chung D., “Purification of human vonWillebrand factor–cleaving protease and its identification as a new member of the metalloproteinase family”, *Blood*, 98, 1662, (2001).

[55] Hanahan, D., Weinberg, R.A., “The Hallmarks of Cancer”, *Cell.*, 100, 57 (2000).

[56] Yıldırım, H., Karbonik Anhidraz 9 Geninin Transkripsiyonel Kontrolünün Moleküler Analizi, Doktora Tezi, Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Balıkesir, (2009)

- [57] Beecken W.-D., Kramer W., Jonas D., “New molecular mediators in tumor angiogenesis”, *J.Cell.Mol.Med.*, 4, 4, 262, (2001).
- [58] Weidner N., Semple J.P., Welch W.R., Folkman J., “Tumor angiogenesis and metastasis correlation in invasive breast carcinoma”, *N Engl J Med.*, 324, 1, 1, (1999).
- [59] Weidner N., Carroll P.R., Flax J., Blumenfeld W., Folkman J., “Tumor angiogenesis correlates with metastasis in invasive prostate carcinoma”, *Am. J. Pathol.*, 143, 401, (1993).
- [60] Fontanini G., Lucchi M., Vignati S., Mussi A., Ciardiello F., DeLaurentiis M., De Placido S., Basolo F., Angeletti C.A., Bevilacqua G., “Angiogenesis as a prognostic indicator of survival in non-small cell lung carcinoma: a proepective study”, *J. Natl. Cancer Inst.*, 14, 461, (1996).
- [61] Srivastava A., Laidler P., Davies R.P., Horfan K., “The prognostic significance of tumor vascularity in intermediate-thickness (0,76-4,0 mm) skin melanoma. A quantitative histologic study”, *Am. J. Pathol.*, 133, 419, (1988).
- [62] Veikkola T., Karkkainen M., Claesson-Welsh L., Alitalo K., “Regulation of angiogenesis via vascular endothelial growth factor receptors” *Cancer Res.*, 60, 2, 203, (2000).
- [63] Ferrara N., “Role of vascular endothelial growth factor in regulation of physiological angiogenesis”, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 280, 6, 1358, (2001).
- [64] Shibuya M., “Structure and function of VEGF/VEGF-receptor system involved in angiogenesis”, *Cell Struct Funct.*, 26, 1, 25. (2001).
- [65] Neufeld G., Cohen T., Gengrinovitch S., Poltorak Z., “Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors”, *FASEB J.* 13, 1, 9, (1999).

- [66] Luque A., Carpizo D.R., Iruela-Arispe M.L., “ADAMTS1/METH1 inhibits endothelial cell proliferation by direct binding and sequestration of VEGF<sub>165</sub>”, *The Journal of Biological Chemistry*, 278, 26, 23656, (2003).
- [67] Fraipont F., Nicholson A.C., Feige J.-J., Van Meir E.G., “Thrombospondins and tumor angiogenesis”, *Trends in Molecular Medicine*, 7, 9, 401, (2001).
- [68] Iruela-Arispe M.L., Luque A., Lee N., “Thrombospondin modules and angiogenesis”, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 36, 1070, (2004).
- [69] Armstrong L.C., Bornstein P., “Thrombospondins 1 and 2 function as inhibitors of angiogenesis”, *Matrix Biol.*, 22, 1, 63, (2003).
- [70] Iruela-Arispe M.L., Lombardo M., Krutzsch H.C., Lawler J., Roberts D.D., “Inhibition of angiogenesis by thrombospondin-1 is mediated by 2 independent regions within the type 1 repeats”, *Circulation*, 28, 100, 13, 1423, (1999).
- [71] Streit M., Velasco P., Riccardi L., Spencer L., Brown L.F., Janes L., Lange-Asschenfeldt B., Yano K., Hawighorst T., Iruela-Arispe L., Detmar M., “Thrombospondin-1 suppresses wound healing and granulation tissue formation in the skin of transgenic mice”, *EMBO J.*, 19, 13, 3272, (2000).
- [72] Rodriguez-Manzaneque J.C., Lane T.F., Ortega M.A., Hynes R.O., Lawler J., Iruela-Arispe M.L. “Thrombospondin-1 suppresses spontaneous tumor growth and inhibits activation of matrix metalloproteinase-9 and mobilization of vascular endothelial growth factor”, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 98, 22, 12485, (2001).
- [73] Stefan Gerhardt, Giles Hassall, Paul Hawtin, Eileen McCall1, Liz Flavell, Claire Minshall, David Hargreaves, Atilla Ting, Richard A. Pauptit, Andrew E. Parker and W. Mark Abbott. “Crystal Structures of Human ADAMTS-1 Reveal a Conserved Catalytic Domain and a Disintegrin-like Domain with a Fold Homologous to Cysteine-Rich Domains”, *J. Mol. Biol.*, 373, 891–902, (2007).

- [74] Canals F., Colomé N., Ferrer C., Plaza-Calogne M.del C., Rodriguez-Manzeneque J.C., “Identification of substrates of the extracellular protease ADAMTS1 by DIGE proteomic analysis”, *Proteomics*, 6, S28, (2006).
- [75] Lee N.V., Sato M., Annis D.S., Loo J.A., Wu L., Mosher D.F., Iruela-Arispe M.L., “ADAMTS1 mediates the release of antiangiogenic polypeptides from TSP1 and 2”, *The European Molecular Biology Organization Journal*, 25, 22, 5270, (2006).
- [76] Rocks N., Paulissen G., Quesada Calvo F., Polette M., Gueders M., Munaut C., Foidart J-M., Noel A., Birembaut P., Cataldo D., “Expression of a disintegrin and metalloprotease (ADAM and ADAMTS) enzymes in human non-small-cell lung carcinomas (NSCLC)”, *British Journal of Cancer*, 94, 724, (2006).
- [77] Cross N.A., Chandrasekharan S., Jokonya N., Fowles A., Hamdy F.C., Buttle D.J., Eaton C.L. “The expression and regulation of ADAMTS-1, -4, -5, -9, and -15, and TIMP-3 by TGFbeta1 in prostate cells: relevance to the accumulation of versican”, *Prostate*, 63, 3, 269, (2005).
- [78] Gustavsson H., Jennbacken K., Welen K., Damber J.E., “Altered expression of genes regulating angiogenesis in experimental androgen-independent prostate cancer”, *Prostate*, 68, 161, (2008).
- [79] Sunay F.B., Turkoglu S. A., Kockar F., Okuyan D., “The expressions of ADAMTS1 and VEGF in Du145, PC3, MCF-7 and HT-29 cell lines”, *Febs Journal*, 277, 169-169, (2010).
- [80] Porter S., Span P.N., Sweep F.C.G.J., Tjan-Heijnen V.C.G., Pennington C.J., Pedersen T.X., Johnsen M., Lund L.R., Rømer J., Edwards D.R., “ADAMTS8 and ADAMTS15 expression predicts survival in human breast carcinoma”, *Int. J. Cancer*, 115, 849, (2005).
- [81] Sunay FB., Turkoglu SA., Kockar F., “The expressions of ADAMTS-1-2-3 and-8 in Hep3B cells”, *Febs Journal*, 276:122-122, (2009).

- [82] Goldberg, M.A., Dunning, S.P., and Bunn, H.F., "Regulation of the erythropoietin gene: evidence that the oxygen sensor is a heme protein", *Science*, 242: 1412–1415, (1988)
- [83] Wang, G.L., and Semenza, G.L., "Characterization of hypoxia-inducible factor 1 and regulation of DNA binding activity by hypoxia", *J Biol Chem*, 268, 21513–21518, (1993)
- [84] Wang, G., Hazra, T.K., Mitra, S., Lee, H.M., and Englander, E.W., "Mitochondrial DNA damage and a hypoxic response are induced by CoCl<sub>2</sub> in rat neuronal PC12 cells", *Nucleic Acids Res.*, 28, 2135–2140, (2000).
- [85] Huang, Y., Du, K.M., Xue, Z.H., Yan, H., Li, D., Liu, W., et al., "Cobalt chloride and low oxygen tension trigger differentiation of acute myeloid leukemic cells: possible mediation of hypoxia-inducible factor-1alpha", *Leukemia*, 17, 2065–2073, (2003).
- [86] Grasselli, F., Basini, G., Bussolati, S., and Bianco, F., "Cobalt chloride, a hypoxia-mimicking agent, modulates redox status and functional parameters of cultured swine granulosa cells", *Reprod Fertil Dev.*, 17, 715–720, (2005).
- [87] Torii S., Okamura N., Suzuki Y., Ishizawa T., Yasumoto K., Sogawa K., "Cyclic AMP represses the hypoxic induction of hypoxia-inducible factors in PC12 Cells", *Journal of Biochemistry*, Advance Access published August 11, (2009).
- [88] Yuan Y., Hilliard G., Ferguson T., Millhorn D. E., "Cobalt Inhibits the Interaction between Hypoxia-inducible Factor- $\alpha$  and von Hippel-Lindau Protein by Direct Binding to Hypoxia-inducible Factor", *The journal of biological chemistry*, 278, 18, 15911–15916, (2003)
- [89] Zhong H., Simons J.W., "Direct Comparison of GAPDH, b-Actin, Cyclophilin, and 28S rRNA as Internal Standards for Quantifying RNA Levels under Hypoxia", *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 259, 523–526 (1999).

[90] Said H. M., Hagemann C., Stojic J., Schoemig B., Vince G.H., Flentje M., Roosen K., Vordermark D., "GAPDH is not regulated in human glioblastoma under hypoxic conditions", *BMC Molecular Biology*, 8:55, (2007).

[91] Fink T., Lund P., Pilgaard L., Rasmussen J.G., Duroux M., Zachar V., "Instability of standard PCR reference genes in adipose-derived stem cells during propagation, differentiation and hypoxic exposure", *BMC Molecular Biology*, 9:98, (2008).

[92] Kockar F.T., Kousteni, S. and Ramji, D.P. "Characterisation of the Xenopus CCAAT-enhancer binding protein (C/EBP) alpha gene" *Biochem. Soc. Trans.* 25: S649, (1997).

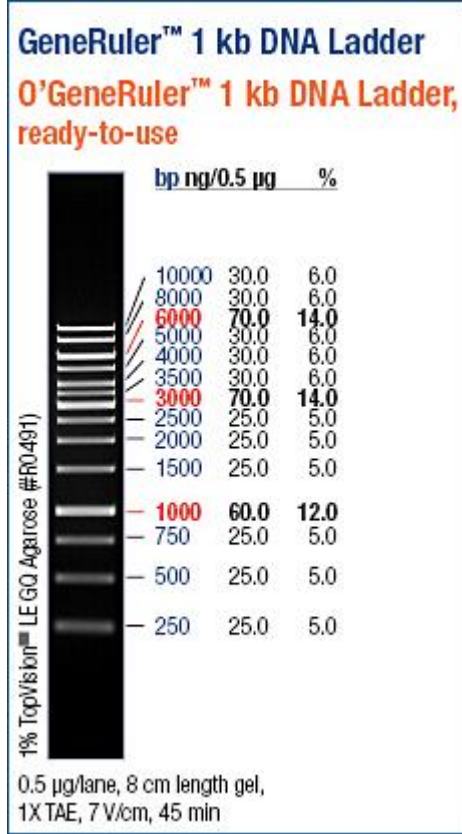
[93] Cao, Z., Umek, R. M. and McKnight, S. L. 'Regulated Expression of Three C/EBP Isoforms During Adipose Conversion of 3T3-L1 cells.' *Genes Dev* 5, 1538-1552, (1991).



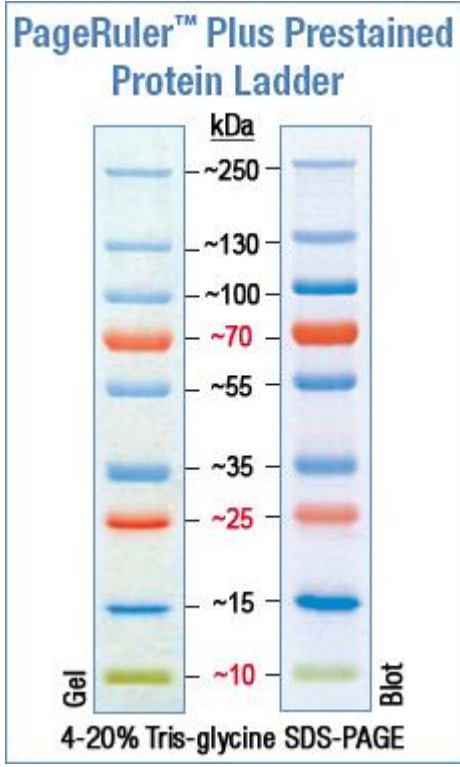
# **EKLER**

## 6. EKLER

### EK A Kullanılan Büyüklük belirteçleri



Şekil 6.1: Fermentas 1 kb DNA büyüklük belirteci



Şekil 6.2: PageRuler Prestained Protein büyüklük belirteci

## EK B ADAMTS-1 Promotor Bilgileri

### -1545/+51 İnsan ADAMTS-1 Promotor Bölgesini Kesmeyen Enzimler

AarI, AatII, AbsI, AccI, AclI, AflII, AgeI, AjuI, AlfI, ApaLI, ApoI, AscI, AsuII, BaeI, Ball, BamHI, BarI, BbvCI, BcgI, BciVI, BclI, BdaI, BfiI, BglI, BplI, BsaAI, BsaBI, BsmI, Bsp1407I, BspHI, BspMI, BstEII, BstXI, BtgZI, ClaI, DraIII, DrdI, Eam1105I, Eco47III, EcoRI, EcoRV, FseI, FspAI, HaeIV, HindII, HpaI, KpnI, MauBI, MfeI, MluI, MslI, NaeI, NarI, NcoI, NdeI, NotI, NruI, OliI, PacI, PmaCI, PmeI, PshAI, PsiI, PI-PspI, PspXI, PsrI, PstI, RsrII, SalI, SanDI, ScaI, PI-SceI, SexAI, SfiI, SgrAI, SgrDI, SnaBI, SpeI, SrfI, Sse8387I, SspI, StuI, SwaI, TaqII, TfiI, TsoI, Tth111I, VspI, XcmI, XhoI, XmnI

### -1545/+51 Promotor Bölgesi

```
CTGCCATTCTTGCTCATTGATTTTCTGATGAGTGAAAGCAATGTTTTGTTTTTGT
TTTTCAAGTAAGCAATCTCGCTAGGAAAAAGAAGTTGGAAAGCATCCGAAAAGAAAGC
TTGTAAGAGGGGACGTGTGGGAGAACTAGAAGGGACGCTTCTGGCTGGGGCCAACTGAAGT
GGGAAGATCTGGGGAGGAGCGAGGAAAGGACCCAGATCTACTTGGAGCCAACCAAGAGA
CCGGACGGGAGTGGGGCGGAAAGGCGGAGACCAGTTTCGAGCACTAACGCGGGGGCGCGG
AGTGTGAGGGTTGCGGGTCCGCCCGGGGCTAGGGCGGTTCGCTCTCGCCATTGTCCCGCG
GCTTTCGCCTGTGAAACACGTCCTTCTCTGGGTCTTGAGCCCTCCCACTTTTTGGA
GAGAAGAGCCACTCAGTTTTTTTTCTTAAGGACCTGTTGGTGGACCTCTCCTCGCTTTCG
TAACCGGGATATAGCCTTTTCCCTTCTGGTAGGAAGAGGAAGGAGGGTCCGGGAAGGA
AGCCGATTTCTTCTTCCCTCTGCACGCTTGTAGCCCCAGCGATCGCTGCTGGCCC
CCGGGTAGGAAAGTGGGGTTCCTGGCCGTTTCTGCGACGCTGGCCTAGGGCTTGCAGCTG
CTGTTGAGTGAAGCACGCAGACTGGCGGGAGCCGATCATTTCTCGAATGAAGAAGAAAA
AGCGCAATCCCTCCTTATGCTCTAGGGAATTGAGCCGCTCCAGATCACCCATTCCAG
AAATGTGAAACCGGGCCTCACAAAGTCGTCTCTGGTGAAGAGGTGGCGTGGGGGTGGG
GGTTGGTGGAGGGTGAAGGCATAAGCAAACATATTTTAAATCCAGATCGTAGGAAGTGT
CACCTGGCCCCCTACCCAGGCATGCTTTCTGGGGGAAGCGCAGGGCCAAGCTTTCCCTAG
AAAAGCTGGGGCGAAGAGAGAGCAGCGGGCGGCTAAGGAGCTCCTGGCAGGCTGGGAAGG
TGGAGAAGTGGGGTGGAGTATTTTCTAGAAAGGTGTAGCCCTAGCTCATCTCCTTAGATTG
GGGAAGAGGGAACTGAGGGAGGAGGAAGGAGACCCAGGGCAGCTCCAGGATAGGGAAAT
GTTGAAGAAGGGACTCGTTCTCCAACCGAACCCCTCCCTCCTGGGAACCGCAGCCAGCG
CGGTAACTGAGTTACCGCAACCGGGCGGTGGGGAGGAAGGGTGGTCCAGGAAACCGCGCA
GGGAGAAAAGCGGTGGAAGGGAGAGTCTTCTCCCTGGAGCGGCCCCAGCAGTACAAAGTG
CTGGTCACAGCGCCCTTCCGCCCTAGATTGACGAGCAGTGGCGTGGAGCCAGCGCGGA
GGCTGCCCCCTCCCTCCCGAGCCCGCAGCGCGGAGCGCGGTTTAGCACCAACGGAGCC
GGGGCGGGCGTCTTGGGATGGAAAAGGGCCAAAGGGGAGGAGTGGGGTGGGGGTGGGGG
TTTCACTGGTCCACTATAAAAGGACCGCTCGGCTGCCCGGTTCTTGCACTCGTGGAAAG
CGCTCCGAGCCAGGGGCTATTGCAAAGCCAGGGTG
```

### İnsan ADAMTS-1 promotorunun -1545/+51 bölgesinin transkripsiyon faktörü bağlanma motiflerinin TRANSFAC 1.3 kullanılarak belirlenmesi

```
1 CTGCCATTCT TGCTCATTG ATTTTTCCTG ATGAGTGAA AGCAATGTTT entry score
<---- < M00148 SRY 100.0
<---- < M00029 HSF 95.4
<---- < M00028 HSF 94.3
<---- < M00148 SRY 90.9
<---- < M00075 GATA-1 89.8
<---- < M00253 cap 88.4
```

	<-----		<a href="#">M00096</a>	Pbx-1	87.3
	<-----		<a href="#">M00029</a>	HSF	86.9
		----->	<a href="#">M00029</a>	HSF	86.9
	<-----		<a href="#">M00028</a>	HSF	85.9
		----->	<a href="#">M00028</a>	HSF	85.9
			<a href="#">M00160</a>	SRY	85.9
	----->		<a href="#">M00253</a>	cap	85.2
51	TTGTTTTTGT TTTTCAAGTA AGCAATCTCG CTAGGAAAAA AGAAGTTGGA	entry	score		
	-----		<a href="#">M00148</a>	SRY	100.0
	<-----		<a href="#">M00148</a>	SRY	100.0
		----->	<a href="#">M00028</a>	HSF	95.3
		----->	<a href="#">M00029</a>	HSF	93.7
	<-----		<a href="#">M00075</a>	GATA-1	91.4
	<-----		<a href="#">M00094</a>	BR-C Z	88.7
	----->		<a href="#">M00240</a>	Nkx-2.	88.4
	<-----		<a href="#">M00076</a>	GATA-2	87.0
		----->	<a href="#">M00029</a>	HSF	86.9
		---	<a href="#">M00029</a>	HSF	86.9
	<-----		<a href="#">M00093</a>	BR-C Z	86.2
		----->	<a href="#">M00028</a>	HSF	85.9
	-----		<a href="#">M00028</a>	HSF	85.9
	<-----		<a href="#">M00160</a>	SRY	85.9
	<-----		<a href="#">M00160</a>	SRY	85.9
	<-----		<a href="#">M00241</a>	Nkx-2.	85.3
101	AAGCATCCGG AAAAGAAAGC TTGTAAGAGG GACGTGTGGG AGAACTAGAA	entry	score		
	----->		<a href="#">M00028</a>	HSF	100.0
		----->	<a href="#">M00029</a>	HSF	100.0
	----->		<a href="#">M00029</a>	HSF	96.0
		----	<a href="#">M00028</a>	HSF	95.3
		----	<a href="#">M00029</a>	HSF	93.7
	----->		<a href="#">M00148</a>	SRY	90.0
	<-----		<a href="#">M00075</a>	GATA-1	88.6
		----->	<a href="#">M00028</a>	HSF	88.5
		----->	<a href="#">M00141</a>	Lyf-1	88.3
	<-----		<a href="#">M00032</a>	c-Ets-	88.2
	----->		<a href="#">M00074</a>	c-Ets-	88.1
	->		<a href="#">M00029</a>	HSF	86.9
	----->		<a href="#">M00029</a>	HSF	86.9
		----->	<a href="#">M00087</a>	Ik-2	86.8
	->		<a href="#">M00028</a>	HSF	85.9
	----->		<a href="#">M00028</a>	HSF	85.9
	<-----		<a href="#">M00076</a>	GATA-2	85.4
151	GGGACGCTTC TGGCTGGGGC CAACTGAAGT GGGGAAGATC TGGGGAGGAG	entry	score		
	----->		<a href="#">M00083</a>	MZF1	100.0
	>		<a href="#">M00048</a>	ADR1	95.4
	<-----		<a href="#">M00028</a>	HSF	95.3
		----->	<a href="#">M00028</a>	HSF	95.3
		----->	<a href="#">M00048</a>	ADR1	93.8
	>		<a href="#">M00048</a>	ADR1	93.8
	<-----		<a href="#">M00029</a>	HSF	93.7
			<a href="#">M00029</a>	HSF	93.7
		----->	<a href="#">M00240</a>	Nkx-2.	90.7
	<-----		<a href="#">M00253</a>	cap	89.1
		----->	<a href="#">M00083</a>	MZF1	87.8
		----->	<a href="#">M00048</a>	ADR1	86.2
201	CGAGGAAAGG ACCCAGATCT ACTTGAGGCC AACCAAGAGA CCGGACGGGA	entry	score		
	----->		<a href="#">M00033</a>	p300	90.1
			<a href="#">M00048</a>	ADR1	89.2
	----->		<a href="#">M00048</a>	ADR1	87.7
	----->		<a href="#">M00029</a>	HSF	86.9
		<---	<a href="#">M00253</a>	cap	86.7
	----->		<a href="#">M00028</a>	HSF	85.9
		----->	<a href="#">M00032</a>	c-Ets-	85.3
		-	<a href="#">M00083</a>	MZF1	85.2
	----->		<a href="#">M00226</a>	P	85.1
251	GTGGGGCGGA AAGGCGGAGA CCAGTTCGAG CACTAACGCG GGGGCGCGCG	entry	score		
	----->		<a href="#">M00048</a>	ADR1	96.9
	----->		<a href="#">M00048</a>	ADR1	95.4
		<	<a href="#">M00253</a>	cap	91.3
	----->		<a href="#">M00033</a>	p300	90.1
		----->	<a href="#">M00048</a>	ADR1	89.2
	->		<a href="#">M00048</a>	ADR1	87.7

		<-----	<a href="#">M00029</a>	HSF	87.4
	----->		<a href="#">M00029</a>	HSF	86.9
----			<a href="#">M00253</a>	cap	86.7
	----->		<a href="#">M00048</a>	ADR1	86.2
			<a href="#">M00263</a>	StuAp	86.2
	----->		<a href="#">M00028</a>	HSF	85.9
			<a href="#">M00253</a>	cap	85.6
----->			<a href="#">M00083</a>	MZF1	85.2
301	AGTGTGAGGG TTGCGGGTCC GCCCGGGGCT AGGGCGGTCG CTCTCGCCAT	entry		score	
	----->		<a href="#">M00048</a>	ADR1	93.8
-----			<a href="#">M00253</a>	cap	91.3
---			<a href="#">M00263</a>	StuAp	86.2
-----			<a href="#">M00253</a>	cap	85.6
351	TGTCCCCGCG GCTTTCCGCC TGTGAAACAC GTCCTTCCTC TGGGTCCTTG	entry		score	
	<-----		<a href="#">M00048</a>	ADR1	92.3
	<-----		<a href="#">M00083</a>	MZF1	90.4
		<	<a href="#">M00255</a>	GC box	87.6
	<-----		<a href="#">M00029</a>	HSF	86.9
	----->		<a href="#">M00053</a>	c-Rel	86.0
	<-----		<a href="#">M00028</a>	HSF	85.9
401	AGCCCCCTCC ACTTTTGGGA GAGAAGAGCC ACTCAGTTTT TTTTCCTAAG	entry		score	
	----->		<a href="#">M00253</a>	cap	95.7
	----->		<a href="#">M00028</a>	HSF	95.3
	----->		<a href="#">M00029</a>	HSF	93.7
		<-----	<a href="#">M00022</a>	Hb	91.1
<-----			<a href="#">M00048</a>	ADR1	90.8
		<-----	<a href="#">M00094</a>	BR-C Z	88.7
		<-----	<a href="#">M00022</a>	Hb	88.4
	----->		<a href="#">M00048</a>	ADR1	87.7
-----			<a href="#">M00255</a>	GC box	87.6
	----->		<a href="#">M00141</a>	Lyf-1	87.0
		<-----	<a href="#">M00029</a>	HSF	86.9
<-----			<a href="#">M00196</a>	Sp1	86.5
<-----			<a href="#">M00048</a>	ADR1	86.2
		<-----	<a href="#">M00028</a>	HSF	85.9
	----->		<a href="#">M00254</a>	CCAAT	85.6
451	GACCTGTTGG TGGACCTCTC CTCGCTTTCG TAACGCGGAT ATAGCCTTTT	entry		score	
	<-----		<a href="#">M00028</a>	HSF	91.1
	----->		<a href="#">M00076</a>	GATA-2	88.9
	<-----		<a href="#">M00228</a>	VBP	88.1
		<-----	<a href="#">M00120</a>	dl	87.1
		<--	<a href="#">M00029</a>	HSF	86.9
	----->		<a href="#">M00040</a>	CRE-BP	86.7
	<-----		<a href="#">M00040</a>	CRE-BP	86.7
		<--	<a href="#">M00028</a>	HSF	85.9
	<-----		<a href="#">M00260</a>	HLF	85.3
501	CCCTTCCTGG TAGGAAGAGG AAGGAGGGGT CCGGAAGGA AGCCGATTTT	entry		score	
	----->		<a href="#">M00048</a>	ADR1	95.4
		<-----	<a href="#">M00046</a>	GCR1	90.9
<-----			<a href="#">M00226</a>	P	89.6
	----->		<a href="#">M00048</a>	ADR1	87.7
----			<a href="#">M00120</a>	dl	87.1
--			<a href="#">M00029</a>	HSF	86.9
		<---	<a href="#">M00029</a>	HSF	86.9
		<-----	<a href="#">M00223</a>	STATx	86.5
--			<a href="#">M00028</a>	HSF	85.9
		<---	<a href="#">M00028</a>	HSF	85.9
551	CTTCTTTCCC CCTCTGCACG CTTGCTAGCC CCAGCGATCG CTGCTGGCCC	entry		score	
		<---	<a href="#">M00048</a>	ADR1	96.9
		<-----	<a href="#">M00048</a>	ADR1	95.4
<-----			<a href="#">M00028</a>	HSF	95.3
	<-----		<a href="#">M00048</a>	ADR1	93.8
<-----			<a href="#">M00029</a>	HSF	93.7
	<-----		<a href="#">M00084</a>	MZF1	90.3
		<---	<a href="#">M00048</a>	ADR1	89.2
	<-----		<a href="#">M00083</a>	MZF1	88.7
	<-----		<a href="#">M00154</a>	STRE	87.7
	<-----		<a href="#">M00048</a>	ADR1	87.7
	----->		<a href="#">M00104</a>	CDP CR	87.3
	<-----		<a href="#">M00104</a>	CDP CR	87.3
-			<a href="#">M00029</a>	HSF	86.9

	<-----		<a href="#">M00029</a>	HSF	86.9
-			<a href="#">M00028</a>	HSF	85.9
	<-----		<a href="#">M00028</a>	HSF	85.9
		----->	<a href="#">M00106</a>	CDP CR	85.4
		<-----	<a href="#">M00106</a>	CDP CR	85.4
601	CCGGGTAGGA AAGTGGGGTT CCTGGCCGTT TCTGCGACGC TGGCCTAGGG	entry		score	
		----->	<a href="#">M00048</a>	ADR1	100.0
		<-----	<a href="#">M00028</a>	HSF	100.0
---			<a href="#">M00048</a>	ADR1	96.9
		<-----	<a href="#">M00029</a>	HSF	96.0
		<-----	<a href="#">M00029</a>	HSF	90.9
			<a href="#">M00226</a>	P	90.5
<-----			<a href="#">M00048</a>	ADR1	89.2
---			<a href="#">M00247</a>	PacC	88.2
		<-----	<a href="#">M00271</a>	AML-1a	87.4
	----->		<a href="#">M00029</a>	HSF	86.9
	----->		<a href="#">M00028</a>	HSF	85.9
		<-----	<a href="#">M00227</a>	v-Myb	85.0
651	CTTGCAGCTG CTGTTGAGTG AAAGCACGCA GACTGGCGGG AGCCGATCAT	entry		score	
		<	<a href="#">M00028</a>	HSF	100.0
		<	<a href="#">M00029</a>	HSF	96.0
		----	<a href="#">M00253</a>	cap	91.0
----->			<a href="#">M00184</a>	MyoD	88.3
		<-----	<a href="#">M00253</a>	cap	87.6
----->			<a href="#">M00175</a>	AP-4	87.5
<-----			<a href="#">M00175</a>	AP-4	87.5
		<-----	<a href="#">M00253</a>	cap	86.9
		<-	<a href="#">M00027</a>	AbaA	85.2
701	TTCTCGAATG AAGAAGAAAA AGCGCAATTC CCTCCTTATG CTCTAGGGAA	entry		score	
----			<a href="#">M00028</a>	HSF	100.0
		----->	<a href="#">M00028</a>	HSF	100.0
----			<a href="#">M00029</a>	HSF	96.0
		----->	<a href="#">M00029</a>	HSF	96.0
		----->	<a href="#">M00028</a>	HSF	95.3
		----->	<a href="#">M00029</a>	HSF	93.7
----			<a href="#">M00253</a>	cap	91.0
		<-----	<a href="#">M00253</a>	cap	89.4
		<-----	<a href="#">M00048</a>	ADR1	87.7
		<-----	<a href="#">M00029</a>	HSF	86.3
		----	<a href="#">M00029</a>	HSF	86.3
		----->	<a href="#">M00022</a>	Hb	85.7
		<----	<a href="#">M00253</a>	cap	85.5
----->			<a href="#">M00028</a>	HSF	85.4
-----			<a href="#">M00027</a>	AbaA	85.2
751	TTGAGCCGCG TCCAGATCA CCCATTCCAG AAATGTGAAA CCGGGCCCTC	entry		score	
		----->	<a href="#">M00028</a>	HSF	100.0
		----->	<a href="#">M00029</a>	HSF	96.0
		<-----	<a href="#">M00101</a>	CdxA	93.6
		----->	<a href="#">M00063</a>	IRF-2	90.6
		----->	<a href="#">M00062</a>	IRF-1	90.1
		<-----	<a href="#">M00100</a>	CdxA	89.7
		----->	<a href="#">M00253</a>	cap	88.3
		<-----	<a href="#">M00075</a>	GATA-1	88.2
		<-----	<a href="#">M00253</a>	cap	87.5
		<	<a href="#">M00100</a>	CdxA	87.2
		<---	<a href="#">M00141</a>	Lyf-1	87.0
>			<a href="#">M00029</a>	HSF	86.3
		<-----	<a href="#">M00029</a>	HSF	86.3
		----->	<a href="#">M00263</a>	StuAp	86.2
----			<a href="#">M00253</a>	cap	85.5
		-----	<a href="#">M00072</a>	CP2	85.4
801	ACAAAGTCGT CTCTGGTGAA GAGGTGGCGT GCGGGTGGG GGTGGTGGA	entry		score	
		----->	<a href="#">M00048</a>	ADR1	98.5
		----->	<a href="#">M00048</a>	ADR1	98.5
		<-----	<a href="#">M00226</a>	P	96.8
		----->	<a href="#">M00048</a>	ADR1	93.8
		<-	<a href="#">M00253</a>	cap	93.0
		----	<a href="#">M00048</a>	ADR1	92.3
-----			<a href="#">M00100</a>	CdxA	87.2
-----			<a href="#">M00141</a>	Lyf-1	87.0
		----->	<a href="#">M00001</a>	MyoD	86.0
		-----	<a href="#">M00084</a>	MZF1	85.5

	----->		<a href="#">M00072</a>	CP2	85.4
851	GGGTGAAGGC ATAAGCAAAC ATATTTTAAA ATCCAGATCG TAGGAAGTGT	entry		score	
	<-----		<a href="#">M00131</a>	HNF-3b	95.4
	-----		<a href="#">M00253</a>	cap	93.0
	->		<a href="#">M00048</a>	ADR1	92.3
	----->		<a href="#">M00148</a>	SRY	90.9
		--	<a href="#">M00187</a>	USF	90.4
		--	<a href="#">M00184</a>	MyoD	89.4
	<-----		<a href="#">M00159</a>	C/EBP	89.2
		---	<a href="#">M00073</a>	deltaE	87.4
	<-----		<a href="#">M00130</a>	HFH-2	87.0
	----->		<a href="#">M00148</a>	SRY	86.4
			<a href="#">M00084</a>	MZF1	85.5
		----	<a href="#">M00122</a>	USF	85.3
		<---	<a href="#">M00122</a>	USF	85.3
	<-----		<a href="#">M00101</a>	CdxA	85.0
901	CACCTGGCCC CTCACCCAGG CATGCTTCT GGGGAAGCG CAGGCCAAG	entry		score	
	<----		<a href="#">M00028</a>	HSF	100.0
	----->		<a href="#">M00048</a>	ADR1	98.5
	<----		<a href="#">M00029</a>	HSF	96.0
	<-----		<a href="#">M00154</a>	STRE	92.5
	<-----		<a href="#">M00048</a>	ADR1	90.8
	----->		<a href="#">M00187</a>	USF	90.4
	----->		<a href="#">M00184</a>	MyoD	89.4
	<-----		<a href="#">M00084</a>	MZF1	88.7
	----->		<a href="#">M00048</a>	ADR1	87.7
	----->		<a href="#">M00073</a>	deltaE	87.4
		<-----	<a href="#">M00009</a>	Ttk 69	86.7
	----->		<a href="#">M00100</a>	CdxA	85.9
	----->		<a href="#">M00122</a>	USF	85.3
	-----		<a href="#">M00122</a>	USF	85.3
	----->		<a href="#">M00083</a>	MZF1	85.2
951	CTTCCCTAG AAAAGCTGGG GCGAAGAGAG AGCAGCGGC GGCTAAGGAG	entry		score	
	----->		<a href="#">M00028</a>	HSF	100.0
	----->		<a href="#">M00029</a>	HSF	96.0
	----->		<a href="#">M00048</a>	ADR1	95.4
		<----	<a href="#">M00247</a>	PacC	88.2
	<-----		<a href="#">M00101</a>	CdxA	87.1
	<----		<a href="#">M00029</a>	HSF	86.9
	----->		<a href="#">M00216</a>	TATA	86.8
		-	<a href="#">M00009</a>	Ttk 69	86.7
	----->		<a href="#">M00028</a>	HSF	86.5
	<----		<a href="#">M00028</a>	HSF	85.9
1001	CTCCTGGCAG GCTGGGAAGG TGGAGAAGTG GGGTGAGGTA TTTTCTAGA	entry		score	
	----->		<a href="#">M00048</a>	ADR1	100.0
		<----	<a href="#">M00028</a>	HSF	100.0
		---	<a href="#">M00028</a>	HSF	100.0
		<----	<a href="#">M00029</a>	HSF	96.0
		---	<a href="#">M00029</a>	HSF	96.0
	----->		<a href="#">M00028</a>	HSF	95.3
	----->		<a href="#">M00029</a>	HSF	93.7
	<-----		<a href="#">M00221</a>	SREBP-	90.1
	----->		<a href="#">M00271</a>	AML-1a	88.7
	-----		<a href="#">M00247</a>	PacC	88.2
	----->		<a href="#">M00048</a>	ADR1	87.7
	----->		<a href="#">M00271</a>	AML-1a	87.4
	<-----		<a href="#">M00253</a>	cap	87.3
		----->	<a href="#">M00101</a>	CdxA	87.1
	----->		<a href="#">M00009</a>	Ttk 69	86.7
		<-----	<a href="#">M00101</a>	CdxA	85.7
1051	AAGTGTAGCC CTAGCTCATC TCCTAGATTG GGAAGAGGG AACTGAGGGA	entry		score	
	->		<a href="#">M00028</a>	HSF	100.0
	->		<a href="#">M00029</a>	HSF	96.0
		<-----	<a href="#">M00253</a>	cap	93.9
	----->		<a href="#">M00048</a>	ADR1	93.8
	----->		<a href="#">M00083</a>	MZF1	93.0
		----->	<a href="#">M00029</a>	HSF	90.9
	----->		<a href="#">M00077</a>	GATA-3	89.4
	----->		<a href="#">M00075</a>	GATA-1	88.6
		-	<a href="#">M00048</a>	ADR1	87.7
	----->		<a href="#">M00253</a>	cap	87.2
		----	<a href="#">M00048</a>	ADR1	86.2



	<----->	<a href="#">M00075</a>	GATA-1	86.1
	----->	<a href="#">M00109</a>	C/EBPb	85.5
1101	GGAGGGAAGG AGACCCAGGG CAGCTCCAGG ATAGGGAAAT GTTGAAGAAG	entry	score	
	----->	<a href="#">M00076</a>	GATA-2	96.0
	---->	<a href="#">M00028</a>	HSF	95.3
	---->	<a href="#">M00029</a>	HSF	93.7
	----->	<a href="#">M00075</a>	GATA-1	93.5
	----->	<a href="#">M00077</a>	GATA-3	92.2
	<----->	<a href="#">M00253</a>	cap	91.8
	<----->	<a href="#">M00048</a>	ADR1	89.2
	----->	<a href="#">M00109</a>	C/EBPb	88.7
---->	----->	<a href="#">M00048</a>	ADR1	87.7
	---->	<a href="#">M00029</a>	HSF	86.9
->	----->	<a href="#">M00048</a>	ADR1	86.2
	---->	<a href="#">M00028</a>	HSF	85.9
	----->	<a href="#">M00203</a>	GATA-X	85.9
1151	GGACTGCGTT CTCCAACCGA ACCCTCCCTC CTGGGAACCG CAGCCAGCG	entry	score	
	<----->	<a href="#">M00029</a>	HSF	100.0
	----->	<a href="#">M00271</a>	AML-1a	92.0
	----->	<a href="#">M00253</a>	cap	91.8
	----->	<a href="#">M00029</a>	HSF	90.9
	<----->	<a href="#">M00028</a>	HSF	88.5
	<----->	<a href="#">M00048</a>	ADR1	87.7
	----->	<a href="#">M00048</a>	ADR1	87.7
	----->	<a href="#">M00029</a>	HSF	87.4
	<----->	<a href="#">M00048</a>	ADR1	86.2
	<----->	<a href="#">M00147</a>	HSF2	85.9
1201	CGGTAAGTGA GTTACCACGAA CCGGGCGGTG GGGAGGAAGG GTGGTCCAGG	entry	score	
	----->	<a href="#">M00083</a>	MZF1	98.3
	----->	<a href="#">M00048</a>	ADR1	93.8
	<----->	<a href="#">M00271</a>	AML-1a	92.0
	<----->	<a href="#">M00253</a>	cap	90.2
	----->	<a href="#">M00029</a>	HSF	86.9
	----->	<a href="#">M00048</a>	ADR1	86.2
	----->	<a href="#">M00028</a>	HSF	85.9
	<----->	<a href="#">M00188</a>	AP-1	85.7
	<----->	<a href="#">M00173</a>	AP-1	85.6
	<----->	<a href="#">M00253</a>	cap	85.2
1251	AAACCGGCGA GGGAGAAAAG CCGTGAAGG GAGAGTCTTC TCCCTGGAGC	entry	score	
	----->	<a href="#">M00028</a>	HSF	100.0
	----->	<a href="#">M00029</a>	HSF	96.0
	----->	<a href="#">M00028</a>	HSF	95.3
	----->	<a href="#">M00029</a>	HSF	93.7
	----->	<a href="#">M00120</a>	dl	89.2
	----->	<a href="#">M00048</a>	ADR1	89.2
	----->	<a href="#">M00147</a>	HSF2	87.8
--->	----->	<a href="#">M00029</a>	HSF	86.9
--->	----->	<a href="#">M00028</a>	HSF	85.9
	----->	<a href="#">M00147</a>	HSF2	85.9
	----->	<a href="#">M00127</a>	GATA-1	85.5
1301	GGCCCCAGCA GTACAAAGTG CTGGTCACAG CGCCCTTCC GCCCTAGAT	entry	score	
	<----->	<a href="#">M00048</a>	ADR1	95.4
	----->	<a href="#">M00048</a>	ADR1	90.8
	----->	<a href="#">M00048</a>	ADR1	90.8
	----->	<a href="#">M00154</a>	STRE	88.7
	----->	<a href="#">M00154</a>	STRE	87.7
	<----->	<a href="#">M00253</a>	cap	86.9
1351	TGACGAGCAG TGGCGTGGAG CCAGCGCGGA GGCTGCCCCC TCCCCCTCCC	entry	score	
	<----->	<a href="#">M00048</a>	ADR1	93.8
	----->	<a href="#">M00048</a>	ADR1	93.8
	----->	<a href="#">M00048</a>	ADR1	90.8
	<----->	<a href="#">M00253</a>	cap	89.9
	<----->	<a href="#">M00084</a>	MZF1	89.5
	<----->	<a href="#">M00196</a>	Sp1	89.3
	----->	<a href="#">M00048</a>	ADR1	89.2
	----->	<a href="#">M00048</a>	ADR1	89.2
	----->	<a href="#">M00083</a>	MZF1	88.7
	----->	<a href="#">M00048</a>	ADR1	87.7
	----->	<a href="#">M00084</a>	MZF1	87.1
---	----->	<a href="#">M00253</a>	cap	86.9
	<----->	<a href="#">M00048</a>	ADR1	86.2

			<-----	<a href="#">M00048</a>	ADR1	86.2
			<-----	<a href="#">M00154</a>	STRE	85.8
			<-----	<a href="#">M00154</a>	STRE	85.8
			<-----	<a href="#">M00255</a>	GC box	85.3
1401	GAGCCCGCAG	CGCGGAGCGC	GGTTTAGCAC	CAACGGAGCC	GGGGGCGGCG	entry score
						<a href="#">M00048</a> ADR1 96.9
						<a href="#">M00227</a> v-Myb 93.0
						<a href="#">M00048</a> ADR1 89.2
						<a href="#">M00008</a> Sp1 89.0
						<a href="#">M00196</a> Sp1 87.8
						<a href="#">M00048</a> ADR1 87.7
						<a href="#">M00048</a> ADR1 87.7
						<a href="#">M00084</a> MZF1 87.1
1451	TCTTTGGGAT	GGAAAAGGGC	CAAAGGGGAG	GAGTGGGGTG	GGGGTGGGGG	entry score
						<a href="#">M00048</a> ADR1 100.0
						<a href="#">M00048</a> ADR1 98.5
						<a href="#">M00048</a> ADR1 98.5
						<a href="#">M00048</a> ADR1 93.8
						<a href="#">M00048</a> ADR1 93.8
						<a href="#">M00141</a> Lyf-1 92.2
						<a href="#">M00154</a> STRE 89.6
						<a href="#">M00048</a> ADR1 89.2
						<a href="#">M00048</a> ADR1 89.2
						<a href="#">M00008</a> Sp1 89.0
						<a href="#">M00083</a> MZF1 88.7
						<a href="#">M00087</a> Ik-2 88.2
						<a href="#">M00255</a> GC box 88.1
						<a href="#">M00196</a> Sp1 87.8
						<a href="#">M00271</a> AML-1a 87.4
						<a href="#">M00253</a> cap 87.1
						<a href="#">M00029</a> HSF 86.9
						<a href="#">M00050</a> E2F 86.2
						<a href="#">M00048</a> ADR1 86.2
						<a href="#">M00028</a> HSF 85.9
						<a href="#">M00196</a> Sp1 85.4
						<a href="#">M00134</a> HNF-4 85.4
						<a href="#">M00053</a> c-Rel 85.1
1501	TTTCACTGGT	CCACTATAAA	AGGACCGCTC	GGCTGCCCGG	TTCTTGCACT	entry score
						<a href="#">M00029</a> HSF 100.0
						<a href="#">M00216</a> TATA 99.0
						<a href="#">M00252</a> TATA 95.9
						<a href="#">M00048</a> ADR1 93.8
						<a href="#">M00101</a> CdxA 92.9
						<a href="#">M00028</a> HSF 88.5
						<a href="#">M00255</a> GC box 88.1
						<a href="#">M00253</a> cap 87.6
						<a href="#">M00253</a> cap 87.5
						<a href="#">M00100</a> CdxA 87.2
						<a href="#">M00196</a> Sp1 85.4
						<a href="#">M00053</a> c-Rel 85.1
1551	CGCTGGAAAG	CGGCTCCGAG	CCAGGGGCTA	TTGCAAAGCC	AGGGTG	entry score
						<a href="#">M00154</a> STRE 91.5
						<a href="#">M00048</a> ADR1 90.8
						<a href="#">M00048</a> ADR1 87.7
						<a href="#">M00116</a> C/EBPa 87.6
						<a href="#">M00253</a> cap 87.5
						<a href="#">M00029</a> HSF 86.9
						<a href="#">M00249</a> CHOP-C 86.1
						<a href="#">M00028</a> HSF 85.9

## -1415/+419 İnsan ADAMTS-1 Promotor Bölgesini Kesmeyen Enzimler

AarI, AatII, AbsI, AccI, AclI, AflIII, AgeI, AjuI, Alfi, ApaLI, ApoI, AscI, AsuII, BaeI, Ball, BamHI, BarI, BcgI, BciVI, BclI, BdaI, BfiI, BplI, BsaAI, BsaBI, BsmI, Bsp1407I, BspHI, BspMI, BsrDI, BstEII, BstXI, ClaI, DraIII, DrdI, Eam1105I, EcoRI, EcoRV, FseI, FspAI, HaeIV, HindII, HpaI, KpnI, MauBI, MfeI, MluI, MslI, NcoI, NdeI, NotI, NruI, OliI, PacI, PmaCI, PmeI, PshAI, PsiI, PI-PspI, PspXI, PsrI, RsrII, Sall, SanDI, ScaI, PI-SceI, SexAI, SfaNI, SfiI, SgrAI, SgrDI, SnaBI, SpeI, SrfI, Sse8387I, SspI, StuI, SwaI, TaqII, TfiI, TsoI, Tth111I, VspI, XhoI

## -1415/+419 İnsan ADAMTS-1 Promotor Bölgesi

**GACGTGTGGGAGAACTAGAA**GGGACGCTTCTGGCTGGGGCCAAGTGAAGT  
 GGGGAAGATCTGGGGAGGAGCGAGGAAAGGACCCAGATCTACTTGGAGCCAACCAAGAGA  
 CCGGACGGGAGTGGGGCGGAAAGGC**GGAGACCAGTTCGAGCACA**ACGCGGGGGCGCGCG  
 AGTGTGAGGGTTGCGGGTCCGCCCGGGGCTAGGGCGGTTCGCTCTCGCCATTGTCCCCGCG  
 GCTTCCCGCTGTGAAACACGTCCTTCTCTGGGTCTTGGAGCCCTCCCACTTTTTTGGGA  
 GAGAAGAGCCACTCAGTTTTTTTTTCTAAGGACCTGTTGGTGGACCTCTCCTCGCTTTCG  
 TAACGCG**GATATAGCCTTTTCCCTTCCT**GGTAGGAAGAGGAAGGAGGGTCCGGGAAGGA  
 AGCCGATTTCTTCTTTCCCTCTGCACGCTTGCTAGCCCCAGCGATCGCTGCTGGCCC  
 CCGGGTAGGAAAGTGGGGTTCCTGGCCGTTTCTGCGACGCTGGCCTAGGGCTTGCAGCTG  
 CTGTTGAGTGAAAGCACGACACTGGCGGGAGCCGATCATTCTCGAATGAAGAAGAAAA  
 AGCGCAATTCCCTCCTTATGCTCTAGGGAATTGAGCCGCTCCAGATCACCCATTCCAG  
 AAATGTGAAACCGGGCC**TCACAAAGTCGTCCTGGTGA**AGAGGTGGCGTGGGGGTGGG  
 GGTTGGTGGAGGTGAAGGCATAAGCAAACATATTTTAAATCCAGATCGTAGGAAGTGT  
 CACCTGGCCCCTCACCCAGGCATGCTTTCTGGGGGAAGCGCAGGGCCAAGCTTTCCCTAG  
 AAAAGCTGGGGCGAAGAGAGAGCAGGGCGGGCTAAGGAGCTCCTGGCAGGCTGGGAAGG  
 TGGAGAAGTGGGGTGGGTATTTTTCTAGAAA**GTGTAGCCCTAGCTCATCTCCT**TAGATTG  
 GGAAGAGGAACTGAGGGAGGAGGAAGGAGACCCAGGGCAGCTCCAGGATAGGGAAAT  
 GTTGAAGAAGGGACTGCGTTCTCCAACCGAACCTCCCTCTGGGAACCGCAGCCAGCG  
 CGGTAAGTGTACCGCAACCGGGCGGTGGGGAGGAAGGGTGGTCCAGGAAACCGCGGA  
 GGGAGAAAAGCGGTGAAGGGAGAGTCTTCTCCCTGGAGCGGCC**CAAGTACAAGTG**  
**CTGGTCA**CAGCGCCCTTCCGCCCTAGATTGACGAGCAGTGGCGTGGAGCCAGCGCGGA  
 GGCTGCCCCCTCCCTCCCGAGCCCGCAGCGCGG**AGCGGGTTAGCACCAAC**GGAGCC  
 GGGGGCGGCTCTTTGGGATGGAAAAGGGCCAAAGGGAGGAGTGGGGTGGGGGTGGGGG  
 TTCACTGGTCCAC**TATAAAA**GGACCCTCGGCTGCCCGTTCTT**GC**ACTCGCTGGAAAAG  
 CGGCTCCGAGCCAGGGGCTATTGCAAAGCCAGG**GTG**CGCTACCGGACGGAGGGGAGAG  
 CCCTGAGCAGAGTGAGCAACATCGCAGCCAAGGCGGAGGCCGAAGGGGGCGCCAGGCAC  
 CAATCTCCGCGTTGCCTCAGCCCCGAGGCGCCCCAGAGCGCTTCTTGTCCAGCAGAGC  
 CACTCTGCCTGCGCTGCCTCTCAGTGTCTCCAACCTTTCGCTGGAAAGAAAACTTCCCG  
 CGCGCCGCGAAGTGCAGCGCTCCTTTTAGTACTCCGGGAGCTTCGGCTGTAGCCGG  
 CTCTGCGGCCCTTCCAACGAATAATAGAAATTGTTAATTTTAACAATCCAGAGCAGGCC  
 AACGAGGCTTTGCTCTCCCGACCC**AACTAAAGGTCCCTCGCTC**

## İnsan ADAMTS-1 promotorunun -1415/+419 bölgesinin transkripsiyon faktörü bağlanma motiflerinin TRANSFAC 1.3 kullanılarak belirlenmesi

1	GACGTGTGGG	AGAACTAGAA	GGGACGCTTC	TGGCTGGGGC	CAACTGAAGT	entry	score	
	----	>				<a href="#">M00029</a> HSF	100.0	
						---	<a href="#">M00083</a> MZF1	100.0
							<a href="#">M00048</a> ADR1	95.4
							<a href="#">M00028</a> HSF	95.3
							<a href="#">M00028</a> HSF	95.3
						-	<a href="#">M00048</a> ADR1	93.8
							<a href="#">M00029</a> HSF	93.7
							<a href="#">M00029</a> HSF	93.7
						-----	<a href="#">M00240</a> Nkx-2.	90.7

				<-----	<a href="#">M00253</a>	cap	89.1
	----->				<a href="#">M00028</a>	HSF	88.5
	----->				<a href="#">M00141</a>	Lyf-1	88.3
	----->				<a href="#">M00087</a>	Ik-2	86.8
51	GGGGAAGATC TGGGGAGGAG CGAGGAAAGG ACCCAGATCT ACTTGGAGCC				entry		score
	----->				<a href="#">M00083</a>	MZF1	100.0
	----->				<a href="#">M00048</a>	ADR1	93.8
		----->			<a href="#">M00048</a>	ADR1	93.8
	>				<a href="#">M00240</a>	Nkx-2.	90.7
				----->	<a href="#">M00048</a>	ADR1	89.2
		----->			<a href="#">M00083</a>	MZF1	87.8
			----->		<a href="#">M00029</a>	HSF	86.9
		----->			<a href="#">M00048</a>	ADR1	86.2
			----->		<a href="#">M00028</a>	HSF	85.9
				---	<a href="#">M00226</a>	P	85.1
101	AACCAAGAGA CCGGACGGGA GTGGGGCGGA AAGCGGAGA CCAGTTCGAG				entry		score
		----->			<a href="#">M00048</a>	ADR1	95.4
		----->			<a href="#">M00033</a>	p300	90.1
		----->			<a href="#">M00048</a>	ADR1	87.7
				<----	<a href="#">M00029</a>	HSF	87.4
			----->		<a href="#">M00029</a>	HSF	86.9
		<-----			<a href="#">M00253</a>	cap	86.7
			----->		<a href="#">M00048</a>	ADR1	86.2
			----->		<a href="#">M00028</a>	HSF	85.9
		----->			<a href="#">M00032</a>	c-Ets-	85.3
		----->			<a href="#">M00083</a>	MZF1	85.2
	----->				<a href="#">M00226</a>	P	85.1
151	CACTAACGCG GGGGCGCGCG AGTGTGAGGG TTGCGGGTCC GCCCGGGGCT				entry		score
	----->			----->	<a href="#">M00048</a>	ADR1	96.9
				----->	<a href="#">M00048</a>	ADR1	93.8
		<-----			<a href="#">M00253</a>	cap	91.3
	----->				<a href="#">M00048</a>	ADR1	89.2
		<-----			<a href="#">M00263</a>	StuAp	86.2
		<-----			<a href="#">M00253</a>	cap	85.6
201	AGGGCGGTCTG CTCTCGCCAT TGTCCCCGCG GCTTTCGCC TGTGAAACAC				entry		score
		<-----			<a href="#">M00048</a>	ADR1	92.3
		<-----			<a href="#">M00083</a>	MZF1	90.4
			<----		<a href="#">M00029</a>	HSF	86.9
			----->		<a href="#">M00053</a>	c-Rel	86.0
			<----		<a href="#">M00028</a>	HSF	85.9
251	GTCCTTCCTC TGGGTCTTGG AGCCCTCCC ACTTTTGGG GAGAAGAGCC				entry		score
				----->	<a href="#">M00028</a>	HSF	95.3
				----->	<a href="#">M00029</a>	HSF	93.7
		<-----			<a href="#">M00048</a>	ADR1	90.8
			----->		<a href="#">M00048</a>	ADR1	87.7
		<-----			<a href="#">M00255</a>	GC box	87.6
			----->		<a href="#">M00141</a>	Lyf-1	87.0
		<-----			<a href="#">M00196</a>	Sp1	86.5
		<-----			<a href="#">M00048</a>	ADR1	86.2
				-----	<a href="#">M00254</a>	CCAAT	85.6
301	ACTCAGTTTT TTTTCCTAAG GACCTGTGG TGGACCTCTC CTCGCTTTCG				entry		score
	----->				<a href="#">M00253</a>	cap	95.7
				<----	<a href="#">M00028</a>	HSF	91.1
		<-----			<a href="#">M00022</a>	Hb	91.1
		<-----			<a href="#">M00094</a>	BR-C Z	88.7
		<-----			<a href="#">M00022</a>	Hb	88.4
				<----	<a href="#">M00228</a>	VBP	88.1
		<----			<a href="#">M00029</a>	HSF	86.9
				-----	<a href="#">M00040</a>	CRE-BP	86.7
				<----	<a href="#">M00040</a>	CRE-BP	86.7
		<----			<a href="#">M00028</a>	HSF	85.9
	----->				<a href="#">M00254</a>	CCAAT	85.6
				<----	<a href="#">M00260</a>	HLF	85.3
351	TAACGCGGAT ATAGCCTTTT CCCTTCCTGG TAGGAAGAGG AAGGAGGGGT				entry		score
				----->	<a href="#">M00048</a>	ADR1	95.4
			<-----		<a href="#">M00226</a>	P	89.6
	----->				<a href="#">M00076</a>	GATA-2	88.9
	-----				<a href="#">M00228</a>	VBP	88.1
				----->	<a href="#">M00048</a>	ADR1	87.7
		<-----			<a href="#">M00120</a>	dl	87.1

		<-----	<a href="#">M00029</a>	HSF	86.9				
-->			<a href="#">M00040</a>	CRE-BP	86.7				
---			<a href="#">M00040</a>	CRE-BP	86.7				
			<-	<a href="#">M00223</a>	STATx	86.5			
		<-----	<a href="#">M00028</a>	HSF	85.9				
----			<a href="#">M00260</a>	HLF	85.3				
401	CCGGGAAGGA	AGCCGATTTC	CTTCTTTCCC	CCTCTGCACG	CTTGCTAGCC	entry	score		
						<--	<a href="#">M00048</a>	ADR1	95.4
		<----					<a href="#">M00028</a>	HSF	95.3
			<-----				<a href="#">M00048</a>	ADR1	93.8
		<----					<a href="#">M00029</a>	HSF	93.7
	<-----						<a href="#">M00046</a>	GCR1	90.9
			<-----				<a href="#">M00084</a>	MZF1	90.3
			<-----				<a href="#">M00083</a>	MZF1	88.7
			<-----				<a href="#">M00154</a>	STRE	87.7
			<-----				<a href="#">M00048</a>	ADR1	87.7
		<----					<a href="#">M00029</a>	HSF	86.9
			<----				<a href="#">M00029</a>	HSF	86.9
	-----						<a href="#">M00223</a>	STATx	86.5
		<----					<a href="#">M00028</a>	HSF	85.9
			<----				<a href="#">M00028</a>	HSF	85.9
451	CCAGCGATCG	CTGCTGGCCC	CCGGGTAGGA	AAGTGGGGTT	CCTGGCCGTT	entry	score		
				----->			<a href="#">M00048</a>	ADR1	100.0
						<-	<a href="#">M00028</a>	HSF	100.0
		<-----					<a href="#">M00048</a>	ADR1	96.9
						<-	<a href="#">M00029</a>	HSF	96.0
---							<a href="#">M00048</a>	ADR1	95.4
							<a href="#">M00029</a>	HSF	90.9
							<a href="#">M00226</a>	P	90.5
		<-----					<a href="#">M00048</a>	ADR1	89.2
							<a href="#">M00247</a>	PacC	88.2
							<a href="#">M00271</a>	AML-1a	87.4
	----->						<a href="#">M00104</a>	CDP CR	87.3
	<-----						<a href="#">M00104</a>	CDP CR	87.3
				----->			<a href="#">M00029</a>	HSF	86.9
				----->			<a href="#">M00028</a>	HSF	85.9
	----->						<a href="#">M00106</a>	CDP CR	85.4
	<-----						<a href="#">M00106</a>	CDP CR	85.4
						<-----	<a href="#">M00227</a>	v-Myb	85.0
501	TCTGCGACGC	TGGCCTAGGG	CTTGACGCTG	CTGTTGAGTG	AAAGCACGCA	entry	score		
---							<a href="#">M00028</a>	HSF	100.0
---							<a href="#">M00029</a>	HSF	96.0
			----->				<a href="#">M00184</a>	MyoD	88.3
						<-	<a href="#">M00253</a>	cap	87.6
			----->				<a href="#">M00175</a>	AP-4	87.5
			<-----				<a href="#">M00175</a>	AP-4	87.5
							<a href="#">M00253</a>	cap	86.9
---							<a href="#">M00227</a>	v-Myb	85.0
551	GACTGGCGGG	AGCCGATCAT	TTCTCGAATG	AAGAAGAAAA	AGCGCAATTC	entry	score		
		<-----					<a href="#">M00028</a>	HSF	100.0
				----->			<a href="#">M00028</a>	HSF	100.0
		<-----					<a href="#">M00029</a>	HSF	96.0
				----->			<a href="#">M00029</a>	HSF	96.0
				----->			<a href="#">M00028</a>	HSF	95.3
				----->			<a href="#">M00029</a>	HSF	93.7
	----->						<a href="#">M00253</a>	cap	91.0
		<-----					<a href="#">M00253</a>	cap	89.4
-----							<a href="#">M00253</a>	cap	87.6
						<---	<a href="#">M00029</a>	HSF	86.3
				----->			<a href="#">M00022</a>	Hb	85.7
			----->				<a href="#">M00028</a>	HSF	85.4
		<-----					<a href="#">M00027</a>	AbaA	85.2
601	CCTCCTTATG	CTCTAGGGAA	TTGAGCCCGG	TCCCAGATCA	CCCATTCCAG	entry	score		
						--	<a href="#">M00028</a>	HSF	100.0
						--	<a href="#">M00029</a>	HSF	96.0
						<--	<a href="#">M00101</a>	CdxA	93.6
						-	<a href="#">M00063</a>	IRF-2	90.6
						-	<a href="#">M00062</a>	IRF-1	90.1
						<--	<a href="#">M00100</a>	CdxA	89.7
							<a href="#">M00253</a>	cap	88.3
				----->			<a href="#">M00075</a>	GATA-1	88.2
<-----							<a href="#">M00048</a>	ADR1	87.7

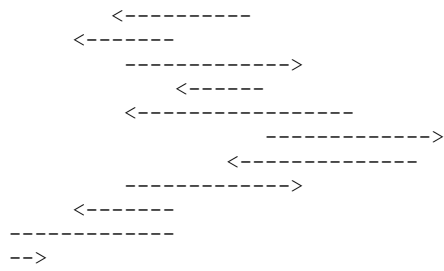
-			<a href="#">M00029</a>	HSF	86.3
	----->		<a href="#">M00029</a>	HSF	86.3
		<-----	<a href="#">M00029</a>	HSF	86.3
		----->	<a href="#">M00263</a>	StuAp	86.2
	<-----		<a href="#">M00253</a>	cap	85.5
651	AAATGTGAAA CCGGGCCCTC ACAAAGTCGT CTCTGGTGAA GAGGTGGCGT		entry	score	
	-->		<a href="#">M00028</a>	HSF	100.0
	-->		<a href="#">M00029</a>	HSF	96.0
	-----		<a href="#">M00101</a>	CdxA	93.6
	----->		<a href="#">M00063</a>	IRF-2	90.6
	----->		<a href="#">M00062</a>	IRF-1	90.1
	-----		<a href="#">M00100</a>	CdxA	89.7
	<-----		<a href="#">M00253</a>	cap	87.5
		<-----	<a href="#">M00100</a>	CdxA	87.2
		<-----	<a href="#">M00141</a>	Lyf-1	87.0
		----->	<a href="#">M00001</a>	MyoD	86.0
	----->		<a href="#">M00072</a>	CP2	85.4
701	GCGGGGTGGG GGTGGTGGA GGGTGAAGGC ATAAGCAAAC ATATTTTAAA		entry	score	
	----->		<a href="#">M00048</a>	ADR1	98.5
	----->		<a href="#">M00048</a>	ADR1	98.5
	<-----		<a href="#">M00226</a>	P	96.8
		<-----	<a href="#">M00131</a>	HNF-3b	95.4
	----->		<a href="#">M00048</a>	ADR1	93.8
		<-----	<a href="#">M00253</a>	cap	93.0
	----->		<a href="#">M00048</a>	ADR1	92.3
		----->	<a href="#">M00148</a>	SRY	90.9
		<-----	<a href="#">M00159</a>	C/EBP	89.2
		<-----	<a href="#">M00130</a>	HFH-2	87.0
		----->	<a href="#">M00148</a>	SRY	86.4
	----->		<a href="#">M00084</a>	MZF1	85.5
		<-----	<a href="#">M00101</a>	CdxA	85.0
751	ATCCAGATCG TAGGAAGTGT CACCTGGCCC CTCACCCAGG CATGCTTTCT		entry	score	
		<-----	<a href="#">M00028</a>	HSF	100.0
	-		<a href="#">M00048</a>	ADR1	98.5
		<-----	<a href="#">M00029</a>	HSF	96.0
		<-----	<a href="#">M00154</a>	STRE	92.5
		<-----	<a href="#">M00048</a>	ADR1	90.8
	----->		<a href="#">M00187</a>	USF	90.4
	----->		<a href="#">M00184</a>	MyoD	89.4
		<-----	<a href="#">M00084</a>	MZF1	88.7
	----->		<a href="#">M00073</a>	deltaE	87.4
		-----	<a href="#">M00100</a>	CdxA	85.9
	----->		<a href="#">M00122</a>	USF	85.3
	<-----		<a href="#">M00122</a>	USF	85.3
		--	<a href="#">M00083</a>	MZF1	85.2
801	GGGGGAAGCG CAGGGCCAAG CTTTCCCTAG AAAAGCTGGG GCGAAGAGAG		entry	score	
	----->		<a href="#">M00028</a>	HSF	100.0
			<a href="#">M00048</a>	ADR1	98.5
	----->		<a href="#">M00029</a>	HSF	96.0
		----->	<a href="#">M00048</a>	ADR1	95.4
	----->		<a href="#">M00048</a>	ADR1	87.7
		<-----	<a href="#">M00101</a>	CdxA	87.1
		<-----	<a href="#">M00029</a>	HSF	86.9
		----->	<a href="#">M00216</a>	TATA	86.8
	<-----		<a href="#">M00009</a>	Ttk 69	86.7
		----->	<a href="#">M00028</a>	HSF	86.5
		<-----	<a href="#">M00028</a>	HSF	85.9
	>		<a href="#">M00100</a>	CdxA	85.9
	----->		<a href="#">M00083</a>	MZF1	85.2
851	AGCAGGCGGC GGCTAAGGAG CTCCTGGCAG GCTGGGAAGG TGGAGAAGTG		entry	score	
		--	<a href="#">M00048</a>	ADR1	100.0
	----->		<a href="#">M00028</a>	HSF	95.3
	----->		<a href="#">M00029</a>	HSF	93.7
		<--	<a href="#">M00221</a>	SREBP-	90.1
	<-----		<a href="#">M00247</a>	PacC	88.2
		----->	<a href="#">M00048</a>	ADR1	87.7
		--	<a href="#">M00271</a>	AML-1a	87.4
		<-	<a href="#">M00253</a>	cap	87.3
	----->		<a href="#">M00009</a>	Ttk 69	86.7
901	GGGTGAGGTA TTTTCTAGA AAGTGTAGCC CTAGCTCATC TCCTAGATTG		entry	score	
	-->		<a href="#">M00048</a>	ADR1	100.0

	<-----		<a href="#">M00028</a>	HSF	100.0	
		----->	<a href="#">M00028</a>	HSF	100.0	
	<-----		<a href="#">M00029</a>	HSF	96.0	
		----->	<a href="#">M00029</a>	HSF	96.0	
			-- <a href="#">M00048</a>	ADR1	93.8	
			---- <a href="#">M00083</a>	MZF1	93.0	
-----			<a href="#">M00221</a>	SREBP-	90.1	
			----- <a href="#">M00077</a>	GATA-3	89.4	
----->			<a href="#">M00271</a>	AML-1a	88.7	
			----- <a href="#">M00075</a>	GATA-1	88.6	
---->			<a href="#">M00271</a>	AML-1a	87.4	
-----			<a href="#">M00253</a>	cap	87.3	
			<a href="#">M00253</a>	cap	87.2	
	----->		<a href="#">M00101</a>	CdxA	87.1	
			<a href="#">M00075</a>	GATA-1	86.1	
<-----			<a href="#">M00101</a>	CdxA	85.7	
			----- <a href="#">M00109</a>	C/EBPb	85.5	
951	GGGAAGAGGG AACTGAGGGA GGAGGGAAGG AGACCCAGGG CAGCTCCAGG	entry		score		
			---- <a href="#">M00076</a>	GATA-2	96.0	
	<-----		<a href="#">M00253</a>	cap	93.9	
---->			<a href="#">M00048</a>	ADR1	93.8	
			---- <a href="#">M00075</a>	GATA-1	93.5	
---->			<a href="#">M00083</a>	MZF1	93.0	
			--- <a href="#">M00077</a>	GATA-3	92.2	
----->			<a href="#">M00029</a>	HSF	90.9	
->			<a href="#">M00077</a>	GATA-3	89.4	
			<----- <a href="#">M00048</a>	ADR1	89.2	
			-- <a href="#">M00109</a>	C/EBPb	88.7	
->			<a href="#">M00075</a>	GATA-1	88.6	
	----->		<a href="#">M00048</a>	ADR1	87.7	
	----->		<a href="#">M00048</a>	ADR1	86.2	
			-- <a href="#">M00203</a>	GATA-X	85.9	
----->			<a href="#">M00109</a>	C/EBPb	85.5	
1001	ATAGGGAAT GTTGAAGAAG GGAAGGAGG CTCCAACCGA ACCCTCCCTC	entry		score		
			<a href="#">M00029</a>	HSF	100.0	
----->			<a href="#">M00076</a>	GATA-2	96.0	
	----->		<a href="#">M00028</a>	HSF	95.3	
	----->		<a href="#">M00029</a>	HSF	93.7	
----->			<a href="#">M00075</a>	GATA-1	93.5	
----->			<a href="#">M00077</a>	GATA-3	92.2	
	<-----		<a href="#">M00253</a>	cap	91.8	
----->			<a href="#">M00109</a>	C/EBPb	88.7	
	<-----		<a href="#">M00028</a>	HSF	88.5	
	<-----		<a href="#">M00048</a>	ADR1	87.7	
			<--- <a href="#">M00048</a>	ADR1	87.7	
			----->	<a href="#">M00029</a>	HSF	87.4
----->			<a href="#">M00029</a>	HSF	86.9	
			<----- <a href="#">M00048</a>	ADR1	86.2	
----->			<a href="#">M00028</a>	HSF	85.9	
			<----- <a href="#">M00147</a>	HSF2	85.9	
----->			<a href="#">M00203</a>	GATA-X	85.9	
1051	CTGGGAACCG CAGCCAGCG CGGTAAGTGA GTTACCGBAA CCGGGCGGTG	entry		score		
			---- <a href="#">M00083</a>	MZF1	98.3	
			-- <a href="#">M00048</a>	ADR1	93.8	
<-----			<a href="#">M00271</a>	AML-1a	92.0	
			<----- <a href="#">M00271</a>	AML-1a	92.0	
----->			<a href="#">M00029</a>	HSF	90.9	
	<-----		<a href="#">M00253</a>	cap	90.2	
--			<a href="#">M00048</a>	ADR1	87.7	
	<-----		<a href="#">M00188</a>	AP-1	85.7	
	<-----		<a href="#">M00173</a>	AP-1	85.6	
1101	GGGAGGAAGG GTGGTCCAGG AAACCGGCGA GGGAGAAAAG CGGTGGAAGG	entry		score		
			---->	<a href="#">M00028</a>	HSF	100.0
---->			<a href="#">M00083</a>	MZF1	98.3	
			----->	<a href="#">M00029</a>	HSF	96.0
---->			<a href="#">M00048</a>	ADR1	93.8	
			----->	<a href="#">M00120</a>	dl	89.2
	----->		<a href="#">M00029</a>	HSF	86.9	
----->			<a href="#">M00048</a>	ADR1	86.2	
	----->		<a href="#">M00028</a>	HSF	85.9	
			----->	<a href="#">M00127</a>	GATA-1	85.5
<-----			<a href="#">M00253</a>	cap	85.2	

1151	GAGAGTCTTC TCCCTGGAGC GGCCCCAGCA GTACAAAGTG CTGGTCACAG	entry	score
	<-----	<a href="#">M00048</a>	ADR1 95.4
	<-----	<a href="#">M00028</a>	HSF 95.3
	<-----	<a href="#">M00029</a>	HSF 93.7
	<-----	<a href="#">M00048</a>	ADR1 89.2
	<-----	<a href="#">M00147</a>	HSF2 87.8
	<-----	<a href="#">M00147</a>	HSF2 85.9
1201	CGCCCCCTCC GCCCCTAGAT TGACGAGCAG TGGCGTGGAG CCAGCGCGGA	entry	score
	<-----	<a href="#">M00048</a>	ADR1 90.8
	<-----	<a href="#">M00048</a>	ADR1 90.8
	<-----	<a href="#">M00048</a>	ADR1 90.8
	<-----	<a href="#">M00253</a>	cap 89.9
	<-----	<a href="#">M00048</a>	ADR1 89.2
	<-----	<a href="#">M00154</a>	STRE 88.7
	<-----	<a href="#">M00154</a>	STRE 87.7
	<-----	<a href="#">M00253</a>	cap 86.9
1251	GGCTGCCCCC TCCCCCTCCC GAGCCCGCAG CGCGGAGCGC GGTTTAGCAC	entry	score
	<-----	<a href="#">M00048</a>	ADR1 93.8
	<-----	<a href="#">M00048</a>	ADR1 93.8
	<-----	<a href="#">M00227</a>	v-Myb 93.0
	<-----	<a href="#">M00048</a>	ADR1 90.8
	<-----	<a href="#">M00253</a>	cap 89.9
	<-----	<a href="#">M00084</a>	MZF1 89.5
	<-----	<a href="#">M00196</a>	Sp1 89.3
	<-----	<a href="#">M00048</a>	ADR1 89.2
	<-----	<a href="#">M00083</a>	MZF1 88.7
	<-----	<a href="#">M00048</a>	ADR1 87.7
	<-----	<a href="#">M00048</a>	ADR1 87.7
	<-----	<a href="#">M00084</a>	MZF1 87.1
	<-----	<a href="#">M00048</a>	ADR1 86.2
	<-----	<a href="#">M00048</a>	ADR1 86.2
	<-----	<a href="#">M00154</a>	STRE 85.8
	<-----	<a href="#">M00154</a>	STRE 85.8
	<-----	<a href="#">M00255</a>	GC box 85.3
1301	CAACGGAGCC GGGGGCGGCG TCTTTGGGAT GGAAAAGGGC CAAAGGGGAG	entry	score
	<-----	<a href="#">M00048</a>	ADR1 96.9
	<-----	<a href="#">M00227</a>	v-Myb 93.0
	<-----	<a href="#">M00141</a>	Lyf-1 92.2
	<-----	<a href="#">M00154</a>	STRE 89.6
	<-----	<a href="#">M00048</a>	ADR1 89.2
	<-----	<a href="#">M00048</a>	ADR1 89.2
	<-----	<a href="#">M00048</a>	ADR1 89.2
	<-----	<a href="#">M00008</a>	Sp1 89.0
	<-----	<a href="#">M00083</a>	MZF1 88.7
	<-----	<a href="#">M00087</a>	Ik-2 88.2
	<-----	<a href="#">M00196</a>	Sp1 87.8
	<-----	<a href="#">M00048</a>	ADR1 87.7
	<-----	<a href="#">M00253</a>	cap 87.1
	<-----	<a href="#">M00029</a>	HSF 86.9
	<-----	<a href="#">M00050</a>	E2F 86.2
	<-----	<a href="#">M00048</a>	ADR1 86.2
	<-----	<a href="#">M00028</a>	HSF 85.9
	<-----	<a href="#">M00134</a>	HNF-4 85.4
1351	GAGTGGGGTG GGGGTGGGGG TTTCCTGGT CCACTATAAA AGGACCGCTC	entry	score
	<-----	<a href="#">M00048</a>	ADR1 100.0
	<-----	<a href="#">M00216</a>	TATA 99.0
	<-----	<a href="#">M00048</a>	ADR1 98.5
	<-----	<a href="#">M00048</a>	ADR1 98.5
	<-----	<a href="#">M00252</a>	TATA 95.9
	<-----	<a href="#">M00048</a>	ADR1 93.8
	<-----	<a href="#">M00048</a>	ADR1 93.8
	<-----	<a href="#">M00101</a>	CdxA 92.9
	<-----	<a href="#">M00048</a>	ADR1 89.2
	<-----	<a href="#">M00255</a>	GC box 88.1
	<-----	<a href="#">M00253</a>	cap 87.6
	<-----	<a href="#">M00271</a>	AML-1a 87.4
	<-----	<a href="#">M00100</a>	CdxA 87.2
	<-----	<a href="#">M00253</a>	cap 87.1
	<-----	<a href="#">M00048</a>	ADR1 86.2
	<-----	<a href="#">M00196</a>	Sp1 85.4
	<-----	<a href="#">M00134</a>	HNF-4 85.4
	<-----	<a href="#">M00053</a>	c-Rel 85.1



1401	GGCTGCCCGG TTCTTGCACT CGCTGGAAAG CGGCTCCGAG CCAGGGGCTA	entry	score
	<-----	<a href="#">M00029</a>	HSF 100.0
		<a href="#">M00154</a>	STRE 91.5
		<a href="#">M00048</a>	ADR1 90.8
	<-----	<a href="#">M00028</a>	HSF 88.5
		<a href="#">M00048</a>	ADR1 87.7
		<a href="#">M00116</a>	C/EBPa 87.6
	----->	<a href="#">M00253</a>	cap 87.5
	----->	<a href="#">M00029</a>	HSF 86.9
	----->	<a href="#">M00249</a>	CHOP-C 86.1
	----->	<a href="#">M00028</a>	HSF 85.9
1451	TTGCAAAGCC AGGGTGCCT ACCGGACGGA GAGGGGAGAG CCCTGAGCAG	entry	score
		<a href="#">M00083</a>	MZF1 94.8
		<a href="#">M00253</a>	cap 92.6
		<a href="#">M00048</a>	ADR1 89.2
		<a href="#">M00116</a>	C/EBPa 87.6
		<a href="#">M00032</a>	c-Ets- 86.3
		<a href="#">M00048</a>	ADR1 86.2
		<a href="#">M00249</a>	CHOP-C 86.1
1501	AGTGAGCAAC ATCGCAGCCA AGGCGGAGGC CGAAGAGGGG CGCCAGGCAC	entry	score
	-----	<a href="#">M00253</a>	cap 92.6
		<a href="#">M00075</a>	GATA-1 92.2
		<a href="#">M00048</a>	ADR1 90.8
		<a href="#">M00048</a>	ADR1 90.8
		<a href="#">M00028</a>	HSF 86.5
		<a href="#">M00154</a>	STRE 85.8
		<a href="#">M00076</a>	GATA-2 85.8
		<a href="#">M00077</a>	GATA-3 85.6
		<a href="#">M00185</a>	NF-Y 85.1
1551	CAATCTCCGC GTTGCCTCAG CCCCAGGAGC GCCCAGAGC GCTTCTTGTC	entry	score
		<a href="#">M00048</a>	ADR1 95.4
		<a href="#">M00028</a>	HSF 95.3
		<a href="#">M00253</a>	cap 94.8
		<a href="#">M00048</a>	ADR1 93.8
		<a href="#">M00029</a>	HSF 93.7
		<a href="#">M00075</a>	GATA-1 92.2
		<a href="#">M00048</a>	ADR1 90.8
		<a href="#">M00048</a>	ADR1 86.2
		<a href="#">M00076</a>	GATA-2 85.8
		<a href="#">M00077</a>	GATA-3 85.6
		<a href="#">M00185</a>	NF-Y 85.1
		<a href="#">M00189</a>	AP-2 85.0
1601	CCAGCAGAGC CACTCTGCCT GCGCCTGCCT CTCAGTGTCT CCAACTTTGC	entry	score
		<a href="#">M00253</a>	cap 92.9
		<a href="#">M00048</a>	ADR1 87.7
1651	GCTGGAAGAA AACTTCCCG CGCGCCGCA GAACTGCAGC GCCTCCTTTT	entry	score
	----->	<a href="#">M00028</a>	HSF 100.0
	----->	<a href="#">M00029</a>	HSF 100.0
	----->	<a href="#">M00029</a>	HSF 96.0
		<a href="#">M00204</a>	GCN4 90.7
		<a href="#">M00028</a>	HSF 88.5
		<a href="#">M00253</a>	cap 88.0
		<a href="#">M00048</a>	ADR1 87.7
		<a href="#">M00022</a>	Hb 85.7
		<a href="#">M00025</a>	Elk-1 85.2
1701	AGTGACTCCG GGAGCTTCGG CTGTAGCCGG CTCTGCGCGC CCTTCCAACG	entry	score
	<-----	<a href="#">M00048</a>	ADR1 92.3
	----->	<a href="#">M00204</a>	GCN4 90.7
	----->	<a href="#">M00172</a>	AP-1 90.3
	----->	<a href="#">M00173</a>	AP-1 89.7
	----->	<a href="#">M00188</a>	AP-1 88.8
	----->	<a href="#">M00174</a>	AP-1 86.6
	<-----	<a href="#">M00028</a>	HSF 86.5
		<a href="#">M00019</a>	Dfd 85.5
		<a href="#">M00028</a>	HSF 85.4
1751	AATAATAGAA ATTGTTAATT TTAACAATCC AGAGCAGGCC AACGAGGCTT	entry	score
	----->	<a href="#">M00028</a>	HSF 100.0
	----->	<a href="#">M00101</a>	CdxA 98.6
	----->	<a href="#">M00029</a>	HSF 96.0
	----->	<a href="#">M00042</a>	Sox-5 95.4



1801 TGCTCTCCCG ACCCGAACTA AAGGTCCTC GCTC  
 ----->

<a href="#">M00042</a>	Sox-5	94.8
<a href="#">M00101</a>	CdxA	94.3
<a href="#">M00130</a>	HFH-2	90.5
<a href="#">M00101</a>	CdxA	87.9
<a href="#">M00019</a>	Dfd	87.2
<a href="#">M00160</a>	SRY	86.9
<a href="#">M00149</a>	SBF-1	86.8
<a href="#">M00129</a>	HFH-1	86.2
<a href="#">M00100</a>	CdxA	85.9
<a href="#">M00019</a>	Dfd	85.5
<a href="#">M00028</a>	HSF	85.4

entry	score
<a href="#">M00029</a>	HSF 87.4

## **Ek C Tez Çalışması Kapsamında Yapılan Bilimsel Çalışmalar**

### **Tez Çalışması Kapsamında Yapılan Uluslar Arası Yayınlar**

- 1) Turkoglu S.A., Sunay B., Yildirim H., Kockar F., 'Are reference genes, GAPDH, beta-Actin and H-beta-2-microgloblin affected under normoxic and hypoxic conditions in Hep3B cells?', Febs Journal, 278, 195-195, 2011
- 2) Sunay F.B., Turkoglu S. A., Kockar F., Okuyan D., 'The expressions of ADAMTS1 and VEGF in Du145, PC3, MCF-7 and HT-29 cell lines', Febs Journal, 277, 169-169, 2010.
- 3) Sunay FB., Turkoglu SA., Kockar F., 'The expressions of ADAMTS-1-2-3 and-8 in Hep3B cells' Febs Journal, 276:122-122, 2009.
- 4) Turkoglu S.A., Kockar F., 'Cloning and Sequence Analysis of Human ADAMTS-1 Gene Promoter' 4th EORTC pathobiology group annual meeting and 1st international multidisiplinary cancer research congress, 21-24 May, 2009-05-27

### **Tez Çalışması Kapsamında Yapılan Ulusal Yayınlar**

- 1) F.Bahar Sunay, Sümeyye Aydoğan Türkoğlu, Feray Köçkar, 'ADAMTS ailesi ve anti-anjiyogenetik ADAMTS1', Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi, Basımda.
- 2) Sümeyye Aydoğan Türkoğlu, Bahar Sunay, Feray Köçkar "ADAMTS1'in PC-3 Hücre Hattında Normal ve Hipoksik koşullarda Ekspresyonu" 1. Ulusal Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji Kongresi 26 – 29 Ekim 2010.