

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



**ADAMTS-8 GENİNİN SP1 ARACILI TRANSKRİPSİYONEL
REGÜLASYONU**

YASEMİN KELEŞ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Jüri Üyeleri: **Prof. Dr. Feray KÖÇKAR (Tez Danışmanı)**
 Prof. Dr. Berrin TUNCA
 Doç. Dr. Esra TOKAY

BALIKESİR, ARALIK- 2023

ETİK BEYAN

Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak tarafımda hazırlanan “**ADAMTS-8 Geninin SP1 Aracılı Transkripsiyonel Regülasyonu**” başlıklı tezde;

- Tüm bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Kullanılan veriler ve sonuçlarda herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Tüm bilgi ve sonuçları bilimsel araştırma ve etik ilkelere uygun şekilde sunduğumu,
- Yararlandığım eserlere atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,

beyan eder, aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul ederim.

Yasemin KELEŞ

Bu tez çalışması kısmi olarak 119Z101 Numaralı TÜBİTAK 1001 projesi ile desteklenmiştir.

ÖZET

ADAMTS-8 Geninin SP1 Aracılı Transkripsiyonel Regülasyonu

YÜKSEK LİSANS TEZİ

YASEMİN KELEŞ

BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

(TEZ DANIŞMANI: PROF. DR. FERAY KÖÇKAR)

(EŞ DANIŞMAN: DR. ÖĞR. ÜYESİ MELTEM ALPER)

BALIKESİR, ARALIK - 2023

ADAMTS'ler ekstraselüler matrikse salgılanarak matriksin yapısal proteinlerini parçalamaktadır ve özel trombospondin 1 motiflerini içermektedir. Metaloproteinaz olarak, ADAMTS-8, tümör büyümesi, büyüme faktörlerinin düzenlenmesi gibi invazyon ve metastaz süreçlerinde önemli rol oynamaktadır. Kolorektal kanser hücrelerinde ADAMTS-8 düşük ekspresyonunun, hücre proliferasyonunu engellediği, apoptozu tetiklediği ve HCT116, HT-29 modellerinde invazyon ve migrasyonu baskıladığı gözlemlenmiştir.

SP1, memeli ve viral genleri düzenleyen, DNA bağlama bölgesini tanıyan proteindir. Aktif bölgesinde transkripsiyonu artırmaktan sorumlu üç çinko parmağı içeren SP1, GC-zengin DNA dizilerine bağlanmaktadır. SP1, KRK gelişimi ve ilerlemesinde önemli rol oynamaktadır.

Çalışmada, kolorektal kanserde supresör gen olan ADAMTS-8'in, kolorektal kanserde düzenleyici SP1 ile regülasyonu incelenmiştir. Bu amaçla ADAMTS-8 geninin promotor bölgesinin transkripsiyonel aktivitesini belirlemek için beş farklı uzunluktaki promotor parçaları lusiferaz vektörüne klonlandı. SW480 hücrelerinde geçici transfeksiyon çalışmalarıyla bazal aktiviteler kıyaslandığında en yüksek aktiviteyi TS-8[-854/+323] promotor parçası gösterdi. Yapılan biyoinformatik analizlerle ADAMTS-8 geninin oldukça fazla SP1 bağlanma bölgesi içerdiği belirlendi. Ko-transfeksiyon çalışmalarıyla SP1'in ADAMTS-8 promotor aktivitesini özellikle TS-8[-854/+323] promotor parçasında azalttığı belirlendi. SP1'in promotora fonksiyonel olarak bağlanıp bağlanmadığını belirlemek amacıyla ChIP analizi gerçekleştirildi. ADAMTS-8(-353/-234), ADAMTS-8(-87/+38) ve ADAMTS-8(+188/+312) bölgelerine bağlanmanın gerçekleştiği doğrulandı. Sonrasında SW480 modelinde CEBP, USF ve SP1 over ekspresyonunun ADAMTS-8 protein seviyesine etkisi western blot ile belirlendi. SP1'in ADAMTS-8 protein ifadesini neredeyse yarıya düşürdüğü tespit edildi. SW480 ve yan model olarak seçilen SAOS-2 hücre hattında SP1 over ekspresyonunun ADAMTS-8 mRNA seviyesine etkisi qRT-PCR ile belirlendi. Hem SW480 hem SAOS-2 modelinde SP1 over ekspresyonunun ADAMTS-8 mRNA seviyesini azalttığı belirlendi.

ANAHTAR KELİMELE: Transkripsiyonel regülasyon, ADAMTS-8, SP1, kolorektal kanser

ABSTRACT

**SP1 MEDIATED TRANSCRIPTIONAL REGULATION OF THE ADAMTS-8
GENE**
MSC THESIS
YASEMIN KELEŞ
BALIKESIR UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE
DEPARTMENT OF MOLECULAR BIOLOGY AND GENETICS
(SUPERVISOR: SUPERVISOR: PROF. DR. FERAY KÖÇKAR)
(CO-SUPERVISOR: CO-SUPERVISOR: ASST. PROF. DR. MELTEM ALPER)
BALIKESİR, DECEMBER - 2023

ADAMTSs are secreted into the extracellular matrix and degrade structural proteins of the matrix and contain special thrombospondin 1 motifs. As a metalloproteinase, ADAMTS-8 plays an important role in invasion and metastasis processes such as tumour growth and regulation of growth factors. It has been observed that ADAMTS-8 low expression in colorectal cancer cells inhibits cell proliferation, induces apoptosis and suppresses invasion and migration in HCT116, HT-29 models.

SP1 is a DNA binding site- recognising protein that regulates mammalian and viral genes. Containing three zinc fingers responsible for increasing transcription in its active site, SP1 binds to GC-rich DNA sequences. SP1 plays an important role in CRC development and progression.

In this study, the regulation of ADAMTS-8, which is a suppressor gene in colorectal cancer, by the colorectal cancer regulator SP1 was investigated. For this purpose, promoter fragments of five different lengths were cloned into luciferase vector to determine the transcriptional activity of the promoter region of ADAMTS-8 gene. TS-8[-854/+323] promoter fragment showed the highest activity when basal activities were compared with transient transfection studies in SW480 cells. Bioinformatic analyses revealed that ADAMTS-8 gene contains many SP1 binding sites. Co-transfection studies revealed that SP1 decreased ADAMTS-8 promoter activity especially in TS-8[-854/+323] promoter fragment. ChIP analysis was performed to determine whether SP1 binds functionally to the promoter. Binding to ADAMTS-8(-353/-234), ADAMTS-8(-87/+38) and ADAMTS-8(+188/+312) regions was confirmed. Subsequently, the effect of CEBP, USF and SP1 overexpression on ADAMTS-8 protein level in SW480 model was determined by western blot. SP1 was found to reduce ADAMTS-8 protein expression by almost half. The effect of SP1 overexpression on ADAMTS-8 mRNA level in SW480 and SAOS-2 cell line selected as a side model was determined by qRT-PCR. It was determined that SP1 ovarian expression decreased ADAMTS-8 mRNA level in both SW480 and SAOS-2 model.

KEYWORDS: Transcriptional regulation, ADAMTS-8, SP1, colorectal cancer.

Science Codes: 20316, 20326, 20610

Page Number: 119

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
ŞEKİL LİSTESİ	vi
TABLO LİSTESİ.....	viii
ÖNSÖZ	xi
1. GİRİŞ.....	1
1.1 Gen Regülasyonu	1
1.1.1 Ökaryotlarda Transkripsiyonel Regülasyon.....	2
1.1.2 Çinko Parmak Protein Ailesi.....	4
1.2 SP1 Transkripsiyon Faktörü ve Ailesi	5
1.2.1 Hücre Büyümesi ve Tümör Oluşumunda SP1	6
1.3 ADAMTS Ailesi: Yapısı, İşlevi ve Regülasyonu	9
1.3.1 ADAMTS Ailesinin Domain Yapısı.....	9
1.3.2 ADAMTS'lerin İşlevi	11
1.3.2.1 ADAMTS'ler Hyalektanları Parçalar.....	11
1.3.2.2 ADAMTS-2,-3,-14 Prokolejenleri İşler.	15
1.3.2.3 ADAMTS-7 ve ADAMTS-12 COMP'u Parçalar.	16
1.3.2.4 ADAMTS-13 Von Willebrand faktörünü Parçalar.	17
1.3.2.5 ADAMTS-1 ve ADAMTS-8 Anti-anjiyojenik Aktivite Gösterir.	17
1.3.3 ADAMTS'lerin Regülasyonu	17
1.3.3.1 ADAMTS'lerin Transkripsiyonel Regülasyonu	17
1.3.3.2 ADAMTS Proteazların Alternatif Splays ve Posttranslasyonel Modifikasyonları	19
1.4 ADAMTS Ailesi ve Kolorektal Kanser	19
1.5 ADAMTS-8	20
1.5.1 ADAMTS-8'in Çeşitli Hastalıklarla İlişkisi	21
1.5.2 ADAMTS-8 ve Kanser	22
2. TEZ HEDEFİ VE ÇALIŞMA KAPSAMI	26
3. MATERYAL- METOT.....	29
3.1 Materyaller.....	29
3.1.1 Çalışma Kapsamında Kullanılan Cihazlar	29
3.1.2 Tez Çalışmasında Kullanılan Kimyasal ve Malzemeler	30
3.1.3 Tez çalışmasında Kullanılan Vektörler.....	32
3.1.4 Transformasyon Deneylerinde Kullanılan Bakteri Soyları.....	33
3.1.5 Tez Çalışmasında Kullanılan Hücre Soyları	33
3.2 Metot.....	34
3.2.1 Deney Malzemeleri ve Laboratuvar Temizliği	34
3.2.2 Bakteri Çalışmaları ile İlgili Metotlar	34
3.2.2.1 Sıvı ve Katı Besiyerinin Oluşturulması.....	34
3.2.2.2 <i>E. coli</i> , JM109 Hücrelerinin Kompeten (Alıcı) Hale Getirilmesi	35
3.2.2.3 Transformasyon.....	35
3.2.2.4 Gliserol Stok Hazırlanması	36

3.2.2.5	Kompetent Hücresinin Etkinliğinin Belirlenmesi.....	36
3.2.2.6	Küçük Ölçekli Plazmit İzolasyonu.....	36
3.2.2.7	Büyük Ölçekli Plazmit İzolasyonu.....	37
3.2.3	DNA Çalışmaları ile İlgili Metotlar	38
3.2.3.1	DNA Miktar Tayini	38
3.2.3.2	Primer Tasarımı.....	38
3.2.3.3	Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR).....	38
3.2.3.4	DNA Agaroz Jel Elektrophorezi	39
3.2.3.5	Agaroz Jelden DNA'nın Geri Kazanımı	40
3.2.3.6	Restriksiyon Endonükleaz Enzimleri ile Kesim Reaksiyonu.....	40
3.2.3.7	Ligasyon	41
3.2.4	Hücre Kültürü ile İlgili Teknikler	41
3.2.4.1	Besiyeri Serumunun Hazırlanması.....	41
3.2.4.2	Hücre Kültürü Besiyerinin Hazırlanması	41
3.2.4.3	Hücre Kültüründe Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması	42
3.2.4.4	Hücre Soyunun Başlatılması	42
3.2.4.5	Hücrelerin Pasajlanması	42
3.2.4.6	Hücrelerin Dondurulması	43
3.2.4.7	Hücre Canlılığının ve Sayısının Belirlenmesi	43
3.2.5	Transkripsiyonel Aktivitenin Belirlenmesi ile İlgili Metotlar	44
3.2.5.1	Salınan Sistem Lusiferaz Aktivitesinin Ölçülmesi.....	45
3.2.5.2	SEAP (Sekrete Edilen Alkalın Fosfataz) Etkinliğinin Belirlenmesi	45
3.2.6	RNA ile İlgili Metotlar.....	46
3.2.6.1	RNA İzolasyonu	46
3.2.6.2	RNA Miktar Tayini	46
3.2.6.3	Formaldehit Jel Elektrophorezi	47
3.2.6.4	RT-PCR Reaksiyonu	47
3.2.6.5	RT Reaksiyonu ile cDNA Sentezi.....	48
3.2.6.6	qRT-PCR	48
3.2.7	Protein ile İlgili Teknikler.....	50
3.2.7.1	Western Blot Yöntemi ile Protein Analizi	50
3.2.7.2	Hücresel Proteinlerin Ekstraksiyonu	52
3.2.7.3	Proteinlerin Kantitatif Belirlenmesi	52
3.2.7.4	SDS-PAGE.....	53
3.2.7.5	SDS Jeldeki Proteinlerin Membrana Blotlanması.....	55
3.2.7.6	Proteinlere Antikor Uygulanması (İmmünoiblotlama)	55
3.2.7.7	Görüntüleme ve Analizi	55
3.2.7.8	İstatistiksel Analiz	56
3.2.8	Kromatin İmmüno Presipitasyonu (ChIP)	56
3.2.8.1	Kromatin İmmüno presipitasyonunda Fiksasyon Aşaması	57
3.2.8.2	Kromatin İmmüno presipitasyonunda Çapraz Bağlı Protein/DNA'nın İmmüno presipitasyonu	58
3.2.8.3	Kromatin İmmüno presipitasyonunda Protein/DNA Komplekslerinin Elüsyonu..	59
3.2.8.4	Kromatin İmmüno presipitasyonunda Protein/DNA Komplekslerinin Serbest DNA'ya Çevrilmesi	60
3.2.8.5	Kromatin İmmüno presipitasyonunda DNA Saflaştırması	60
3.2.9	İmmüno floresan Deneyi (IFC).....	61
4.	BULGULAR	64
4.1	ADAMTS-8 Promotorunun Karakterizasyonu	64

4.2 ADAMTS-8 Geninin Promotor Parçalarının Klonlanması.....	67
4.2.1 ADAMTS-8 Geninin TS-8[-226/+323] Promotor Parçasının PCR Amplifikasyonu .	67
4.2.1.1 TS-8[-226/+323] Promotor Parçasının, pGEM-T Easy Vektör Sistemine Ligasyonu ve Rekombinant Kolonilerin Tespiti	68
4.2.2 TS-8[-226/+323] Promotor Parçasının pMetLuc Haberci Gen Vektörüne Alt Klonlanma Çalışması	69
4.2.2.1 pMetLuc Haberci Gen Vektörünün ve TS-8[-226/+323] Promotor Parçasının Hazır Hale Getirilmesi	69
4.2.2.2 TS-8[-226/+323] ADAMTS-8 Promotor Parçasının pMetLuc Vektörüne Ligasyonu ve Rekombinant Kolonilerin Tespiti	70
4.2.3 ADAMTS-8 Geninin TS-8[-223/+9] Promotor Parçasının Promotor Parçasının PCR Amplifikasyonu.....	71
4.2.3.1 TS-8[-223/+9] promotor parçasının, pGEM-T Easy Vektör Sistemine Ligasyonu ve Rekombinant Kolonilerin Tespiti.....	72
4.2.4 TS-8[-223/+9] Promotor Parçasının pMetLuc Haberci Gen Vektörüne Alt Klonlanma Çalışması	73
4.2.4.1 TS-8[-223/+9] ADAMTS-8 Promotor Konstraktının pMetLuc Vektörüne Ligasyonu ve Rekombinant Kolonilerin Tespiti	73
4.2.5 TS-8[-226/+323] ve TS-8[-223/+9] ADAMTS-8 promotor konstraktlarının dizi analizi sonuçları	75
4.3 ADAMTS-8 Promotorunun Fonksiyonel Analizi.....	77
4.3.1 SW480 Hücre Hattında Kalsiyum-Fosfat Presipitasyon Metodu ile Geçici Transfeksiyonun Salınan Lusiferaz Sisteminde Optimize Edilmesi.....	77
4.3.2 ADAMTS-8 Promotor Parçalarının Bazal Aktivitesinin Belirlenmesi.....	78
4.3.3 ADAMTS-8 Promotoru <i>In Siliko</i> Analizi ve Kotransfeksiyon Çalışmaları.....	79
4.3.4 ADAMTS-8 Promotoruna Bağlanan SP1 Transkripsiyon Faktörünün ChiP Analizi ile Belirlenmesi	80
4.4 C/EBP, USF ve SP1 Transkripsiyon Faktörünün ADAMTS-8 Geninin Regülasyonuna Etkisi	81
4.4.1 SP1, USF, C/EBP Transkripsiyon Faktörlerinin ADAMTS-8 Protein İfadesine Etkisinin Western Blot ile Belirlenmesi.....	81
4.4.2 SP1 Transkripsiyon Faktörünün ADAMTS-8 Protein İfadesine Etkisinin İmmünofloresan Yöntemi ile Gösterimi	83
4.4.3 SP1 Transkripsiyon Faktörünün ADAMTS-8 mRNA İfadesine Etkisinin qRT-PCR Yöntemi ile Belirlenmesi	85
5. SONUÇLAR VE ÇIKARIMLAR.....	88
6. KAYNAKLAR.....	93
EKLER.....	110
EK A: Tez Çalışmasında Kullanılan Büyüklük Belirteçleri.....	110
EK B: "ADAMTS-8 Promotör Bölgesine Potansiyel Bağlanan Transkripsiyon Faktörleri ve Lokasyonları"	111
ÖZGEÇMİŞ	119

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1.1: Ökaryotik gen ifadesinin kontrol edilebildiği altı adım.	2
Şekil 1.2: Ökaryotik bir gen için gen kontrol bölgesi [7].	3
Şekil 1.3: Cys2His2 tipi çinko parmak yapısı [15].	5
Şekil 1.4: SP benzeri transkripsiyon faktörlerinin birincil yapısı [25].	6
Şekil 1.5: ADAMTS aile üyelerinin temel alan organizasyonu ve ana işlevsel grupları [67].	11
Şekil 1.6: Bir artritli dizin ve agrekanın şemalı temsili [72].	12
Şekil 1.7: Versican'ın farklı izoformlarını temsil eden şematik gösterimi [72].	14
Şekil 1.8: Brevican yapılarının temsili [72].	15
Şekil 1.9: Prokollejenin ADAMTS'ler tarafından işlenmesi [91].	16
Şekil 1.10: ADAMT-8'in krozomal lokasyonu.	21
Şekil 2.1: Tez çalışması kapsamında gerçekleştirilecek iş planları.	28
Şekil 3.1: pGEM-T Easy ve pMetLuc-Reporter vektör haritaları.	32
Şekil 3.2: pMETLuc-kontrol ve pSEAP2-kontrol vektör haritaları.	33
Şekil 3.3: SAOS-2 ve SW480 hücre görüntüleri.	34
Şekil 3.4: Kompeten hücre etkinlik formülü.	36
Şekil 3.5: DNA miktar ve saflık hesabı.	38
Şekil 3.6: Thoma lamı yardımıyla gerçekleştirilen hücre sayısı formülleri.	44
Şekil 3.7: RNA miktar ve saflık hesabı.	46
Şekil 3.8: Bradford eğrisi ve formülü.	53
Şekil 4.1: ADAMTS-8 Promotoruna ait biyoinformatik analiz.	64
Şekil 4.2: ADAMTS-8 promotoru CpG adası ve % GC analizi.	65
Şekil 4.3: ADAMTS-8 promotorundaki maksimum ve minimum ΔG değerli sekonder yapılar.	66
Şekil 4.4: ADAMTS-8 TS-8[-226/+323] promotor parçasının PCR amplifikasyonu agaroz jel elektroforezi görüntüsü.	67
Şekil 4.5: ADAMTS-8 TS-8[-226/+323] promotor parçasını içeren pGEM-T Easy vektörünün XhoI ve HindIII enzimleriyle kesilerek rekombinant koloni tespiti.	68
Şekil 4.6: pMetLuc haberci gen vektörünün XhoI ve HindIII restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesiminin agaroz jel görüntüsü.	69
Şekil 4.7: Rekombinant pGEM-T Easy vektörünün XhoI ve HindIII restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesimi.	70
Şekil 4.8: Rekombinant olması muhtemel plazmidlerin XhoI ve HindIII restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesimi.	71
Şekil 4.9: TS-8[-223/+9] promotor parçasının PCR amplifikasyonunun jel elektroforezi ile tespiti.	72
Şekil 4.10: TS-8[-223/+9] promotor parçasının agaroz jelden geri kazanım kontrolü.	72
Şekil 4.11: TS-8[-223/+9] promotor parçasını içeren pGEM-T Easy vektörünün XhoI ve HindIII enzimleriyle kesimi sonucu rekombinant kolonilerin tespiti.	73
Şekil 4.12: Rekombinant olması muhtemel plazmidlerin XhoI ve HindIII restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesimi.	74
Şekil 4.13: ADAMTS-8 promotor konstraktlarının XhoI/HindIII restriksiyon enzimleri ile kesimi.	74
Şekil 4.14: Klonlanan TS-8[-226/+323] ADAMTS-8 promotor bölgesine ait dizileme sonuçlarının gen bankasındaki dizi ile karşılaştırılması.	75

Şekil 4.15: Klonlanan TS-8[-226/+323] ADAMTS-8 promotor bölgesine ait dizileme sonuçlarının gen bankasındaki dizi ile karşılaştırılması.	76
Şekil 4.16: Kalsiyum-fosfat presipitasyon metodu ile geçici transfeksiyonun 48 ve 72. saatlerindeki etkinliği.....	78
Şekil 4.17: ADAMTS-8 promotor parçalarının bazal aktivitelerinin karşılaştırılması.	78
Şekil 4.18: SP1 transfeksiyon faktörünün ADAMTS-8 promotorundaki muhtemel bağlanma bölgeleri.	79
Şekil 4.19: ADAMTS-8 promotor parçalarının SP1 ile kotransfeksiyonu sonucu karşılaştırmalı lusiferaz aktiviteleri.	80
Şekil 4.20: ADAMTS-8 promotoruna bağlanan SP1 transkripsiyon faktörünün ChiP analizi.	81
Şekil 4.21: SW480 hücre hattında SP1 transfeksiyon faktörünün over ekspresyonunun protein düzeyinde ifadesi.	82
Şekil 4.22: SW480 hücrelerinde C/EBP- β , USF ve SP1 transkripsiyon faktörlerinin geçici transfeksiyonunun ADAMTS-8 protein ifadesine etkisi.	82
Şekil 4.23: SW480 hücre hattında SP1 over ekspresyonunun immünofloresan yöntemi ile gösterimi.	83
Şekil 4.24: SW480 hücre hattında SP1 over ekspresyonu ile ADAMTS-8 ifadesindeki değişikliğin immünofloresan ile gösterimi.	84
Şekil 4.25: SW480 hücrelerinden elde edilen kontrol ve SP1 over ekspresyon grubuna ait RNA'ların formaldehit agaroz jel görüntüsü.	85
Şekil 4.26: SW480 hücre hattında SP1 over ekspresyon seviyesinin saate bağlı değişimi.	86
Şekil 4.27: SW480 hücre hattında SP1 over ekspresyonunun ADAMTS-8 mRNA ifadesine etkisinin saate bağlı değişimi.	86
Şekil 4.28: Saos-2 hücre hattında SP1 over ekspresyon seviyesinin saate bağlı değişimi..	87
Şekil 4.29: Saos-2 hücre hattında SP1 over ekspresyonunun ADAMTS-8 mRNA ifadesine etkisinin saate bağlı değişimi.	87

TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 3.1: Tez çalışında kullanılan cihazlar.	29
Tablo 3.2: Tez çalışmasında kullanılan kimyasal ve malzemeler.	30
Tablo 3.3: Transformasyon işleminde kullanılan bakteri soyları.	33
Tablo 3.4: ADAMTS-8 promotor amplifikasyonunda kullanılan primer dizileri ve özellikleri.	39
Tablo 3.5: PCR reaksiyonu çalışma koşulları.	39
Tablo 3.6: DNA agaroz jel elektroforezi için gerekli çözeltiler.	40
Tablo 3.7: Ligasyon bileşenleri.	41
Tablo 3.8: Hücre kültüründe kullanılan çözeltiler ve hazırlama prosedürleri.	42
Tablo 3.9: Kalsiyum fosfat presipitasyonunda kullanılan çözeltiler.	44
Tablo 3.10: Kalsiyum fosfat presipitasyonunda kullanılan çözeltiler bileşenleri.	45
Tablo 3.11: Formaldehit jel elektroforezinde kullanılan çözeltiler.	47
Tablo 3.12: RT reaksiyon bileşenleri ve koşulları.	48
Tablo 3.13: qRT-PCR bileşenleri.	49
Tablo 3.14: qRT-PCR reaksiyon koşulları.	49
Tablo 3.15: Ekspresyon çalışmalarında kullanılan primerler.	50
Tablo 3.16: Western blot analizinde kullanılan çözeltiler ve hazırlama prosedürü.	51
Tablo 3.17: SDS-PAGE jellerinin bileşenleri ve hazırlanma oranları.	54
Tablo 3.18: ChIP'te amacına uygun kullanılan antikorlar ve miktarları.	59
Tablo 3.19: ChIP'te kullanılan yıkama tamponları ve kaç kez kullanıldıkları.	59
Tablo 3.20: ChIP Real Time PCR'ında kullanılan primerler ve dizileri.	61
Tablo 3.21: Floresan çalışmalarında kullanılan çözeltiler.	62

KISALTMA VE SEMBOL LİSTESİ

A	: Adenin
A	: Absorbans
α	: Alfa
Ab	: Antikor
Ag	: Antijen
APS	: Amonyum persülfat
ATP	: Adenozin trifosfat
ATPaz	: Adenozin trifosfataz
bç	: Baz çifti
β	: Beta
bk.	: Bakınız
BSA	: Bovine Serum Albumin
C	: Sitozin
°C	: Santigrat derece
cDNA	: Komplemanter DNA (Complementary DNA)
cfu	: Colony forming unit
Ct	: Cycle threshold
CTCF	: Düzeltilmiş Toplam Hücre Floresansı (Corrected Total Cell Fluorescence)
DAPI	: 4',6-diamidino-2-fenilindol
DEPC	: Dietil pirokarbonat
dH₂O	: Distile su
dk.	: Dakika
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagles Medium
DMSO	: Dimetil sülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik asit
dNTP	: Deoksiribonükleosit trifosfat
<i>E. coli</i>	: <i>Escherichia coli</i>
ECL	: Enhanced chemiluminescence
EDTA	: Etilendiaminetetraasetik asit
EGTA	: Etilenglikoltetraasetik asit
EMT	: Epitelyal-Mezenkimal Dönüşüm (Epithelial-Mesenchymal Transition)
ϵ	: Epsilon
Et-Br	: Etidyum bromür
EU (U)	: Enzim ünitesi
FA	: Formaldehit
FCS	: Fetal Calf Serum
G	: Guanin
g	: Gram
GFP	: Yeşil Floresan Protein (Green Fluorescent Protein)
HeBS	: HEPES'li tuz çözeltisi (HEPES-Buffered Saline)
HEPES	: N-2-Hidroksietilpiperazin-N-2-etansülfonik asit
HUVEC	: Human Umbilical Vein Endothelial Cell
Hβ-2-M	: İnsan beta-2-mikroglobulin
IFC	: İmmünofloresan
kb	: Kilobaz
kDa	: Kilodalton
L	: Litre

LB	: Luria Broth
M	: Molar
µg	: Mikrogram
µL	: Mikrolitre
µM	: Mikromolar
mg	: Miligram
mL	: Mililitre
mM	: Milimolar
mRNA	: Mesajcı RNA (messenger RNA)
MTT	: 3-(4,5-Dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromid
MW	: Moleküler ağırlık
NaAc	: Sodyum Asetat
ng	: Nanogram
nm	: Nanometre
nM	: Nanomolar
nt	: Nükleotit
OD	: Optik Densite
PAGE	: Poliakrilamid jel elektroforezi
PANC-1	: Human Pancreatic Carcinoma (Pancreatic ductal epithelioid carcinoma)
PBS	: Fosfatlanmış tuz çözeltisi (Phosphate Buffered Salin)
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu (Polymerase chain reaction)
PFA	: Paraformaldehit
pH	: $\log (1/[H^+])$
pmol	: Pikomol
PSMD4	: Proteasome 26S subunit ubiquitin receptor, non-ATPase 4
PVDF	: Polivinilidin diflorid
RNA	: Ribonükleik asit
RNaz	: Ribonükleaz
rpm	: Dakikadaki dönüş sayısı (Rounds per minute)
RT	: Reverse transkriptaz (transkripsiyon)
S	: Svedberg birimi
sa.	: Saat
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat
SEAP	: Salınan alkalın fosfataz (Secreted alkaline phosphatase)
shRNA	: Small hairpin RNA
sn.	: Saniye
T	: Timin
TE	: Tripsin-EDTA
TEMED	: Tetrametiletildiamin
T_m	: Erime sıcaklığı (Melting temperature)
U	: Urasil
Ub	: Ubikitin
UPS	: Ubikitin proteazom sistemi
UV	: Ultraviyole
V	: Volt
VEGF	: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
% (v/v)	: Hacimce yüzde
% (w/v)	: Hacimde kütlece yüzde

ÖNSÖZ

Hayran olduğum bilimsel vizyonu ve derin bilgi birikimiyle beni etkileyen, her zaman vicdanımın sesiyle doğru yolu bulmam için beni teşvik eden hem akademik hem de özel hayatımda desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, ne zaman olumsuz bir hisse kapılsam anne şefkatiyle her şeyin bir şekilde yoluna gireceğini hissettiren canım hocam Prof. Dr. Feray KÖÇKAR'a, hayatın karmaşıklığında beni sabırla yönlendirerek olgunlaşmama katkıda bulunduğu için tüm içtenliğimle teşekkür ederim.

Bilgiyi paylaşmaya mesafenin engel olmadığını en iyi şekilde öğreten, bilgi birikimi ve bilimsel bakış açısının yanı sıra çalışkanlığı ve pes etmeyişi ile kendine hayran bıraktıran, ne zaman yardıma ihtiyacım olsa çoktan bir çözüm bulmuş olan değerli eş danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Meltem ALPER'e akademik desteğinin ötesinde her zaman bir abla gibi ilgilenip hiçbir zaman yalnız hissettirmedeği için teşekkürü borç bilirim.

Hem lisans hem de yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi ve tecrübelerini esirgemeyen hocalarım Doç. Dr. Hatice YILDIRIM'a ve Doç. Dr. Sümeyye AYDOĞAN TÜRKOĞLU'na teşekkürlerimi sunarım. Akademik kariyerim boyunca beni hem eğitip hem eğlendiren, hayata karşı duruşuyla bana gelecekte bir yansımaymış gibi kendimi gösteren biricik hocam Doç. Dr. Esra TOKAY'a ve ne zaman bir molaya ihtiyacım olsa yanına koşup deşarj olduğum, hiçbir şeyimi paylaşmaktan çekinmediğim, abla kardeş paylaşımlarının hepsini hissettiğim canım hocam Dr. Öğr. Üyesi Nelin HACIOĞLU'na her zaman ailemin yanındaymışım gibi hissettirdikleri için teşekkür ederim. Ayrıca BİDEB 2210/A Yurt İçi Genel Yüksek Lisans Burs Programı tarafından maddi destekleri ile beni destekleyen TÜBİTAK'a teşekkür ederim.

Hızlı ve pratik çözümleriyle desteğini esirgemeyen sevgili hocam Serhad ONAT'a, laboratuvar ahlakı ve çalışma disiplini öğretene, en tecrübesiz hallerimi sabırla geliştirirken eğlendiren sevgili hocalarım Kamil TOK, Candan ALTUNTAŞ, Dr. Kübra PASPAL EROĞLU, Saliha Derya KESKİN'e, ne kadar uzak olurlarsa olsunlar bana her zaman müsait olduklarını bildiğim hem bilimsel hem hayata dair birçok şeyi paylaşmaktan zevk aldığım sevgili hocalarım Dr. Mesut ACAR ve Ehed Muhammed AYMAZ'a, arkadaşlıkları ve çalışma destekleri ile her zaman yanımda olan ekip arkadaşlarım Hasan ÇAPRAZ, Ufuk MÜLHİM, Şevin AVŞAR, Aylin TÜRKOĞLU, Ghufraan Haqı Ismael ALBAZI ve diğer tüm FK lab ailesine teşekkür ederim. Hem bilim yapıp hem birlikte büyüdüğüm, durup arkama bakmama gerek kalmadan zaten orda olduğunu bildiğim canım arkadaşım, sırdaşım, dostum Feyza Nur SAV'a çok teşekkür ederim. Tüm akademik kaygılarımı ve önceliklerimi anlayışla karşılayan, beni olduğum gibi kabul edip gelişmem için desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, her zaman beni motive edip cesaretlendiren Emre KALFA'ya tüm kalbimle teşekkür ederim.

Genetiğimde azmini ve dürüstlüğü taşıdığım canım annem Hatice KELEŞ'e, çalışkanlığını ve ahlakını aldığım canım babam Feraşet KELEŞ'e, sevgisini her zaman hissettiğim canım kardeşim Zeynep KELEŞ'e bu yolda emeklerini bir an olsun esirgemeyip her koşulda yanımda olduklarını hissettirdikleri için sonsuz sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

Bu tezi her telefonda beni soran, sınavımla, çıkmayan deney sonucumla, hayatımla dertlenen duasını üstümden eksik etmeyen sevgili anneannem Asya CABİR'e ithaf ediyorum...

Balıkesir, 2023

Yasemin KELEŞ

1. GİRİŞ

1.1 Gen Regölasyonu

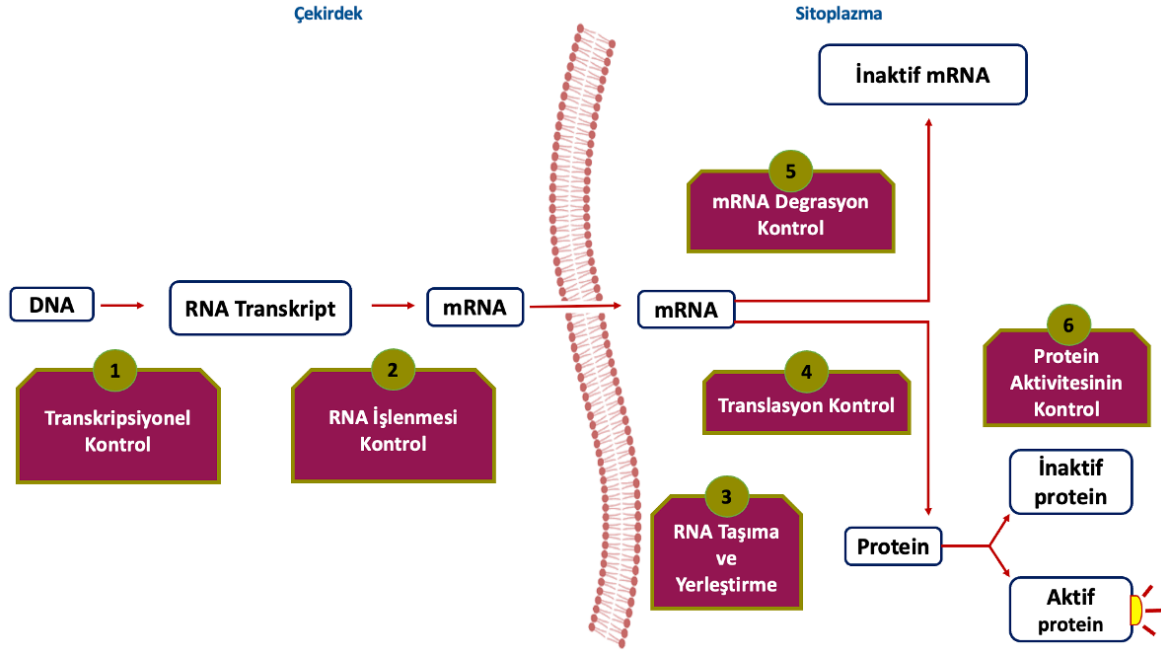
Gen regölasyonu canlı organizmaların temel biyolojik süreçlerini koordine etmek ve sürdürmek için kritik bir rol oynamaktadır. Gen ifadesinin sıkı bir şekilde kontrol edilmesi, organizmaların çevresel değişikliklere uyum sağlamasını, hücrelerin özelleşmesini ve farklılaşmasını, ayrıca gelişim süreçlerini düzenlemeyi amaçlamaktadır [1].

Prokaryotlarda gen regölasyonu, operon adı verilen yapılar aracılığıyla gerçekleşmektedir. Operonlar, birbiriyle ilişkili genlerin bir araya geldiği yapıları temsil etmektedir. Özellikle, lac operonu gibi operonlar, transkripsiyon faktörleri ve repressör proteinleri tarafından düzenlenmektedir. Repressör proteinleri, spesifik DNA dizilerine bağlanarak transkripsiyonu engellerken, transkripsiyon faktörleri RNA polimerazın promotor bölgesine bağlanmasını teşvik etmektedir. Böylece, prokaryotlar çevresel koşullara yanıt olarak gen ifadesini düzenlemektedir [1].

Ökaryot gen regölasyonu ise daha karmaşıktır ve birçok farklı mekanizma içermektedir. Ökaryotlarda gen regölasyonu, transkripsiyon faktörleri, epigenetik modifikasyonlar ve DNA sarmalının yapısı gibi faktörler aracılığıyla gerçekleşmektedir. Ökaryotlarda her genin kendine ait bir promotor bölgesi vardır ve gen ifadesinin düzenlenmesi için bu bölgelere transkripsiyon faktörleri bağlanmaktadır. Ek olarak, DNA metilasyonu ve histon modifikasyonları gibi epigenetik değişiklikler gen ifadesini etkileyebilmektedir [2]. DNA'dan protein sentezi süreci oldukça karmaşık bir süreçtir ve birçok ayrıntılı düzenleme basamaklarına ihtiyaç duymaktadır. Bu basamaklar şu şekilde özetlenebilir (b.k. Şekil 1.1).

1. **Transkripsiyonel Kontrol:** Belirli bir genden ne zaman ve ne sıklıkla transkript alındığını kontrol eder.
2. **RNA İşleme Kontrolü:** RNA transkriptlerinin splices ve işlenmesini kontrol eder.
3. **RNA Taşıma ve Konumlandırma Kontrolü:** Nükleustan sitoplazmaya hangi tamamlanmış mRNA'ların çıkarılacağını seçer ve bu mRNA'ların sitoplazmada nerede bulunacaklarını belirler.
4. **Translasyonel Kontrol:** Sitoplazmadaki ribozomlar tarafından hangi mRNA'ların çevrileceğini seçer.
5. **mRNA Bozunumu Kontrolü:** Sitoplazmadaki belirli mRNA moleküllerini seçerek özelleştirilmiş bir şekilde istikrarsızlaştırır.

6. **Protein Aktivite Kontrolü:** Belirli protein molekülünü üretildikten sonra seçici olarak etkinleştirebilir, bozabilir veya yeniden konumlandırabilir.

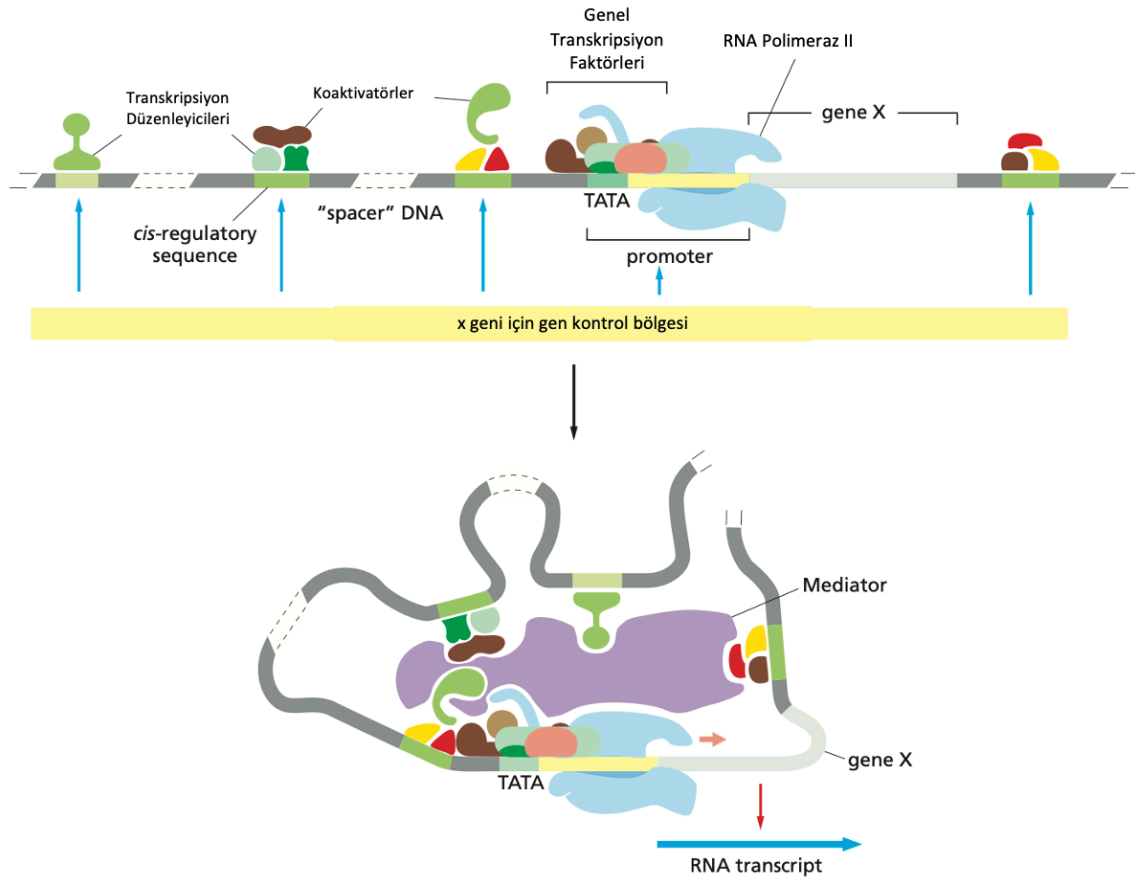


Şekil 1.1: Ökaryotik gen ifadesinin kontrol edilebildiği altı adım.

1.1.1 Ökaryotlarda Transkripsiyonel Regülasyon

Ökaryot organizmalarda gen ekspresyonunu düzenleyen mekanizmalar gende belirli bir bölgeye odaklanmaktadır. Düzenleyici bölgeler, transkripsiyonun başlamasını ve genin doğru bir şekilde ifade edilmesini sağlamak amacıyla genin yakınında, üzerinde, altında veya uzağında bulunabilmektedir. Bu bölgeler, promotor adı verilen belirli DNA dizilerini içermektedir. Ökaryotik genlerin düzenleyici bölgeleri arasında; genin başlangıç bölgesinin yakınında bulunan ve transkriptin başlamasını yönlendiren TATA kutusu, geniş bir promotor bölgesini kapsayarak gen ifadesini düzenleyen CAAT kutusu ve genin başlangıç bölgesine yakın bir bölgede yer alan GC kutusu gibi belirli bölgeler bulunmaktadır. Ayrıca, ökaryot genler bazen "enhancer" ve "silencer" dizilerini içermektedir. Enhancer dizileri, promotor aktivitesini artıran bölgelerdir ve genin daha etkili bir şekilde ifade edilmesini sağlamaktadır. Silencer dizileri ise transkripsiyonu baskılayan bölgelerdir [3].

Ökaryotik genomlar, binlerce protein kodlayan gene sahiptir ve her gen, kendi özgül transkripsiyon kontrol mekanizmasına sahiptir. Bu karmaşık sürecin düzenlenmesi, genellikle DNA'ya özgü bir dizi bağlayıcı faktör tarafından yürütülmektedir [4]. Transkripsiyon faktörleri gen transkripsiyon oranını arttırmak ve bazen de baskılamak için DNA üzerindeki belirli dizilere bağlanan proteinlerdir. Gen düzenlemesinde kontrol noktası olarak görev alan çekirdek promotor, transkripsiyon ön-başlatma kompleksinin oluşturulması için bir platform sağlamaktadır. Kompleks, TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIIIF, TFIIH ve RNA polimeraz II'yi içermektedir. Transkripsiyon faktörleri kolektif olarak transkript başlangıç noktasını belirlemek için çalışmaktadır [5]. Kompleks RNA polimeraz II'nin doğru şekilde başlangıç noktasına yerleştirilmesini sağlamaktadır [6]. Ancak bu transkripsiyon ön-başlatma kompleksi, sadece temel transkripsiyonu destekleyebilmektedir. Gen ifadesini arttıran aktivatörler gibi düzenleyici proteinler enhansırlara bağlandıktan sonra promotor ile etkileşmek için yaklaşık 20 farklı proteinden oluşan "mediatör" adı verilen, çok proteinli bir komplekse ihtiyaç duymaktadır (*b.k.* Şekil 1.2) [7].



Şekil 1.2: Ökaryotik bir gen için gen kontrol bölgesi [7].

Transkripsiyon faktörleri DNA bağlayıcı domaini (DBD), transkripsiyonel aktivasyon domaini (TAD) [8] ve yanıt elemanları [9] olmak üzere farklı domainlerden oluşurlar. DNA bağlayıcı domainler, DNA üzerindeki spesifik diziler için daha yüksek bir afiniteye sahip olan domainlerdir. Bu diziler türler arasında yüksek oranda korunur ve bilinen transkripsiyon faktörlerini SOX proteinleri ve POU faktörleri gibi ailelere ayırmak için kullanılmıştır [10].

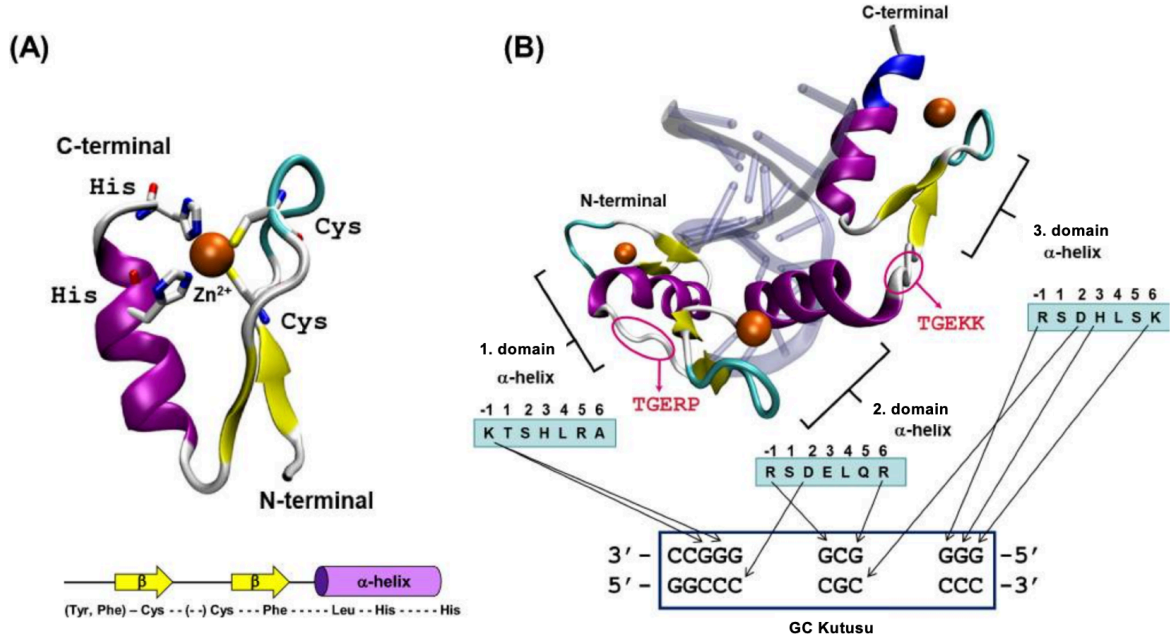
Çoğu zaman transkripsiyon faktörleri birbirleriyle ya da farklı aile üyeleriyle etkileşime girer ya da gruplar halinde birlikte hareket eder [10]. Gen aktivitesinin spesifik genlere göre düzenlenmesi sonucunda hücre bölünmesi, farklılaşması, embriyonik gelişim, hücre göçü ve apoptoz gibi süreçler kontrol edilmektedir. Transkripsiyon faktörleri aynı zamanda DNA bağlayıcı domainlerindeki 3 boyutlu protein yapılarına göre sarmal-dönüş-sarmal, sarmal-döngü-sarmal, bazik lösin fermuar, homeodomain proteinleri ve çinko parmak proteinleri şeklinde de gruplandırılmaktadır. Bu yapısal motifler, Transkripsiyon faktörlerinin bağlanma dizileri için özgüllüğe sahip olmalarına neden olmaktadır [11, 12].

1.1.2 Çinko Parmak Protein Ailesi

Çinko parmaklar, 1985 yılında *Xenopus* proteini transkripsiyon faktörü IIIA'nın (TFIIIA) 5S RNA ile etkileşimi üzerine yapılan bir biyokimyasal çalışma sonucunda keşfedilmiştir [13]. Çinko parmaklar, birçok transkripsiyon faktöründe bulunan DNA bağlama motifleridir. İnsan ve fare genomlarının analizi, çinko parmakların protein kodlayan genlerin %3-10'unda mevcut olduğunu ortaya çıkarmıştır. İnsan proteomunda bol miktarda bulunan çinko parmakların tümörlerin gelişimi, farklılaşması ve baskılanması gibi çeşitli biyolojik sürece dahil olduğu bilinmektedir [14].

Çinko parmak domainleri genellikle 20-30 amino asit rezidüsünden oluşur ve amino asitlerin sayısına ve türüne göre sınıflandırılmaktadır [15]. Cys₂His₂ tipi, çinko parmakların yapısı ve işlevi bakımından en yoğun şekilde incelenen örneğidir. Cys₂His₂ tipi detaylı incelendiğinde iki sistein (Cys) rezidüsü ve iki histidin rezidüsü (His), çinko (Zn(II)) ile tetrahedral bir koordinasyon bağı oluşturmaktadır. Bu bağ amino grubunun ucunda ters yönde paralel bir β -yapısının oluşmasına neden olurken, karboksil grubunun ucunda bir α -sarmal yapısını oluşturmaktadır. Bu α -sarmal daha sonra sıkışık küresel bir yapı oluşturmak için katlanmaktadır (*b.k.* Şekil 1A). Ayrıca, birçok çinko parmak proteininde, çeşitli domainler ardışık yapılar oluşturmak üzere birleştirilmiştir. DNA tanıma açısından (1) birinci domain:

üç ila dört bazı tanımaktadır, (2) ikinci domain: ardışık DNA dizilerine seçici bağlanmayı sağlayan tandem yapı oluşturmaktadır ve (3) üçüncü domain ise DNA'ya monomerik üniteler halinde bağlanabilmekte ve asimetrik dizileri tanıyabilmektedir (*b.k.* Şekil 1B) [16].

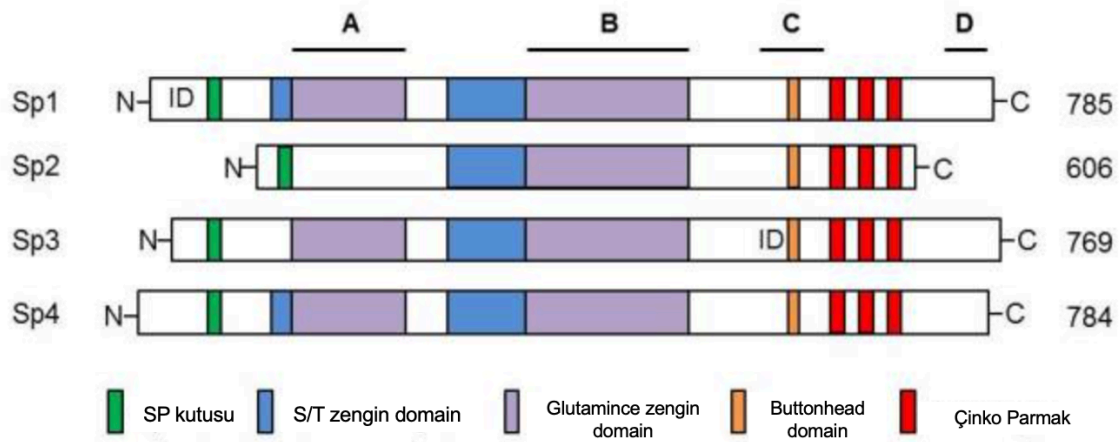


Şekil 1.3: Cys2His2 tipi çinko parmak yapısı [15].

1.2 SP1 Transkripsiyon Faktörü ve Ailesi

SP1, 1980'lerin başında HeLa hücrelerinde ifade edilen ve SV40 promotorundan in vitro transkripsiyonu seçici olarak aktive eden bir faktör olarak tanımlanmıştır [17]. Adı, Sephacryl ve fosfokselüloz saflaştırma sütunlarına atıfla SP1 olarak belirlenmiştir [18]. GC (GGGGCGGGG) kutuları, birçok temel, doku özgü, virüs ve indüklenabilir genin transkripsiyonel düzenlemesi için gereken cis-etkili DNA düzenleme elementlerindendir [19]. DNA bağlanma domaini, GC açısından zengin motifleri (GC/GT kutuları) tanıyan üç çinko parmaktan oluşan SP1, transkripsiyonun başlamasını yönlendiren TATA kutusu bulunmayan promotorlarda GC kutularına bağlanarak RNA polimeraz II'nin doğru konumda yerleşmesine ve transkripsiyonun başlatılmasına yardımcı olmaktadır. İnsan genomunda yaklaşık 12.000 SP1 bağlanma bölgesi olduğu bilinmektedir [20].

SP1, SP1 bağlanma bölgelerine bağlanan tek protein değildir, aynı zamanda ailenin diğer üyeleri olan SP2, SP3 ve SP4 de aynı bağlanma alanlarını kullanmaktadır. Ailenin 9 üyesi bulunmaktadır fakat dört SP aile üyesi (SP1-4) benzer domain yapısına sahiptir (*b.k.* Şekil 1.4) [21]. Ancak, farklı bir konsensüs bağlanma bölgesine sahip olan SP2, nükleer matris ile ilişkili alt çekirdek alanlarına lokalize olur ve promotor ifadesini aktive edebilir ya da baskılayabilir [22]. Hem SP1 hem de SP3, yaygın olarak bulunan proteinlerdir [23], SP4 ise daha çok dokuya özgü ifade olmaktadır [21] ve nöronal hücrelerde oldukça bol miktarda bulunmaktadır [24].



Şekil 1.4: SP benzeri transkripsiyon faktörlerinin birincil yapısı [25].

SP1'nin hedef gen ürünleri arasında: hücre döngüsünün ilerlemesi ve durdurulması gibi süreçlerde rol oynayan faktörler [25], metastaz gibi süreçlerde etkili olan hem pro- hem de anti-anjiyojenik faktörler [26] genomik stabilite ile ilişkili olan pro- ve anti-apoptotik faktörler [27] ve proto-onkogenler ve tümör baskılayıcılar gibi faktörler yer almaktadır [28]. Bu faktörler, SP1'in gen düzenlemesindeki rolünü ve kanser gelişimi gibi önemli biyolojik süreçleri etkileyebilme yeteneğini vurgulamaktadır.

1.2.1 Hücre Büyümesi ve Tümör Oluşumunda SP1

SP1, özellikle D-tipi siklinler, siklin E ve Cdk2 gibi siklin kinazları kodlayan genlerin transkriptini aktive etmektedir. Bu genler, hücre döngüsünün G1 fazından S fazına geçişinde etkin bir rol oynamaktadır. SP1 aynı zamanda E2F-1 ve c-Myc gibi genleri kodlayan

genlerin de transkriptini de düzenlemektedir. Bu iki faktör, bölünmeyen hücreleri S fazına girmeye teşvik etmede kritik bir rol oynamaktadır [29, 30]. Sonuç olarak, SP1 aşırı ifade edildiğinde, hücrelerin S faza giriş yüzdesi artmaktadır [31]. SP1 özellikle G1 fazının orta ve geç dönemlerinde fosforile olmaktadır [32]. Bir peptidil-prolin izomeras olan Pin1, birçok kanser türünde yüksek düzeyde ifade edilen bir protein olup, CDK1 aracılığıyla SP1'in fosforilasyonunu düzenlemektedir. Bu durum, SP1'in kararlılığını artırırken mitoz sırasında DNA'ya bağlanma yeteneğini azaltmaktadır [33].

SP1, sadece birçok genin ifadesini düzenlemekle kalmaz, aynı zamanda SP1 geninin kendisini de düzenlemektedir [34]. Anormal SP1 protein seviyeleri birçok kanserde gözlemlenmiştir [35]. SP1, insan kanserlerinin birçoğunda aşırı miktarda bulunur ve bu durum genellikle SP1 seviyelerini tümör evresi ve kötü prognoz ile ilişkilendirmektedir [36]. Ayrıca, SP1'in normal hücresel seviyesindeki inhibisyonu genellikle tümör oluşumunu, büyümesini ve metastazını azaltmaktadır [37, 38]. SP1, çeşitli tümörlerde vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) ifadesinin düzenlenmesinde rol oynamaktadır [39, 40]. Genom genişliğinde yapılan çalışmalar, tümör hücre apoptozunun tetiklenmesi sırasında p53 tarafından yönetilen gen ifadesine özgünlük kazandıran faktörlerden birinin SP1 olduğunu ortaya koymuştur [41]. SP1 transkripsiyon faktörünün çeşitli kanser türlerinde önemli roller oynadığı gösterilmiştir. Bunlardan birkaçını şu şekilde özetleyebiliriz:

Mide kanseri ile SP1 transkripsiyon faktörü arasındaki ilişki oldukça önemlidir. SP1'nin yüksek ifadesi, mide kanserinde hayatta kalım süresini düşürmektedir. Mide tümörlerindeki neoplastik hücrelerde güçlü bir SP1 ifadesi bulunurken, çevresindeki normal dokularda ve stromal hücrelerde bu ifade oldukça düşüktür [35].

Pankreas kanseri, kötü bir prognoza sahip agresif bir malignite türüdür [42, 43]. Araştırmalar, SP1 seviyelerinin pankreas kanseri hücre hatlarında ve cerrahi olarak çıkarılan insan pankreatik adenokarsinomunda yükseldiğini göstermektedir [44, 45].

Kolorektal kanser, Batı Avrupa ve Amerika Birleşik Devletleri gibi bölgelerde kansere bağlı ölümlerin ikinci en yaygın nedenidir [42, 43]. Kanser tedavisinde kullanılan arsenik trioksit, kolon kanseri hücre hatlarında SP1, SP3 ve SP4 proteinlerin ifadesini azaltarak, mitokondriyal membran potansiyelini düşürerek ve reaktif oksijen türlerini artırarak kanser hücrelerinin büyümesini ve çoğalmasını engellemeye çalışmaktadır [46].

Mesane kanseri, her yıl dünya genelinde yüz binlerce ölüme neden olan yaygın bir malignite türüdür [43, 47]. SP1 ile mesane kanseri hücrelerinin büyümesi arasındaki ilişki incelenmiş ve SP1 ifadesinin azalmasının kanser hücrelerinin büyümesini önlediği gösterilmiştir [46].

Akciğer kanseri, dünya genelinde en yaygın kanserlerden biridir [43]. SP1 transkriptinin artırılması, büyük hücreli olmayan akciğer kanserinde VEGF ifadesini arttırmaktadır [48, 49], aynı zamanda KRAS tarafından indüklenen akciğer tümörlerini taşıyan transgenik farelerin akciğerlerinde oldukça yüksek SP1 seviyeleri gözlemlenmiştir [50]. Ayrıca SP1, insan akciğer kanserinin invazyonu ve metastazında önemli bir rol oynayan negatif bir prognostik faktör olan CD147'nin ifadesini de yükseltmektedir [50].

SP ailesi transkripsiyon faktörleri, meme kanserinde bir prognostik araç olarak kabul edilir [51]. Bununla birlikte, SP1'in meme kanserindeki rolü hala tartışmalı bir konudur çünkü SP1, bazı hastalarda negatif bir prognostik faktör olarak aşırı ifade edilirken, SP1 baskılanması ileri derecede meme kanserinde gözlemlenmektedir [52].

İleri evre yumurtalık kanseri, çoğu hastada geç teşhis edilir ve kötü prognozla ilişkilidir [53]. Yumurtalık kanseri hücrelerinde aşırı ifade edilen bir gen olan CLDN4'ün (claudin-4) SP1 içeren kritik promotor bölgesinin epigenetik modifikasyonlarla kontrol edildiği gözlemlenmiştir [54].

İnsan hepatoma hücrelerinde (HEP3B) normoksik ve hipoksik koşullar altında ADAMTS1 geninin düzenlenmesi için önemli olan düzenleyici bölgeleri tanımlamayı amaçlayan çalışmada sonucunda, SP1 tarafından baskılandığı bulunmuştur. Bu baskılanma hipoksik durumda korunamadığı belirlenmiştir [55].

SP1 transkripsiyon faktörünün, MG63 ve Saos-2 hücre hatlarındaki promotor aktivitesini düzenleme yeteneği üzerine yapılmış bir çalışmada, SP1'in Saos-2 ve MG63 hücrelerindeki ADAMTS3 transkripsiyonel aktivitesini azalttığı bulunmuştur [56].

Özetle, SP1 ve SP ailesi transkripsiyon faktörleri çeşitli kanser türlerinde rol oynamakta ve kanser biyolojisi ve ilerlemesi için temel roller üstlenmektedir.

1.3 ADAMTS Ailesi: Yapısı, İşlevi ve Regülasyonu

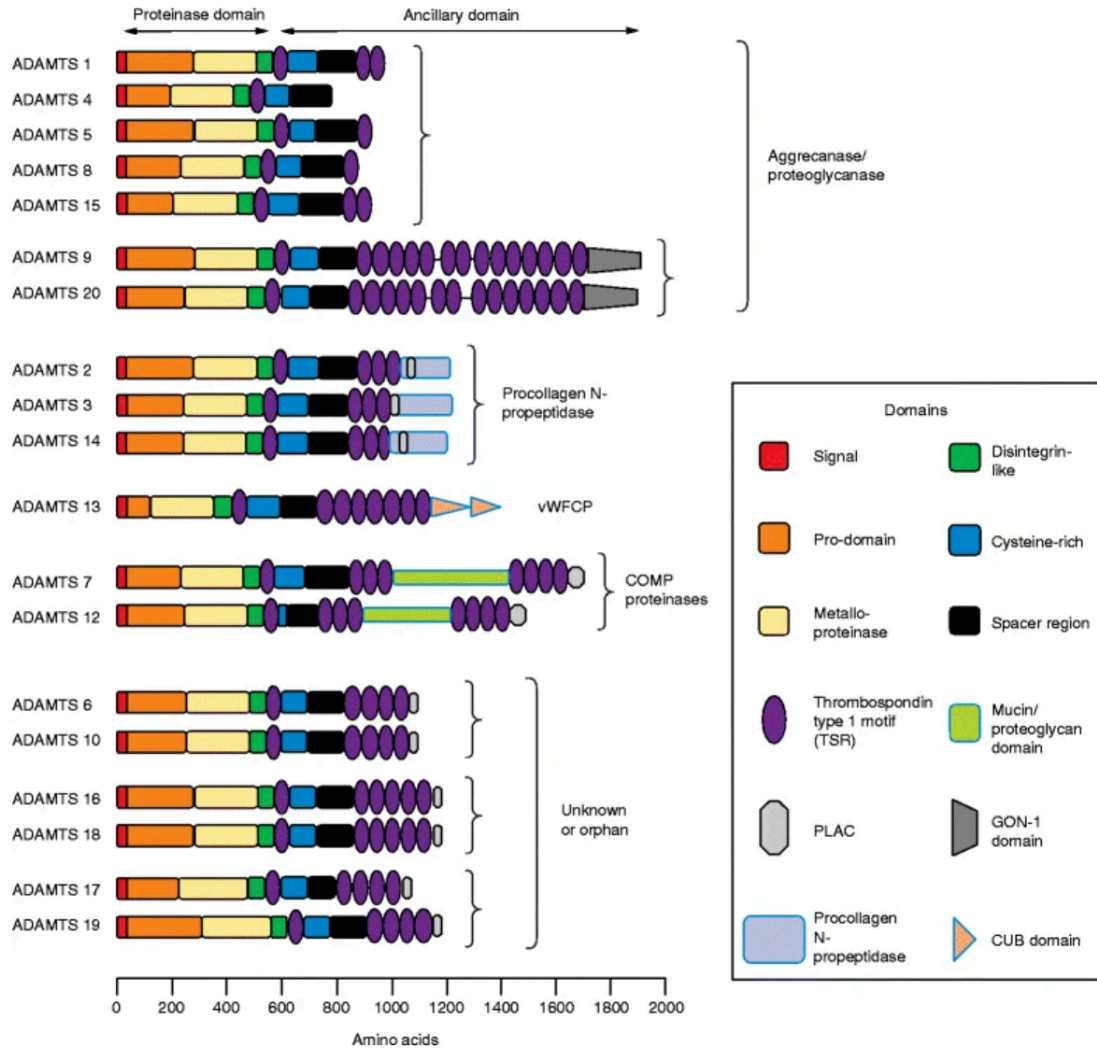
ADAM ailesinden yapılarındaki trombospodin 1 motifi ile ayrılan özel bir protein olan ADAMTS-1 Kuno ve ekibi tarafından 1997 yılında keşfedilmiştir. ADAMTS-1'in keşfi, 19 üyeden oluşan ADAMTS (A Disintegrin-benzeri ve Metalloproteaz Thrombospodin motifleri) ailesinin temelini atmıştır. Bu aile, biyolojik süreçlerde önemli işlevlere sahip olan çeşitli enzimleri içermektedir ve ekstraselüler matriksin düzenlenmesinden hücrel sinyal iletimine kadar pek çok biyolojik süreçte kritik rol oynamaktadır [57].

1.3.1 ADAMTS Ailesinin Domain Yapısı

ADAMTS üyeleri çeşitli domain bölgeleri içermektedir (*b.k. Şekil 1.5*):

- **Sinyal peptid dizisi;** yaklaşık 220-300 aminoasit arasında değişen uzunluklarda olabilir.
- **Prodomain yapısı,** substratın katalitik bölgeye erişimini engelleyerek inaktif formda kalmasını sağlamaktadır [58]. Prodomain uzunluğu genellikle 41 ile 295 amino asit arasında değişmektedir. Katalitik aktivite için prodomainin uzaklaştırılması gerekmektedir. Ancak aile üyelerinden ADAMTS-13 prodomaini ile birlikte von Willebrand faktörüne (vWF) karşı aktiftir [59]. Bu durumun prodomain yapısının kısa olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.
- **Metalloproteinaz katalitik domain,** hidrolizi gerçekleştiren enzimin aktif bölgesini içeren bölgedir. Tüm metalloproteazlar gibi, ADAMTS üyeleri de hidroliz işlemi için suya bağlı çinkoyu nükleofil olarak kullanmaktadır. Su ile bağlı çinko atomu, proteinle sıkı bir şekilde ilişkilidir ve korunmuş bir motif olan HEXXHXXGXXH ile bağlanmaktadır [60].
- **Disintegrin-benzeri bir domain,** 57 ila 96 amino asitten oluşur ve sistein içermemektedir. Bu motifin ADAMTS içindeki rolü şu anda bilinmemektedir, ancak muhtemelen matriks veya hücre bağlanmasında rol oynamaktadır [61].
- **Trombospodin tip I domain,** glikozaminoglikanlar (GAG) ve CD36 reseptörüne bağlanmada rol oynamaktadır aynı zamanda heparin bağlama bölgesi içermektedir [62].

- **Sistein bakımından zengin ve ara boşluk (spacer) domain**, substrat tanıma ve matriks yerleşmesinde rol oynar. Muhtemelen bu yardımcı motifler, birçok ADAMTS üyesinin hareketliliğini, yerleşmesini ve substrat özgünlüğünü belirlemektedir [63].
- **PLAC (Hücre-Hücre Temaslarına Yerleşen Protein) domain**, ADAMTS üyelerinin yarısında bulunur ve bu alan her zaman C-terminusta bulunmaktadır. Bu alan ilk olarak güvelerde lacunin adı verilen bir proteinde tanımlanmış ve 6 sistin içeren kısa bir amino asit dizisinden oluşmaktadır. Ayrıca bu alan, ADAMTS aktivasyonundan sorumlu bir grup serin proteaz olan proprotein konvertazlarda da bulunmaktadır [64].
- **GON-1 domain**, C. elegans adı verilen bir türün ADAMTS proteini olan bir genin adıdır. GON-1 proteini, bu organizmada embriyonik gelişimde önemli bir rol oynamaktadır. GON-1'in temel işlevi, organizma gelişimi sırasında doku yapıları oluşturmaktır [65].
- **CUB domain**, (Complement component C1r/C1s, uEGF ve bone morphogenic protein 1) diğer üyelerden farklı olarak ADAMTS-13'te bulunur ve iki C-terminal içermektedir. Bu alanlar, ADAMTS-13'ün büyük moleküler ağırlıklı vWF adı verilen substratına bağlanmasına izin veren bağlama alanı olarak görev yapmaktadır [66].



Şekil 1.5: ADAMTS aile üyelerinin temel alan organizasyonu ve ana işlevsel grupları [67].

1.3.2 ADAMTS'lerin İşlevi

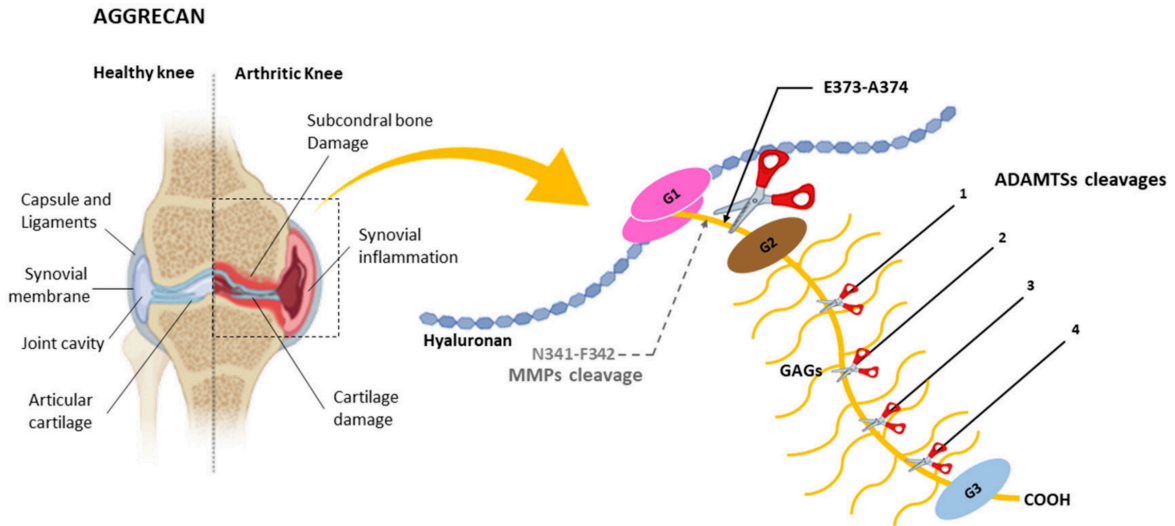
1.3.2.1 ADAMTS'ler Hyalektanları Parçalar.

Versikan, agrekan, nörokan ve brevikan, hyalektanlar veya lektikanlar olarak da bilinen bir grup proteoglikandır ve farklı dokuların ECM organizasyonuna katılmaktadır. Hyalektanların çekirdek proteinleri yaklaşık olarak 145 kDa ile 300 kDa arasındadır [68]. Bununla birlikte, hyalektanlar sık sık farklı proteolitik enzimler tarafından parçalanmaktadır [69]. Matris metalloproteinazlar (MMP'ler) ve proteoglikanazlar olarak kabul edilebilecek ADAMTS'ler, bu parçalanmalardan sorumludur, ancak önemli farklılıklar göstermektedirler [69].

Agrekan'ın ADAMTS'ler Tarafından Parçalanması

Agrekan, eklem kıkırdağının önemli bir bileşenidir ve kontrolsüz yıkımı dejeneratif eklem hastalıklarına neden olabilmektedir. ADAMTS'ler G1 ve G2 alanları arasındaki interglobular bölge (IGD) içindeki E373-A374 bağının keserek agrekanı parçalarlar (b.k. Şekil 1.6). Bu pozisyon, vücudun bazı bölgelerinde, diz gibi, juvenil eklem hastalıklarının gelişimi ile ilişkilidir ve burada iltihaba neden olmaktadır. 1992 yılında diz sakatlığına sahip hastalardan alınan örneklerde agrekan fragmanlarının tanımlandığını raporlanmıştır [70]. Özellikle ADAMTS-5'in spacer bölgesi içinde sadece agrekanı değil aynı zamanda versican'ı kesmekte temel olan iki bölge tanımlanmıştır. Bu sebeple ADAMTS ailesinin iki üyesi, ADAMTS-4 ve ADAMTS-5, osteoartrit hastalıklarla savaşmak için terapilere uygun hedefler olarak kabul edilmiştir.

ADAMTS'ler ve agrekan'ın ilişkisinin, sadece dejeneratif eklem hastalıkları gibi patolojilerde değil, aynı zamanda vasküler bozukluklar da dahil olmak üzere kardiyovasküler sistemin gelişiminde önemli roller oynadığı ve ateroskleroz, vasküler restenoz veya aort anevrizmaları gibi bozukluklarla ilişkilendirildiği tespit edilmiştir [71].

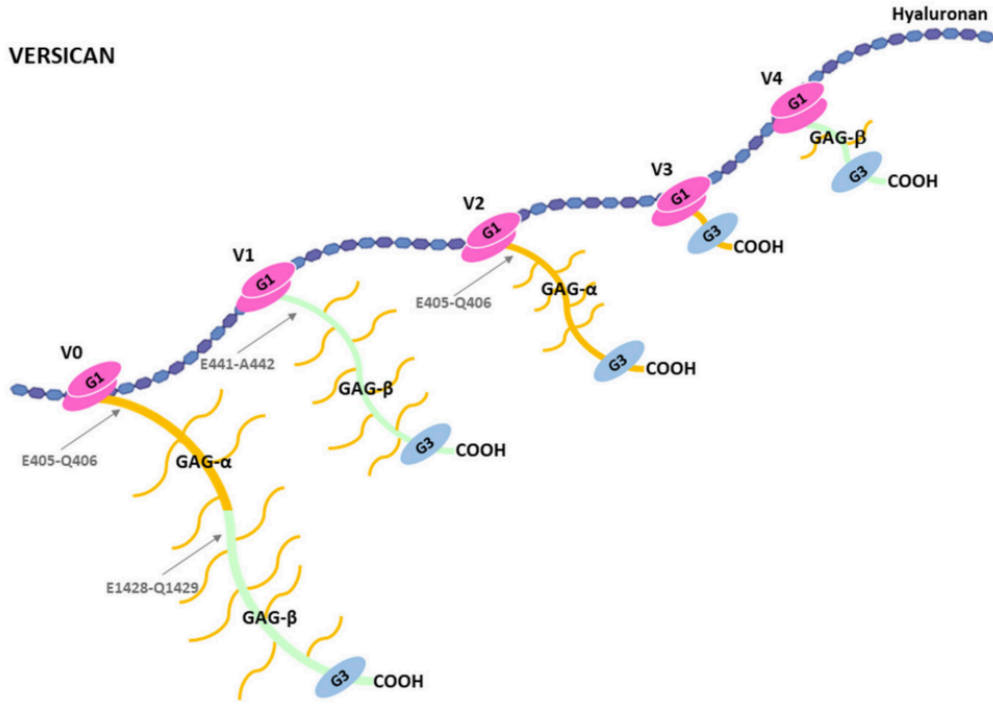


Şekil 1.6: Bir artritli dizin ve agrekanın şemalı temsili [72].

Versikan'ın ADAMTS'ler Tarafından Parçalanması

Versikan, ekstrasellüler matriksin (ECM) önemli bir bileşeni olan bir proteoglikandır ve doku morfogenezinin düzenlenmesinde kritik rol oynamaktadır. ECM'nin homeostazını sağlamak için versikan, ADAMTS proteazları tarafından çeşitli noktalarda parçalanabilir. Bu proteolitik olaylar, versikan'ın biyolojik işlevlerini düzenlemede önemli bir mekanizma olarak öne çıkmaktadır [73]. Versikanın ana izoformaları V0, V1, V2, V3 ve V4, farklı splay mekanizması yardımıyla oluşur ve bu izoformlar farklı dokularda ve gelişim evrelerinde değişiklik göstermektedir. Bu çeşitlilik, versikanın geniş bir biyolojik etki alanına sahip olmasını sağlamaktadır [74].

ADAMTS-1, -4, -5, -9, -15 ve -20, versikan'ı çözebilen enzimlerdir ve bu özelliği tanımlamak için "versikanaz" terimi kullanılmıştır [75]. Örneğin, ADAMTS-1'in versikan'ı parçalaması, embriyonik miyokard oluşumunda temel bir rol oynamaktadır ve aynı zamanda aterojenezis ve vasküler düz kas hücre göçünde artış gibi patolojik süreçlerle de ilişkilendirilmektedir. Benzer şekilde, ADAMTS-4 ve ADAMTS-5, aterosklerotik plakların stabilitesi ve aort anomalileri gibi kardiyovasküler işlevlerde önemli roller oynamaktadır. Bu bağlamda, versikan ve ADAMTS enzimleri, kardiyovasküler sistemin sağlığında ve hastalıklarında önemli bir etkiye sahiptir [76, 77]. Versikanın parçalanmasıyla ortaya çıkan fragmanlar, karaciğer fibrozisi gibi hastalıklarda da bulunmuştur. Örneğin, farelere karbon tetraklorür tedavisi uygulanarak yapılan bir çalışmada, versikan ve versikanaz seviyelerinde artış gözlemlenmiştir. Bu durum, versikanın karaciğer fibrogenesis'ini etkileyebileceğini düşündürmektedir. Ayrıca, versikanın ADAMTS-5 tarafından parçalanmasının serebral kavernöz malformasyonlar (CCM) patogenezinde rol oynadığı gösterilmiştir. Versikan fragmanlarının eksojen ifadesi, CCM lezyon büyümesini artırırken, versikanın azalması CCM oluşumlarını azaltmıştır [78].



Şekil 1.7: Versican'ın farklı izoformlarını temsil eden şematik gösterimi [72].

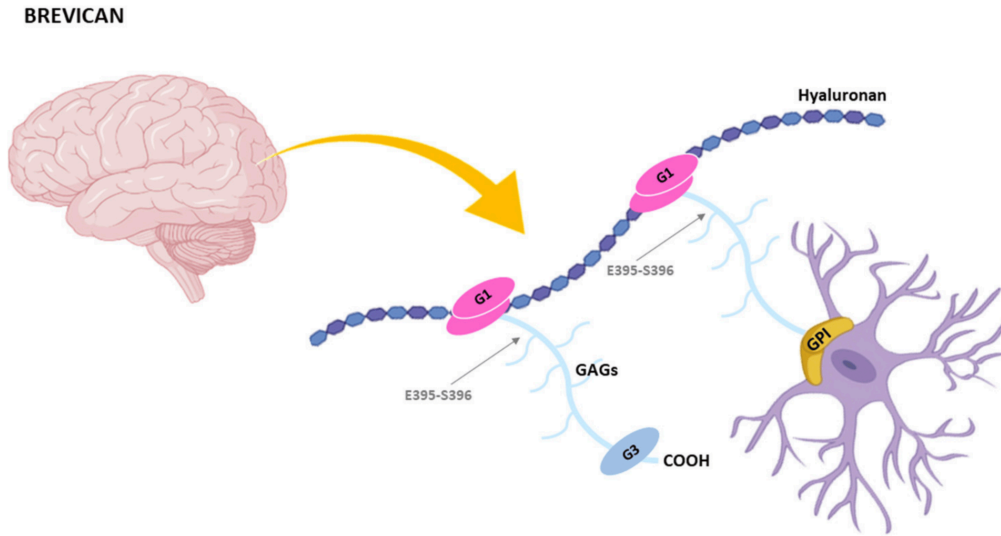
Brevican'ın ADAMTS'ler Tarafından Parçalanması

Brevican, merkezi sinir sisteminde bulunan ve glial hücreler ile nöronlar tarafından üretilen bir hyalactandır [79, 80]. Hyalactan ailesinin en kısa üyesi olan brevican, beyin plastisitesini etkileyen fizyolojik süreçlere katkı sağlar ve perinöronal ağlar ile aksonun başlangıç segmentinde yer alır [81]. Brevican, farklı metalloproteazlar tarafından proteolitik olarak parçalanmıştır [82-84]. Nakamura ve diğerleri (2000) yaptıkları çalışmada, MMP'lerin ve ADAMTS'lerin farklı üyelerinin, brevican'ı farklı bölgelerinden parçalayabildiğini göstermiştir [85].

ADAMTS enzimleri, glioma ilerlemesi ile ilişkilendirilen brevican'ı parçalayarak, özellikle glioblastoma gibi agresif glioma türlerinde ADAMTS-4 ve ADAMTS-5'in artmış ifadesine neden olmaktadır [86, 87]. Bu parçalanmanın bir sonucu olarak ortaya çıkan brevican fragmentleri, dış moleküler katmanın yeniden şekillenmesi gibi diğer fonksiyonlarda da rol oynamaktadır [88]. Bulgular, brevican'ın NH₂-terminal ve COOH-terminal kısımlarının, ADAMTS'ler tarafından aracılık edilen aktivitelerin bir sonucu olarak farklı şekilde düzenlendiğini öne sürmektedir. Bu sebeple, travmatik beyin yaralanması sonrasında potansiyel belirteçler olarak kullanılabilir. Alzheimer hastalığı ve diğer demanslarla ilgili

olarak, brevican'ın farklı düzeyleri ve ADAMTS-4 proteolizi sonrasında oluşan fragmentlerin, farklı demans türleri arasında ayırım yapmak için potansiyel belirteçler olabileceği öne sürülmüştür [89]. Ayrıca, ADAMTS-4'ün omurilik yaralanmasının fonksiyonel iyileşmesinde brevican'ı parçalayarak rol oynadığı gösterilmiştir [90].

Son araştırmalar, dopamin reseptörünün nöromodülasyonunun ADAMTS-4 ve ADAMTS-5 tarafından brevican'ın proteolizini tetiklediğini göstermiştir. [91]. Yalnızca ADAMTS-4 ve ADAMTS-5, brevican'ı parçalayabilir. Agrekanaz-1 veya agrekanaz-2 eksik farelerin, "brevicanaz" aktivitesine sahip olduğu gösterilmiştir. Ek olarak, ADAMTS-4 eksik farelerde omurilik yaralanması sırasında ADAMTS-1, ADAMTS-9 ve ADAMTS-15'in varlığı tespit edilmiştir. Bu nedenle, bu ADAMTS alt kümesinin aynı zamanda brevican'ın parçalanmasına katkıda bulunabileceği belirtilmiştir. Bu şekilde, en kısa hyalaktan hakkındaki çalışmalar, ADAMTS'ler tarafından gerçekleştirilen proteolizin beyin fonksiyonları üzerindeki etkisini vurgulamaktadır [92].

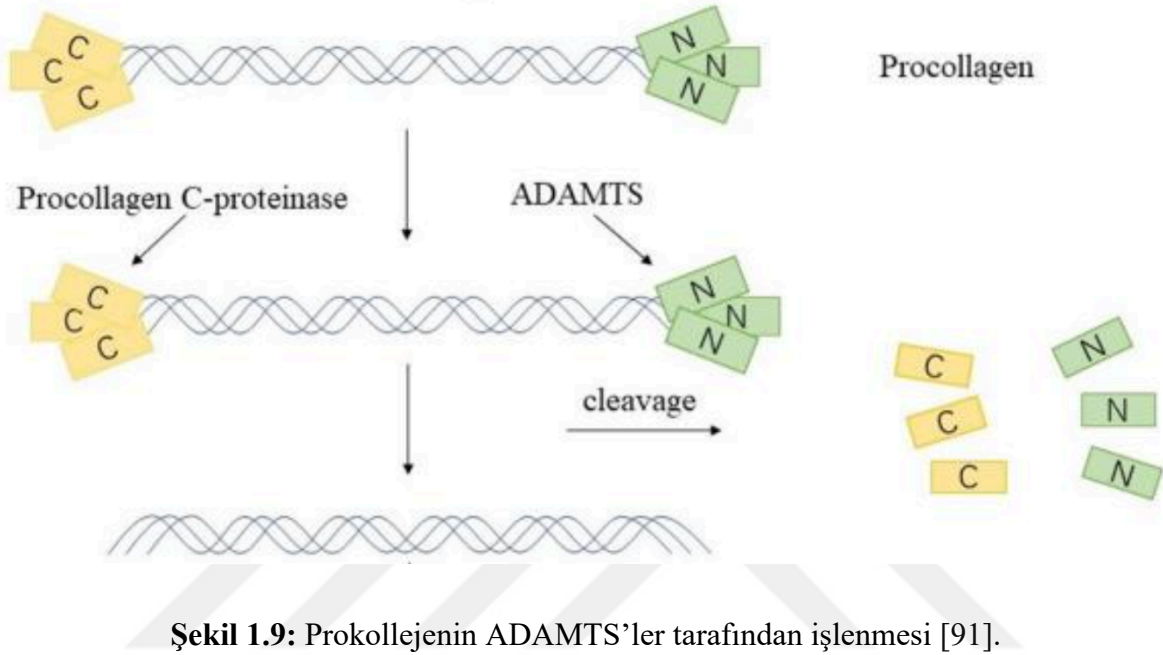


Şekil 1.8: Brevican yapılarının temsili [72].

1.3.2.2 ADAMTS-2,-3,-14 Prokolajenleri İşler.

ADAMTS-2, -3 ve -14, prokolajenleri kollajene dönüştürmede rol alan prokolajen N-proteinazlarıdır; bunlar, N-terminus propeptitlerin çıkarılmasıyla prokolajenlerin işlenmesinde yer almaktadır [93-96]. ADAMTS-2, prokolajen I, II ve III üzerinde etki gösterirken, ADAMTS-3 ve ADAMTS-14 sırasıyla yalnızca prokolajen II ve prokolajen I

işlemeyle ilişkilendirilmiştir. ADAMTS2 genindeki mutasyonlar, koyun ve sığırlarda dermatosparaxis, insanlarda ise EDS (Ehlers–Danlos sendromu) tip VIIc'ye neden olmaktadır [97]. Bu, ciddi cilt kırılabilirliği, eklem gevşekliliği (hiperelastikiyet) ve karakteristik yüz hatları (kısa boylu, mikrognati, epikantik kıvrımlar ve çökük burun köprüsü) ile karakterize otozomal resesif bir bozukluktur [98].



Şekil 1.9: Prokollejinin ADAMTS'ler tarafından işlenmesi [91].

1.3.2.3 ADAMTS-7 ve ADAMTS-12 COMP'u Parçalar.

ADAMTS-7 ve ADAMTS-12, doğrudan kıkırdak oligomerik matris protein (COMP) ile bağlanır ve onu parçalar [99, 100]. COMP, kıkırdakta bulunan, 524 kDa'lık, pentamerik, disülfid bağlı, çok alanlı bir glikoproteindir ve eklem dokusunun ıslak ağırlığının yaklaşık %1'ini oluşturmaktadır. COMP'un, proteoglikanlar ve kollajen gibi diğer matris moleküllerine bağlanarak eklemlerin yapısal bütünlüğünü ve düzenini korumada önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir. COMP'un kaybı, artrit hastalıklarda gözlemlenen kıkırdak matrisinin parçalanmasını kolaylaştırabilmektedir. Son zamanlarda, ADAMTS-7 veya ADAMTS-12 tarafından üretilen COMP fragmentlerinin moleküler kütesinin, osteoartrit (OA) hastalarında gözlemlenenlere benzer olduğu gösterilmiştir. ADAMTS-7 ve ADAMTS-12'ye karşı özel nötralize edici antikorlar, kültüre edilmiş kıkırdakta sitokin uyarımına bağlı COMP parçalanmasını engellemektedir [101].

1.3.2.4 ADAMTS-13 Von Willebrand faktörünü Parçalar.

Von Willebrand faktörü, değişen boyutlardaki multimerler halinde kan dolaşımında bulunan büyük bir glikoproteindir ve başlıca hemostazda rol oynamaktadır. Vasküler yaralanma ve yüksek akma stresi bölgelerinde trombosit tıkaçlarının oluşumunu indükleyerek birincil hemostazda önemli bir rol oynamaktadır [102]. Bu proteaz, vWF alt birimini proteolitik olarak parçalayarak kan akışı altında vWF-trombosit dizelerini hızla parçalar, böylece trombosit pıhtısının boyutunu düzenlemektedir. Trombotik trombositopenik purpura (TTP), vWF-CP eksikliği nedeniyle yüksek reaktif yüksek moleküler ağırlıklı vWF multimerlerinin kalıcılığından kaynaklanan yaşamı tehdit eden sistemik bir hastalıktır [103]. 2001 yılında, birkaç grup vWF-CP'yi ADAMTS-13 olarak tanımlamıştır [104, 105], ve TTP'nin kalıtsal otozomal resesif bir formu, kromozom 9q34'teki ADAMTS-13 genindeki mutasyonlarla ilişkilendirilmiştir [106].

1.3.2.5 ADAMTS-1 ve ADAMTS-8 Anti-anjiyojenik Aktivite Gösterir.

ADAMTS-1 ve ADAMTS-8 anti-anjiyojenik olarak kanıtlanmış iki ADAMTS proteindir [107]. Her ikisi de VEGF tarafından indüklenen anjiyogenezisi inhibe edebilir ve fibroblast büyüme faktörü-2 tarafından indüklenen vaskülarizasyonu baskılayabilir. ADAMTS-1 ve ADAMTS-8'in anti-anjiyojenik aktivitesinin, TS motifleri aracılığıyla gerçekleştiği düşünülmektedir. Bu tekrarlar, TSP1 ve TSP2'nin bir özelliğidir ve beş TSP aile üyesi içinde bunlar anti-anjiyojenik aktiviteye sahip olan tek ikisidir [108]. ADAMTS-1'in anti-anjiyojenik etkileri ile ilgili olarak, TSP1'in CD36 ile etkileşime girebileceği düşünülmektedir [109, 110]. Bununla birlikte, ADAMTS-1'in anti-anjiyojenik etkisinin sorumlusu olan iki C-terminal TS tekrarını içeren bölgeye sahiptir, bu sayede protein VEGF-165'e bağlanabilmektedir [111]. Hem ADAMTS-1'in hem de ADAMTS-8'in ilk C-terminal TS tekrarında bulunan ancak diğer ADAMTS'lerde bulunmayan GWQRRL/TVECRD motifi önemli bir rol oynamaktadır.

1.3.3 ADAMTS'lerin Regülasyonu

1.3.3.1 ADAMTS'lerin Transkripsiyonel Regülasyonu

ADAMTS proteazların gelişimsel ve homeostatik süreçlerdeki önemine rağmen, transkripsiyonel aktivasyon veya baskılanmalarıyla ilgili detaylı bilgi eksiktir.

Romatoid artritte önemli bir rol oynamaları nedeniyle, ADAMTS-4 ve ADAMTS-5 gen ekspresyonunun sitokinler tarafından düzenlenmesi incelenmiştir [112-115]. İnsan kondrositleri onkostatin veya interlökin (IL)-1 β ile muamele edildiğinde, ADAMTS-4 ve matrix metalloproteinaz (MMP) 13'ün gen ekspresyonu ve proteaz aktivitesi artmıştır [116]. IL-1 β sinyali, JAK3-STAT1/3, ERK1/2, PI3 kinaz ve Akt sinyallemesinin bir kombinasyonu aracılığıyla iletilmiş, bu da ADAMTS-4'ün indüksiyonuna yol açan bir sinyal iletim ağı oluşturmuştur. TNF- α ve IL-6'nın, ADAMTS-4 ve ADAMTS-5 mRNA ekspresyonunun arttığı tespit edilmiştir [117, 118]. IL-6 sinyali, MAPK, ERK1/2 ve MEK aracılığıyla iletilmiştir. Pro-inflamatuvar sitokinlerin ADAMTS-4 ve ADAMTS-5 gen ekspresyonunu düzenlemesi, yalnızca artrit ile sınırlı değildir ve aynı zamanda kalp ve intervertebral diskte de tanımlanmıştır. TNF- α ve IL-1 β ile uyarıldığında neonatal kardiyomiyositlerde ve kardiyak fibroblastlarda artmış ADAMTS-4 ve ADAMTS-8 mRNA ekspresyonu gözlemlenmiştir [119].

ADAMTS-1'in ovülasyon sırasında progesteron ve luteinizing hormon tarafından düzenlendiğine dair kanıtlar bulunmaktadır; bu durum, ADAMTS1'in kümülüs-oosit kompleksi çevresindeki ekstrasellüler matriks içinde versicanın yeniden modelleme sürecinde rol oynayabileceğini göstermektedir [120]. Bu bulguyla uyumlu olarak, ADAMTS-1 geni eksik farelerde anormal yumurtalıklar ve azalmış fertilite [121] gözlemlenmiştir.

Böbreklerde, ADAMTS-16'nın doğrudan çinko parmaklı transkripsiyon faktörü WT1 tarafından düzenlendiği gösterilmiştir [122]. ADAMTS-16, böbreklerin dallanma morfogenezisinde, muhtemelen fibronektin'in proteolizi aracılığıyla rol almaktadır [123]. Ayrıca, ADAMTS-16, kondrosit hücre hatlarında transkripsiyon faktörleri EGR1 ve SP1 ile TGF- β tarafından pozitif bir şekilde düzenlenmektedir [124].

MG63 veya Saos-2 gibi osteoblastik hücre hatlarında IL-6 tedavi sonrası ADAMTS-2'nin yukarı regüle olduğu gözlemlenmiştir. IL-6 ile indüklenen ADAMTS-2 mRNA ekspresyonu, JNK spesifik bir inhibitör ile tedavi sonucunda Saos-2 hücre hattında baskılanmıştır [125]. ADAMTS-7, güçlü bir kondrosit diferansiyasyon inhibitörü olarak bilinmektedir ve bu proteazın kondrosit hipertrofisinin engellenmesi, PTHrP (parathormon ilgili protein) tarafından doğrudan düzenlenmektedir [126].

Birçok kanser hücre hattında, ADAMTS proteazlarının aktivitesi epigenetik mekanizmalarla düzenlenmektedir. Örneğin, ADAMTS-1, -5 ve 8 gibi proteazlar genellikle promotor bölgelerindeki artan metilasyon yoluyla susturulmaktadır. Ancak, ADAMTS-12, kolon kanseri hücrelerinde promotor hipermetilasyonu ile sessizleşirken, çevresindeki stromal hücrelerde transkripsiyonel olarak aktifleşmektedir. Sonuç olarak ADAMTS gen ifadesinin transkripsiyonel ve epigenetik mekanizmalar aracılığıyla düzenlenmesi karmaşıktır ve muhtemelen doku ve hücre tipine özgüdür. Bu karmaşıklığa rağmen, bazı ADAMTS proteazlarının pro-inflamatuar sitokinlere yanıt verdiği, diğer ADAMTS proteazlarının ise ovülasyon sırasında cinsiyet hormonları tarafından düzenlendiği gözlemlenmektedir.

1.3.3.2 ADAMTS Proteazların Alternatif Splays ve Posttranslasyonel Modifikasyonları

Alternatif splays ve bireysel ADAMTS izoformlarının varlığı, ADAMTS-2, -4, -6, -7, -9, -13 ve -17 için bildirilmiştir, ancak bireysel ADAMTS izoformları arasındaki işlevsel farklar sadece birkaç raporda tanımlanmıştır [127, 128]. Romatizmal hastalıkta bir ADAMTS-4 dölleme varyantının spacer alanının çıkarılması ve bir C-terminusun dahil edilmesi sonucunu oluşturulan yeni formu, artrit hastalarının sinovyumunda tespit edilmiştir [129]. Bu nedenle, ADAMTS-4'ün agrekanaz aktivitesi artmıştır ve ADAMTS-4'ün alternatif olarak kesilmiş izoformunun, romatizmal eklemden kıkırdak erozyonuna katkıda bulunabileceği öne sürülmüştür [130, 131]. Ancak, ADAMTS-4 ve ADAMTS-5'teki spacer alanının hedefli silinmesi, in vitro'da agrekanaz ve versikanaz aktivitesini azaltmış veya ortadan kaldırmıştır, bu da spacer alanının agrekan ve versikanın parçalanması için gerekliliğini göstermektedir [132, 133]. ADAMTS-17 için bildirilen alternatif splays olayları, spacer alanında gerçekleşmiş ve tam alanın çıkarılması yerine, alanın yapısını değiştiren daha kısa peptitlerin silinmesi ve eklenmesine neden olmuştur [134]. Fonksiyonel olarak, ADAMTS-17'nin alternatif splaysı daha kısa izoformun salınımını etkilemiş ve ADAMTS-17'nin otokatalitik özelliklerini ve potansiyel olarak ADAMTS-17 substratlarının tanınmasını değiştirmiştir.

1.4 ADAMTS Ailesi ve Kolorektal Kanser

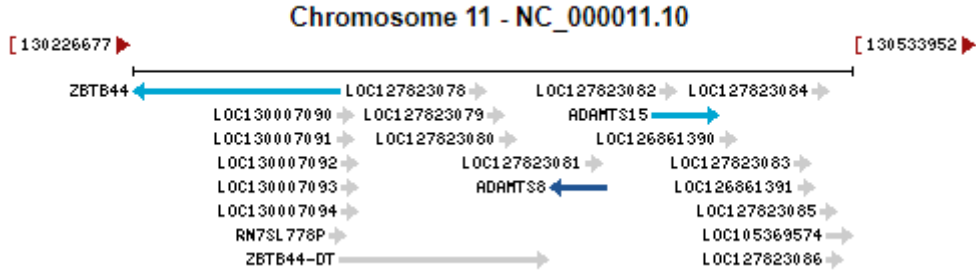
Dünya genelinde her yıl yaklaşık bir milyon yeni kolorektal kanser vakası görülmektedir. Küresel olarak kolorektal kanser erkeklerde dördüncü, kadınlarda ise üçüncü sıklıkta görülen bir kanserdir. En fazla kolorektal kanser vakası, Kuzey Amerika, Avustralya ve Batı Avrupa gibi bölgelerde kaydedilmektedir [135]. İstatistiksel analizler, kolorektal kanser vakalarının sürekli arttığını göstermektedir [136].

KRK ve adenomlu hastaların materyallerinden elde edilen veriler, ADAMTS-1 gen promotorunun, aynı hastanın normal dokusuna kıyasla her iki kanser türünde de hipermetile olduğunu göstermiştir [137, 138]. Son yapılan çalışmalarda ADAMTS-5 gen promotorunda artmış metilasyonu doğrulayan metilat boncuk-chip dizisi tabanlı teknoloji kullanılmıştır. Ayrıca, ifade mikroçip yöntemi [139], genin mRNA miktarının tümör dokusunda azaldığını ortaya koymuştur. Yeni HRM (yüksek çözünürlüklü erime) yöntemi kullanılarak yapılan daha büyük bir KRK grubundaki araştırmalar hem ADAMTS-9 gen promotor metilasyonunun arttığını ortaya koymuş [140] hem de ADAMTS-12 gen promotorunun, normal dokuya kıyasla önemli ölçüde hipermetile olduğunu göstermiştir [141]. Bu çalışmalar ADAMTS-12'nin cerrahi sınırı belirlemek için intraoperatif bir muayene için yeterli bir belirteç olabileceğini ve aynı zamanda bir prognostik belirteç olarak değerlendirilebileceğini düşündürmüştür. Hastalardan alınan dokular üzerinde yapılan in vitro ve in vivo çalışmalar, ADAMTS-15 geninin promotor bölgesindeki hipermetilasyonun, ADAMTS-15 protein ifadesindeki azalmayla ilişkilendiğini belirlemiştir. Histopatolojik ve immünohistokimyasal çalışmalar, ADAMTS-15 protein ifadesinin düzeyinin tümör diferansiasyon histolojik derecesi ile ters orantılı olduğunu göstermiştir [142]. Dahası, ADAMTS-18 geninin KRK içinde epigenetik olarak susturulduğu gözlemlenmiştir ve bu durum HRM yöntemiyle vurgulanmıştır [143]. Ayrıca, hem ADAMTS-15 hem de ADAMTS-18'in KRK hücrelerinde sıkça mutasyona uğradığı gözlemlenmiştir [144]. Adamalizinler KRK etiyopatogenezinde ve metastazında önemli rol oynamaktadır. Alıntılanan sonuçlar, ADAMTS'nin potansiyel tümör belirteçleri ve öngörücüleri olabileceğini düşündürmektedir.

1.5 ADAMTS-8

METH-2 olarak da bilinen ADAMTS-8, Vazquez ve ekibinin 1999'da yapılan bir çalışmada, benzer bir protein olan METH-1 (ADAMTS1) ile tanımlanmıştır. Yüksek homolojiye sahip bu iki gen anti-anjiyogenik faktörler olarak tanımlanmıştır [107]. Soy ağacında iki üyenin aynı daldan geldiği gösterilmiştir ve aralarındaki fark, ADAMTS-8'in C terminalinde anti-anjiyogenik rol kazandırdığı düşünülen, yalnızca bir TSR alanına sahip olmasıdır [145].

İnsan *ADAMTS-8* geni, 11. kromozomun 25. lokusunda (11q25) bulunur ve 890 amino asitlik rezüdüden oluşmaktadır (*bk. Şekil 1.10*) [146].



Şekil 1.10: ADAMT-8'in krozomal lokasyonu.

1.5.1 ADAMTS-8'in Çeşitli Hastalıklarla İlişkisi

ADAMTS-8 fertilite, kardiyovasküler hastalıklar ve genetik hastalıklar gibi çeşitli hastalıklarda rol oynamaktadır.

Nadir bir otozomal dominant genetik bir hastalık olan Wiedemann-Steiner sendromu (WDSTS); büyüme ve gelişimde belirgin anormallikler ve yüz dismorfizmleri ile karakterize edilmiştir. *ADAMTS-8* genindeki de novo mutasyon sonucunda ise erken diş çıkarma, hızlı diş değişimi, displastik mine gibi WDSTS'ye özgü olmayan farklı fenotiplere sebep olduğu gözlemlenmiştir [147].

ADAMTS-8'in kardiyovasküler hastalıkta kilit rol oynadığı belirlenmiştir. ADAMTS-8'in, pulmoner arteriyel hipertansiyon (PH) ve sağ ventrikül yetmezliği gelişimine, pulmoner arteriyel düz kas hücrelerinin çoğalmasına, ECM'nin yeniden şekillenmesine ve endotel disfonksiyonunu otokrin/parakrin bir şekilde teşvik ettiği belirlenmiştir [148]. Ayrıca, ADAMTS-8'in lineer morfedeye upregüle olduğunu ve ADAMTS-8 aşırı ekspresyon plazmidi ile transfekte edilen normal fibroblastların miyofibroblastlara farklılaştığı keşfedilmiştir. Yani, ADAMTS-8 hücre davranışını değiştirme potansiyeline sahiptir [149].

Şiddetli pelvik organ prolapsusu (POP-HVC'ler) olan kadınlarda, ADAMTS-8 ifadesinin kontrol gruplarına göre daha fazla olduğu bulunmuştur [150].

ADAMTS-8 proteazının, PNN (Perinöron Ağı) üzerinde ve nöronal plastisite (sinir hücrelerinin bağlantıları ve fonksiyonları üzerindeki esneklik) süreçlerinde önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir [151].

1.5.2 ADAMTS-8 ve Kanser

ADAMTS-8, çeşitli kanser türlerindeki düzenleyici rolleri nedeniyle önemli bir biyolojik bileşen olarak tanımlanmıştır. Bu gen, akciğer kanseri, meme kanseri, mide kanseri, hepatoselüler karsinom, kolorektal kanser, endometrium kanseri ve diğer malignitelerdeki ifade ve regulasyon değişiklikleri üzerine bir dizi araştırmada incelenmiştir. Yapılan çalışmalardan elde edilen verilere göre, ADAMTS-8'in düşük düzeyde ifade edildiği veya epigenetik olarak susturulduğu durumlar, çoğu zaman kanserlerin agresif özelliklerini ve kötü prognozlarını yansıtmaktadır [152]. Ayrıca, ADAMTS-8'in hücre proliferasyonunu baskıladığı, invazyonu ve metastazı engellediği, apoptozu artırdığı ve tümör büyümesini kontrol ettiği gösterilmiştir. Bu bağlamda, ADAMTS-8'in kanserlerde potansiyel bir tümör baskılayıcı gen olarak işlev görebileceği ve terapötik hedef olabileceği düşünülmektedir [153-155].

ADAMTS-8'in küçük hücreli olmayan akciğer kanserlerinde daha az ifade olduğu bulunmuştur. Aynı çalışmada ADAMTS-8'in proksimal promotor bölgesinde hipermetilasyon yolu ile adenokarsinomlarda ve skuamöz hücreli karsinomlarda epigenetik olarak susturuldu belirlenmiştir [153].

ADAMTS-8'in normal beyin dokusuna kıyasla beyin tümörlerinde düşük düzeyde ifade edildiği belirlenmiştir [156].

ADAMTS-8'in meme kanseri dokularında yüksek düzeyde ifade edildiğini ve bu ifadenin kötü klinik sonuçlarla ilişkilendirildiğini göstermektedir [157].

ADAMTS-8'in, yaygın karsinomlarda (nazofaringeal, özofagus skuamöz hücreli, gastrik ve kolorektal, hepatoselüler, akciğer, meme, renal ve servikal karsinom) promotor CpG metilasyonu tarafından sıklıkla susturulan EGFR-MEK-ERK sinyalini baskılayarak proapoptotik bir tümör baskılayıcı gen olarak işlev gördüğünü gösterilmiştir [152].

Mide kanseriyle ilgili yapılan çalışmada, ADAMTS-8'in, mRNA ekspresyonunun belirgin şekilde azaldığı ve bu düşüşün lenf nodu metastazıyla ilişkili olduğu belirlenmiştir. Mide kanseri hücre dizileri ve örneklerinde ADAMTS-8 geninin CpG metilasyonu gözlemlenmiş, bu metilasyonun metillenmiş primer mide tümörlerinde düşük ADAMTS-8 ekspresyonu ile bağlantılı olduğu saptanmıştır. Ayrıca, ADAMTS-8 ekspresyonunun 5-aza-2'-deoksisitidin tedavisi ile düzenlendiği ve hipermetilasyonunun mide kanserinde ekspresyon azalmasıyla ilişkilendirildiği ortaya konmuştur [158].

Düşük ADAMTS-8 ekspresyonunun hepatoselüler karsinomlu hastalarda kötü prognozun bir göstergesi olduğunu ve ADAMTS-8'in, ERK sinyal yolunu modüle ederek hepatoselüler karsinomun büyümesini, invazyonunu ve apoptozunu düzenlemede önemli bir rol oynadığını göstermektedir [159].

Meme invaziv duktal karsinomu (IDC) hastalarında yüksek ADAMTS-8 düzeyi, IDC hastalarının daha kötü prognoz ile ilişkilendirilmiştir [160].

Özofagus skuamöz hücreli karsinomunda (ESCC) ADAMTS-8 ifadesinin düşük olduğunu ve düşük ifadenin klinik aşama ve lenf düğümü metastazıyla ilişkili olduğunu belirlenmiştir. ADAMTS-8 aşırı ifadesinin ESCC hücrelerinde proliferasyonu azalttığı, migrasyonu ve invazyonu engellediği, apoptozu teşvik ettiği ve tümör büyümesini azalttığı gösterilmiştir. Bu nedenle, ADAMTS-8'in ESCC'de potansiyel bir terapötik hedef olduğu düşünülmektedir [154].

ADAMTS-8 ifadesinin meme kanseri dokularında belirgin şekilde düşük olduğunu tespit edilmiştir. MDA-MB-453 hücrelerinde ADAMTS-8 aşırı ifadesinin hücre proliferasyonunu, migrasyonunu ve invazyonunu engellediği, apoptozu teşvik ettiği bulunmuştur. ADAMTS-8'in MDA-MB-231 hücrelerinde baskılanması ise ters etki göstermiştir. *In vivo* veriler, ADAMTS-8 aşırı ifadesinin tümör büyümesini azalttığını doğrulamıştır. Ayrıca, ADAMTS-8 aşırı ifadesi gösteren MDA-MB-453 hücrelerinde yapılan kemoterapi duyarlılık testleri, cisplatinin hücre büyümesini önemli ölçüde engellediğini göstermiştir. ADAMTS-8 aşırı ifadesi sonrasında β -katenin, MMP-7 ve c-Myc seviyelerinde azalma belirlenmiştir. Bu sonuçlar, ADAMTS-8'in meme kanseri hücrelerinde büyümeyi durdurma ve invazyonu azaltma potansiyeline işaret etmektedir [161].

ADAMTS-8, kolorektal kanserli (KRK) hücre hatlarında ve tümör dokularında düşük ifade göstermiş, ancak DNA metilasyon inhibitörleri ile tedavi edilen hücrelerde ifadesi geri kazanılmıştır. ADAMTS-8 aşırı ifadesinin, hücre proliferasyonunu azalttığı, apoptozu artırdığı ve hücre invazyonunu engellediği görülmüştür. Ayrıca, ADAMTS-8'in hücre döngüsünü G2/M fazında durdurduğu belirlenmiştir. Moleküler düzeyde, ADAMTS-8'in BCL-XL, fosfo-GSK3 β , β -katenin ve c-myc düzenlediği ve tümör büyümesini kontrol ettiği gözlemlenmiştir. Bulgular, ADAMTS-8'in KRK'da potansiyel bir tümör baskılayıcı gen ve değerli bir biyobelirteç adayı olabileceği öne sürülmüştür [155].

Endometrium kanseri tanısı almış 41 hasta serumu ve kontrol grubu olarak kullanılan, benign endometriyal patoloji tanısı almış 41 hastadan oluşan çalışmada; ADAMTS 8 düzeyleri ise anlamlı derecede düşük bulunmuştur [162].

Akciğer kanseri hastalarında ADAMTS-8 ifade seviyeleri ile genel sağkalım oranları arasında pozitif bir korelasyon tespit etmiştir. Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC) hücrelerinde ADAMTS-8'in az ifade olduğu ve ADAMTS-8'in upregülasyonunun hücre proliferasyonunu baskılayarak apoptozu artırdığı belirlenmiştir. Aynı çalışmada, akciğer kanseri dokularında VEGFA ile ADAMTS-8 arasında negatif bir ilişki saptanmış ve ADAMTS-8'in artan ifadesinin VEGFA'yı inhibe ettiği gösterilmiştir. Ayrıca, ADAMTS-8'in HUVEC'lerdeki damar oluşumunu ve migrasyonu baskılayarak angiogenezi olumsuz etkilediği ortaya konmuştur. Fare modellerinde yapılan deneylerde, ADAMTS-8'in aşırı ifadesinin tümör büyümesini inhibe ettiği ve tümörlerdeki VEGFA ve CD31 seviyelerini azalttığı gözlemlenmiştir [163].

Enflamasyonla ilişkilendirilmiş genlerin ve enhancerlar tarafından düzenlenen genlerin taranması sonucunda, enhancerlar tarafından düzenlenen 146 enflamasyonla ilgili gen belirlenmiştir. Bu genlerin ileri prognostik analizi, GDF10, HPGDS, ABCA8, SLIT3 ve ADAMTS-8 gibi enhancerlar tarafından düzenlenen 5 inflamatuvar belirteç tespit etmiştir. Son olarak, GDF10, HPGDS, ABCA8, SLIT3 ve ADAMTS-8 genlerinin ekspresyonunun TNF α ve enhancerlar tarafından düzenlendiği, bu genlerin ekspresyonunun akciğer adenokarsinomunda (LUAD) hücrelerinin proliferasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir [164].

OIP5-AS1'in papiller tiroid kanseri (PTC) hücrelerindeki ilerlemeyi etkileyen bir faktör olduğu belirlenmiştir. OIP5-AS1'in aşırı ifadesi, PTC hücrelerinde proliferasyonu, göç ve invazyonu artırmıştır. OIP5-AS1, miR-98'un hedefi olarak işlev görmekte ve bu etkileşim sonucunda ADAMTS-8 aktivasyonu gerçekleşmektedir. Bu durum, OIP5-AS1'in PTC hücrelerinde miR-98/ADAMTS-8 ve EGFR, MEK/ERK yollarını aktive ederek ilerlemeyi teşvik ettiğini göstermektedir. Ayrıca, METTL14'in OIP5-AS1'in düzenlendiği bir hedef olduğu tespit edilmiş ve METTL14 aşırı ifadesi, PTC hücrelerindeki proliferasyonu ve göç/invasiyonu inhibe etmiştir. Bu bulgular, ADAMTS-8'in OIP5-AS1 ve METTL14 aracılığıyla PTC hücrelerindeki ilerlemeye katkıda bulunduğunu öne sürülmüştür [165].

ADAMTS-8 aşırı ifadesi, meme kanseri hücrelerinde proliferasyonu, migrasyonu ve invazyonu inhibe etmiştir. Aynı zamanda G2/M hücre döngüsü arrestosu oluşturmuştur. ADAMTS-8, EGFR/Akt sinyal yolunun düzenlenmesi ve hücre döngüsü kontrolünde rol oynamıştır. Bu sonuçlar, ADAMTS-8'in meme kanserinde tümör baskılayıcı bir gen olarak işlev gördüğünü ve potansiyel bir prognostik belirteç olduğunu öne sürmektedir [166].

RNA-seq ve biyoinformatik analizler kullanılarak yapılan çalışmalar sonucunda, ADAMTS-8'in düşük seviyede ifade edildiğinde invazyon ve metastazı artırarak genel sağkalımı olumsuz etkilediğini ortaya koymuştur. GATA Binding Protein 1 (GATA1) tarafından düzenlenen ADAMTS-8, Thrombospondin Type 1 Domain Containing 1 (THSD1) ve ADAMTS Like 2 (ADAMTSL2) aracılığıyla patolojik rolünü gerçekleştirmekte olduğu bulunmuştur. Akciğer kanseri hastalarında yapılan analizler, ADAMTS-8 seviyelerinin, yabancıl tip EGFR veya düşük PD-L1 gruplarında yüksek olmasının, daha uzun sağkalım ile ilişkili olduğunu göstermiştir. Bu bulgular, ADAMTS-8'in akciğer adenokarsinomlu hastalarda potansiyel bir tedavi seçeneği olarak düşünülebileceğini önermektedir [167].

2. TEZ HEDEFİ VE ÇALIŞMA KAPSAMI

ADAMTS-8, ADAMTS ailesinin proteoglikanaz aktivitesine sahip ve anti-anjiyojenik özellikteki bir üyesidir. Bu bakımdan normal ve patofizyolojik süreçlerde hücreler arası matriksin yeniden şekillenmesinde görev alır. Yaygın kanser türlerinde epigenetik mekanizmalarla ifadesi baskılanan ADAMTS-8 kolorektal kanser için potansiyel bir tümör baskılayıcı olarak önerilmektedir.

DNA bağlanma alanı, GC açısından zengin motifleri (GC/GT kutuları) tanıyan üç çinko parmaktan oluşan SP1, transkripsiyonun başlamasını yönlendiren TATA kutusu bulunmayan promotorlarda GC kutularına bağlanarak RNA polimeraz II'nin doğru konumda yerleşmesine ve transkripsiyonun başlatılmasına yardımcı olmaktadır. SP1 aynı zamanda metastaz süreçlerinde etkili olan faktörlerin ifadesini düzenleyerek kanserin yayılmasına katkıda bulunmaktadır.

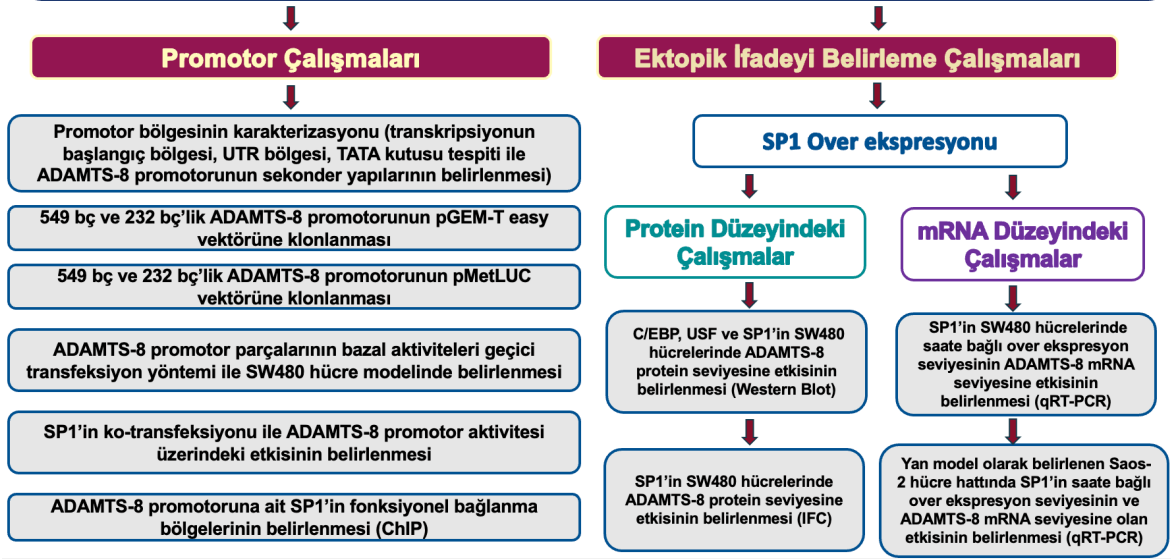
ADAMTS-8 geninin transkripsiyonel regülasyonu hakkında mevcut literatürde sınırlı bilgi bulunmaktadır ve bu çalışma ADAMTS-8 promotor bölgesinin detaylı bir şekilde incelenmediği bir alandaki boşluğu doldurmayı amaçlamaktadır. Özellikle, Kolorektal kanser progresyonu ve metastazında kritik bir rol oynayan SP1 transkripsiyon faktörünün, ADAMTS-8 promotor bölgesinde yoğun bir bağlanma bölgesine sahip olduğu bu tez çalışması kapsamında keşfedilmiştir. Bu bağlamda, SP1'in ADAMTS-8'in transkripsiyonel düzeyde nasıl regüle edildiğine dair mekanizmaların aydınlatılması hedeflenmiştir. Bu çalışma, ADAMTS-8 geninin SP1 aracılı regülasyonunu ilk defa ortaya koyarak, bu önemli moleküler etkileşimin anlaşılmasına katkı sağlamayı amaçlamaktadır.

Bu amaçla ilk olarak tez planı şekil 2.1'de verilmiştir. Tez çalışması kapsamında aşağıdaki basamaklar tamamlanmıştır;

- i. ADAMTS-8 Promotorunun Karakterizasyonu incelendi. Bu sayede transkripsiyonun başlangıç bölgesi, UTR bölgesi, TATA kutusu, ATG bölgesi tespit edildi. EMBOSS CpG Plot analizi yardımıyla CpG adası oluşumu, %GC içeriği, saç tokası yapısı oluşturma durumu tespit edildi. mFold programı yardımı ile ise ADAMTS-8 promotorunun sekonder yapıları incelendi.

- ii. ADAMTS-8 promotorunun daha detaylı incelenebilmesi için 5' uçtan kısaltılarak oluşturulan promotor parçaları pGem-T easy vektörüne klonlandı. Dizi analizi yardımı ile klonlama işlemi doğrulandı.
- iii. pGem-T easy vektörüne klonlanan ADAMTS-8 promotor parçaları transkripsiyonel aktivite çalışmalarında kullanılmak üzere lusiferaz haberci vektörü pMetluc'a klonlandı. Dizi analizi yardımı ile klonlama işlemi doğrulandı.
- iv. ADAMTS-8 promotor parçalarının bazal aktiviteleri geçici transfeksiyon yöntemi ile SW480 hücre modelinde belirlendi.
- v. SP1 transkripsiyon faktörünün ADAMTS-8 promotorundaki muhtemel bağlanma bölgeleri PROMO programı yardımıyla tespit edilip şematize edildi.
- vi. SP1 içeren ekspresyon vektörü promotor parçalarıyla birlikte ayrı ayrı SW480 hücrelerine transfekte edildi ve SP1 aracılı promotor aktivitesi belirlendi.
- vii. ADAMTS-8 promotorundaki muhtemel bağlanma bölgelerini belirlediğimiz SP1 transkripsiyon faktörünün promotora fonksiyonel olarak bağlanıp bağlanmadığını belirlemek amacıyla ChIP analizi gerçekleştirildi ve SP1'in ADAMTS-8 promotorundaki bağlanma yeri doğrulandı.
- viii. Çeşitli transkripsiyon faktörlerinin ADAMTS-8 protein ifadesini etkileyip etkilemediğini araştırmak için C/EBP, USF ve SP1 SW480 hücrelerinde over ekspre edildi ve hücrelerden elde edilen proteinler ile western blot analizi yapıldı.
- ix. ADAMTS-8 mRNA ifadesine etkisini belirlenmek amacıyla SP1 transkripsiyon faktörü SW480 hücrelerinde geçici olarak over ekspre edildi. 24, 48 ve 72. saat dilimlerinde elde edilen RNA'lerden cDNA sentezlendi ve qRT-PCR yardımıyla saate bağlı over ekspresyon seviyesi ve ADAMTS-8 mRNA seviyesi belirlendi.
- x. SP1 over ekspresyonunun farklı hücre hatlarında ADAMTS-8 gen ifadesine etkisini incelemek için Saos-2 hücre hattı yan model seçildi. SP1 Saos-2 hücrelerinde geçici olarak over ekspre edildi ve hücrelerden 24, 48 ve 72. saat dilimlerinde RNA izolasyonu yapıldı. RNA'lerden cDNA sentezlendi ve qRT-PCR yardımıyla saate bağlı over ekspresyon seviyesi ve ADAMTS-8 mRNA seviyesi belirlendi.

ADAMTS-8 Geninin SP1 Aracılı Transkripsiyonel Regülasyonu



Şekil 2.1: Tez çalışması kapsamında gerçekleştirilecek iş planları.

3. MATERYAL- METOT

3.1 Materyaller

3.1.1 Çalışma Kapsamında Kullanılan Cihazlar

Tez çalışması kapsamında çeşitli cihazlar kullanılmıştır cihaz bilgileri Tablo 3.1’de belirtilmiştir.

Tablo 3.1: Tez çalışında kullanılan cihazlar.

Cihaz Adı	Markası
Laminar Air Flow	Telstar Bio II / İspanya
CO ₂ ’li İnkübatör	Nuaire / ABD
Inverted Mikroskop, Floresan Mikroskobu	Nikon / Japonya
-80 °C Derin Dondurucu	Thermo /ABD
Buzdolabı (+4 °C / -20°C), Mikrodalga Fırın	Arçelik / Türkiye
Buz Makinesi	Hoshizaki / Japonya
pH Metre	Hanna / ABD
Su Banyosu	Elektromag / Türkiye
Ultrasonik Su Banyosu	PlusLab
Isıtıcı Blok	FALC/ İtalya
Vorteks, Isıtmalı Manyetik Karıştırıcı	Velp Scientifica
Hassas Terazı	Sartorius / Almanya
Otoklav	Hirayama / Japonya
Etüv	WTB / Almanya
Çalkalamalı İnkübatör (Isı Ayarlı)	GFL / Almanya
Soğutmalı Santrifüj	Sigma / Almanya
Mikro Santrifüj	Thermo / ABD
Soğutmalı Mikro Santrifüj	Hanil Science
Döner Hareketli Çalkalayıcı	Thermo / ABD
Horizontal Çalkalayıcı	GFL / Almanya
Saf Su Cihazı	Human Corporation
UV Görüntüleme Sistemi	Vilber Lourmat
Görüntüleme Sistemi	UVP BioSpectrum
Otomatik Pipetler	Thermo, Eppendorf
Elektrikli Pipet Pompası	IsoLab
DNA Elektroforez Sistemi	Minicell Primo
RNA Elektroforez Sistemi	Apelex / İngiltere
SDS PAGE Aparatları	BioRad
PCR Cihazı	Techne Progene / İngiltere
Real Time PCR Cihazı (Light-Cycler 480)	Roche Life Science
Elektroforez Güç Kaynağı	Thermo Scientific
Luminometre (Luminoskan TM Microplate)	Thermo / ABD
Spektrofotometre, µDrop TM Plate	Multiskango, Thermo
Flow Sitometri	Guava

3.1.2 Tez Çalışmasında Kullanılan Kimyasal ve Malzemeler

Tez çalışmasında kullanılan kimyasal malzemeler çalışmalar için uygun saflıkta olup uygun ortam koşullarında saklanmıştır. Tez çalışması kapsamında kullanılan kimyasal ve malzemelere ait bilgiler Tablo 3.2’de belirtilmiştir.

Tablo 3.2: Tez çalışmasında kullanılan kimyasal ve malzemeler.

Kimyasal / Malzeme Adı	Markası
▼ Bakteri Çalışmalarında Kullanılan Malzemeler	
LB Agar Besiyeri	Pronadisa
LB Broth Besiyeri	Pronadisa
Ampisilin ve Kanamisin Antibiyotikleri	Sigma
Gliserol ve CaCl ₂	Sigma
Petri Kutuları (Steril)	IsoLab
50 mL ve 15 mL Falkonlar (Steril)	IsoLab
GeneJET Plasmid Miniprep™ Kit	Thermo Scientific
Midi-NucleoBond® Xtra™ Kit	Macherey-Nagel
▼ DNA Çalışmalarında Kullanılan Malzemeler	
Taq DNA Polimeraz Enzimi (5 U/μL)	Thermo Scientific
10X Taq Tamponu (+KCl)	Thermo Scientific
dNTP Karışım (10 mM)	Thermo Scientific
MgCl ₂ (25 mM)	Thermo Scientific
Agaroz, Etidyum Bromür (Et-Br)	Sigma
1 kb DNA Ladder, 6X Yükleme Boyası	Thermo Scientific
Tris Base, Borik Asit	Sigma
GeneJET Gel Extraction™ Kit	Thermo Scientific
Restriksiyon Endonükleaz Enzimleri	Thermo Scientific, NEB
T4 DNA Ligaz Enzimleri ve Tamponları	Thermo Scientific, NEB
▼ Hücre Kültürü Çalışmalarında Kullanılan Malzemeler	
DMEM (Dulbecco’s Modified Eagles Medium)	Gibco, EuroClone
FCS (Fetal Calf Serum)	Gibco
EDTA (Etilendiaminetetraasetik Asit)	Sigma
L-Glutamin, Tripsin	Sigma
PBS (Phosphate Buffered Salin)	VWR Life Science
Pastör Pipeti (3 mL, Steril)	IsoLab
Serolojik Pipetler (10 mL ve 25 mL, Steril)	Sarstedt
Flasklar (25 cm ² ve 75 cm ² , Steril)	Sarstedt
Steril Filtreler (0,22 μm ve 0,45 μm)	Sartorius
DMSO (Dimetil sülfoksit)	Sigma
Tripan Mavisi	Sigma
Ependorflar (1,5 mL’lik ve 2 mL’lik, Steril)	IsoLab
50 mL ve 15 mL Falkonlar (Steril)	EuroClone

Tablo 3.2 (devam)

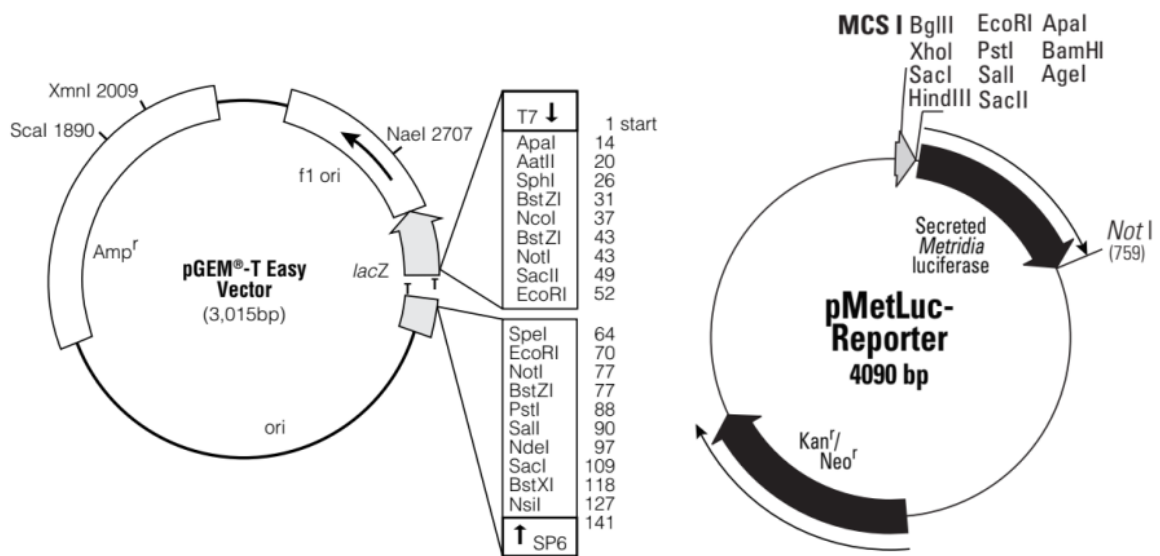
Kimyasal / Malzeme Adı	Markası
Penisilin-Streptomisin Solüsyon (100X)	Gibco
Antibiyotik-Antimikotik Solüsyon (100X)	Gibco
Hücre Kültürü Plaka (96, 24, 12, 6 Kuyucuklu)	Sarstedt
HCl, İzopropanol	Sigma
Paraformaldehit	Sigma
DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol)	Sigma
Antifade Reagent	Prolong Invitrogen
Metanol	Sigma
▼ Transfeksiyon Çalışmalarında Kullanılan Malzemeler	
HEPES	Sigma
NaCl, Na ₂ HPO ₄ , CaCl ₂	Sigma
▼ Transkripsiyonel Aktivite Çalışmalarında Kullanılan Malzemeler	
Ready-To-Glow™ Dual Sec. Reporter Ass.	Takara Clontech
Lusiferaz ve SEAP Substratları	Takara Clontech
384 Kuyucuklu Plaka	Corning
▼ RNA Çalışmalarında Kullanılan Malzemeler	
DEPC (Diethyl Pirokarbonat)	Sigma
GeneJET RNA Purification™ Kit	Thermo Scientific
MOPS (3-(N-morpholino) propansülfonik asit)	Merck
β-merkaptoetanol, Formaldehit	Merck
İnsülin Enjektörü (Steril)	Bd Micro-Fine
Etanol	Merck
NaAc (Sodyum Asetat), EDTA	Sigma
SDS (Sodyum Dodesil Sülfat)	Sigma
Agaroz, Etidyum Bromür (Et-Br)	Sigma
Oligo(dT)	Thermo Scientific
dNTP Karışım	Thermo Scientific
RiboLock RNaz İnhibitörü	Thermo Scientific
RevertAid Reverse Transkriptaz Enzimi	Thermo Scientific
Reverse Transkriptaz Tamponu (5X)	Thermo Scientific
RealQ Plus 2X Master Mix Green	Ampliqon
96 Kuyucuklu Plaka (Beyaz) Light-Cycler 480	Roche Life Science
96 Kuyucuklu Plaka Jelatini	Thermo Scientific

Tablo 3.2 (devam)

Kimyasal / Malzeme Adı	Markası
▼ Protein Çalışmalarında Kullanılan Malzemeler	
Coomassie Brilliant Blue G-250	Sigma
Coomassie Brilliant Blue R-250	Sigma
Proteaz İnhibitör Tabletleri	Roche
Fosforik asit, Etanol, Metanol	Merck
Akrilamid/Bisakrilamid (37.5/1)	Sigma
APS (Amonyum Persülfat)	Merck
TEMED (Tetrametiletildiamin)	Sigma
4X Laemli Örnek Tamponu	BioRad
β-merkaptotanol	Merck
Tris, EDTA, EGTA, SDS, Glisin, NaCl	Sigma
PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder	Thermo
PVDF Membranı	Millipore
Yağsız Süt Tozu	Santa Cruz
Tween®-20	Sigma
ADAMTS-8 Mouse Monoklonal Antikor	Santa Cruz
β-aktin Mouse mAb	Cell Signaling
m-IgGκ BP-HRP (Sekonder Antikor)	Santa Cruz
Pierce™ ECL	Thermo Scientific

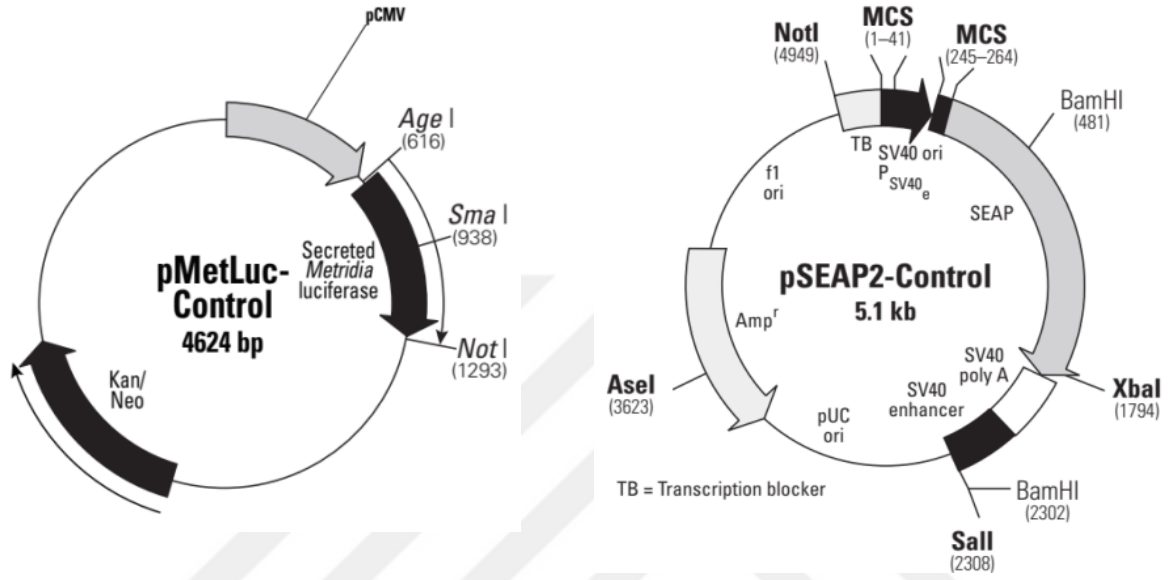
3.1.3 Tez çalışmasında Kullanılan Vektörler

ADAMTS-8 promotor konstraktları öncelikle T.A klonlama ile pGEM-T® Easy (Promega) vektörüne daha sonra promotor aktivitesinin belirlenebilmesi için ise pMETLuc-Reporter (Clontech) vektörüne klonlandı (b.k. Şekil 3.1).



Şekil 3.1: pGEM-T Easy ve pMetLuc-Reporter vektör haritaları.

Transfeksiyonun etkinliğini tespit edebilmek için pozitif kontrol olarak pMETLuc-kontrol (Clontech) vektörü ve arka plan aktivitesini belirlemek için negatif kontrol olarak (boş) pMETLuc-reporter vektörü kullanılmıştır. Ayrıca salınım sisteminin normalizasyonu amacı ile pSEAP2-kontrol (Clontech) vektörü kullanılmıştır (*b.k.* Şekil 3.2).



Şekil 3.2: pMETLuc-kontrol ve pSEAP2-kontrol vektör haritaları.

3.1.4 Transformasyon Deneylerinde Kullanılan Bakteri Soyları

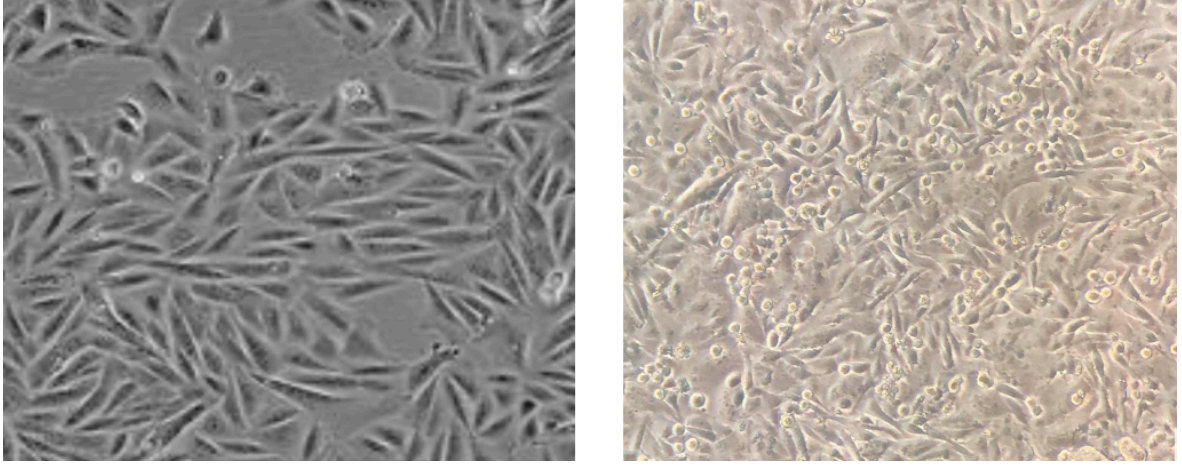
Klonlama çalışmalarındaki transformasyon işlemi ve sonrasında stokların oluşturulması amacıyla çeşitli *E. coli* soyları kullanıldı, soylara ait bilgiler Tablo 3.3'te gösterildi.

Tablo 3.3: Transformasyon işleminde kullanılan bakteri soyları.

<i>E. coli</i> Soyu	Genotip
DH5a	SupE44 Δ (lacZYA-argF)U196 (Φ 80 Δ lacZM15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1
JM109	EndA1, recA1, gyrA96, thi, hsdR17 (rk ⁻ , mk ⁺), relA1, supE44, Δ (lac-proAB), [F' traD36, proAB, lacIqZ Δ M15].

3.1.5 Tez Çalışmasında Kullanılan Hücre Soyları

Bu tez çalışması kapsamında SW480 ve SAOS-2 hücre hattı kullanılmıştır. Hücrelerin mikroskop altındaki görüntüleri Şekil 3.3'te belirtilmiştir.



Şekil 3.3: SAOS-2 ve SW480 hücre görüntüleri.

3.2 Metot

3.2.1 Deney Malzemeleri ve Laboratuvar Temizliği

Deneyde kullanılan malzemeler, uygun sterilizasyon koşulları sağlanarak hazır hale getirildi. Isıya dayanıklı pipet uçları, ependorf tüpler ve diğer laboratuvar malzemeleri, otoklav cihazında 121 °C sıcaklıkta 20 dk. boyunca otoklavlanarak steril hale getirildi. Otoklavlanması mümkün olmayan çözeltiler ise 0,22 µm'lik filtre yardımıyla steril edildi.

Hücre kültürü laboratuvarı, %70'lik etil alkol, çamaşır suyu ve virkon içeren dezenfektanlar kullanılarak temizlendi. Çalışmaya başlamadan önce, laboratuvarın ve laminar akış kabininin UV lambası yaklaşık 30 dk. açılarak sterilize edildi. Laminar kabinin içerisine alınan malzemeler, %70'lik etil alkol ile silinerek içeri alındı. Ayrıca, RNA çalışmalarında ortam ve malzemelerdeki RNaz'ların etkisini ortadan kaldırmak amacıyla %0,1 DEPC'li su kullanılarak önlemler alındı.

3.2.2 Bakteri Çalışmaları ile İlgili Metotlar

3.2.2.1 Sıvı ve Katı Besiyerinin Oluşturulması

Sıvı besiyeri olarak kullanılan LB (Luria Broth), üreticinin 1 litre için önerdiği miktardaki LB, deiyonize su içerisinde çözülerek hazırlandı. Sterilizasyon işlemi, 121°C'de 20 dk. otoklavlanarak gerçekleştirildi ve ardından +4 °C'de muhafaza edildi. Deney planına göre LB sıvı besiyerine, son konsantrasyonu 30 µg/mL olan kanamisin veya 100 µg/mL olan ampisilin ilave edildi.

Katı besiyeri için LB agar tercih edildi. Üreticinin önerdiği miktardaki LB agar deiyonize su içerisinde çözüldü ve 121 °C'de 20 dk. süreyle otoklavlanarak steril hale getirildi ve 50-55 °C'ye kadar soğuması bekledikten sonra, besiyeri içine son konsantrasyonu 100 µg/mL olan ampicilin veya 30 µg/mL olan kanamisin eklenerek homojen hale getirildi. LB agar petri kaplarına döküldü ve polimerleşip katılaşması için belirli bir süre oda sıcaklığında bekletildi. +4 °C'ye kaldırılmadan önce parafilm ile sarılarak ters çevrildi ışık almayacak bir şekilde muhafaza edildi.

3.2.2.2 *E. coli*, JM109 Hücrelerinin Kompeten (Alıcı) Hale Getirilmesi

Kompeten hücre hazırlığı için, -80 °C'deki gliserol stoktan *E. coli* JM109 soyu hücreleri katı besiyerine ekimi yapılarak gece boyu yaklaşık 16 saat boyunca 37 °C'de inkübe edildi. Ardından, tek koloniden ekim yapılarak 10 mL LB sıvı besiyerinde gece boyunca 37 °C'de çalkalamalı etüvde inkübasyona tabi tutuldu. Elde edilen ön kültür, hacminin en az üç katı olan 100 mL LB besiyerine transfer edilerek 37 °C'de çalkalamalı inkübatöre yerleştirildi. Belirli periyotlarda absorbans ölçümleri alınarak, OD600 değerinin 0,6-0,8 arasına ulaşana kadar inkübasyona devam edildi.

Bakteri süspansiyonu, bek alevi yanında 50 mL'lik falkon tüplerine paylaştırıldı. Falkon tüpleri +4 °C'de 3.000 rpm'de 5 dk. boyunca santrifüjlendi ve süpernatant uzaklaştırıldı. Kalan pellete 0,1 M CaCl₂ çözeltisi (başlangıçtaki bakteri süspansiyonun yarıya kadar) eklenerek çözüldü. Hücre süspansiyonu, 30 dk. buz üstünde bekletildi sonra +4 °C'de 3.000 rpm'de 5 dk. boyunca santrifüjlendi ve süpernatant uzaklaştırıldı. Kalan pellete 0,1 M CaCl₂ (başlangıç hacminin 1/10'u kadar) çözeltisi eklenerek tekrar çözüldü. Süspansiyon, 4 saat süresince buz üzerinde bekletildi. Daha sonra eşit hacimde %40'luk soğuk gliserol eklenerek karıştırıldı. Bu karışım, 1,5 mL'lik ependorf tüplerine 200 µL olacak şekilde paylaştırıldı ve -80 °C'de muhafaza edildi.

3.2.2.3 Transformasyon

Transformasyon işlemi için -80 °C'den çıkarılan kompetent hücre gliserol stokları buza konularak 15 dk bekletildi. 1,5 mL'lik ependorf tüp içerisinde 200 µL'lik kompetent hücre üzerine 10 µL plazmid eklenerek karışım oluşturuldu. Karışım 40 dk. boyunca buz üzerinde bekletildi. Inkübasyon sonrasında ependorf tüpü, 42 °C'deki su banyosunda 2 dk. bekletilerek hücrelere ısı şoku uygulandı. Hemen ardından tüp 2 dk. boyunca buz üzerinde

bekletildi. Daha sonra tüpe, hücrelerin 2- 2,5 saat 37 °C'deki çalkalamalı etüvde inkübe edilmesi için LB besiyerinden 800 µL eklendi. Bu sürenin sonunda karışım 5000 rpm'de 5 dk santrifüjlendi pellet süpernatant kısmının 50 µL'si ile yeniden çözülerek plazmidin dirençli olduğu antibiyotiği içeren petrilere ekildi. Petriler, 37 °C'deki inkübatöre 15 dk boyunca besiyerinin yayılan kültürü emmesi için düz olarak konuldu. Daha sonra petriler ters çevrilerek 16 saat 37°C'de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında oluşan kolonilerden gliserol stok hazırlandı ve plazmid izolasyonu yapıldı. Plazmitlerin restriksiyon enzimleri ile kesilerek kolonilerin rekombinant olup olmadığı tespit edildi.

3.2.2.4 Gliserol Stok Hazırlanması

İlgili antibiyotiğe dirençli olan kolonilerden seçilen bakteriler, yine aynı antibiyotiği içeren 10 mL LB besiyerine ekildi. Bu ekim, 37 °C'deki çalkalamalı etüvde bir gece boyunca inkübe edildi. Hazırlanan ön kültür, belirtilen şartlarda çoğaltıldıktan sonra bek alevi yanında etiketlenmiş ependorf tüplere eşit hacimlerde paylaştırıldı. Tüplere %30'luk steril gliserol eklenerek oluşturulan bakteri süspansiyonları, -80 °C'de uzun vadeli muhafaza için saklandı.

3.2.2.5 Kompetent Hücrenin Etkinliğinin Belirlenmesi

Klonlama ve alt klonlama çalışmalarında kullanılmak üzere hazırlanan kompetent hücrelere, halkasal plazmitler 100 ng, 10 ng ve 0,1 ng dilüsyon oranlarında transforme edildi. Transformasyon sonucunda oluşan kolonilerin sayısı belirlendi. Transformasyon etkinliği, 10⁶ ila 10⁸ cfu/µg aralığında olan kompetent hücreler, çalışmalar için kullanılabilir olarak ifade edildi. Etkinlik değeri aşağıdaki formül yardımıyla hesaplandı.

$$\frac{\text{Petrideki koloni sayısı (cfu)}}{\text{Petriye ekilen plazmit DNA konsantrasyonu}} \times \frac{1 \times 10^3}{\mu\text{g}}$$

Şekil 3.4: Kompeten hücre etkinlik formülü.

3.2.2.6 Küçük Ölçekli Plazmit İzolasyonu

Tek koloni veya gliserol stoklardan, seçilen antibiyotiği içeren 10 mL LB besiyerine ekim yapıldı. Ardından gece boyunca 37 °C'deki çalkalamalı etüvde inkübe edilerek ön kültür hazırlandı. Hazırlanan ön kültür, plazmit izolasyonu işlemi GeneJET Plazmid Miniprep™ kitinin protokolüne uygun olarak gerçekleştirildi. Ön kültür, 13.500 rpm'de 10 dk. santrifüj

edilerek süpernatant döküldü. Kalan pellet 250 µL resüspanسیون solüsyonunda çözöldü. Örnekler, 1,5 mL'lik ependorf tüplerine alındı ve üzerlerine 250 µL lizis solüsyonu ilave edildi. Tüpler, örnek şeffaf ve sümüksü bir kıvama gelene kadar nazıkçe 6-8 kez alt üst edildi. Bu aşamadan sonra 350 µL nötralizasyon solüsyonu eklendi ve tüpler, örneğın bulutumsu bir hale gelmesi için 6-8 kez alt üst edildi. Tüpler, 13.500 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Süpernatant, GeneJET™ kolona transfer edildi 13.500 rpm'de 1 dk. santrifüj edildi. Kolondan süzülen alt kısım atıldı ve kolona 500 µL yıkama solüsyonu eklenerek 13.500 rpm'de 5 dk. santrifüj edildi. Yıkama işlemin bir kez daha tekrarlandı ve kolondaki etanol kalıntılarının uzaklaşması için kolon boş olarak tekrar santrifüj edildi. Son olarak, kolon yeni ependorfa alındı ve üzerine 50 µL dH₂O eklenerek 5 dk. oda sıcaklığında bekletildi. Kolon, 13.500 rpm'de 2 dk. Santrifüjlenerk elüsyon alındı. İzole edilen plazmit DNA miktarı belirlendikten sonra örnekler -20 °C'de saklandı.

3.2.2.7 Büyük Ölçekli Plazmit İzolasyonu

Plazmit izolasyonu için -80 °C'deki gliserol stoğundan ilgili antibiyotiğı içeren LB agara tek koloni ekimi yapıldı ve bir gece (16 sa.) boyunca 37 °C'de inkübasyona bırakıldı. Ardından, LB besiyerine (20 mL) tek koloniden ekim yapılarak gece boyu 37 °C'deki çalkalamalı etüvde inkübe edilerek ön kültür hazırlandı. 5 mL ön kültür seçici antibiyotiğı içeren 100 mL LB besiyerine ekildi ve bir gece (16 sa.) 37 °C'deki çalkalamalı etüvde inkübasyona tabi tutuldu. Hazırlanan son kültürden plazmit izolasyonu, Midi-NucleoBond Xtra™ kitinin önerdiği protokole uygun olarak yapıldı. İlk olarak 100 mL'lik son kültür +4 °C'de 5.000 g'de 10 dk. santrifüj edilerek süpernatant döküldü. Kalan pellet, 8 mL RNaz A içeren RES tamponunda çözölerek yeniden süspanse hale getirildi. Liziz aşaması için hücre süspanسیونunun üzerine 8 mL LYS tamponu eklendi ve tüpler 6-8 kez ters düz edilerek 5 dk. oda sıcaklığında bekletildi ve lizat karışımına 8 mL NEU nötralizasyon tamponu eklenip tüpler tekrar ters düz edilerek örneğın renksiz hale gelmesi sağlandı. Daha sonra örnek, 5.000 g'de 10 dk. santrifüj edildi. Bu sırada kitin kolonu 50 mL'lik falkona yerleştirilip kolona 12 mL EQU tamponu eklenerek yerçekimine karşı akış ile dengeleme işlemin gerçekleştirildi. Santrifüj edilmiş örneğın süpernatantı, bu kolona eklenerek yerçekimine karşı akması sağlandı. Örneğın akışı tamamlandıktan sonra kolona 5 mL EQU tamponu eklenerek birinci yıkama işlemin gerçekleştirildi. Kolonun akışı bittiğinde kolon filtresi çıkarıldı ve 8 mL WASH tamponu kolona eklenerek yerçekimine karşı akması beklenildi. Kolon, 50 mL'lik steril falkona alındı ve 5 mL ELU tamponu eklenerek yerçekimine karşı akış ile elüsyon yapıldı. Elde edilen elüata oda sıcaklığındaki 3,5 mL %99,99'luk izopropanol eklenerek

vorteks yapıldı. Elüat, 4500 g'de 15 dk. süreyle santrifüj edilerek süpernatant uzaklaştırıldı. Ardından kalan pellet, oda sıcaklığındaki 2 mL %70'lik etanol eklenerek yıkandı. Yıkama işlemi sonrasında 10.000 g'de 5 dk. santrifüj edilerek etanol dikkatle uzaklaştırıldı. Son olarak, pellet oda sıcaklığında etanolün buharlaşması için kurumaya bırakıldı ve ardından 400 µL dH₂O eklenerek dikkatle çözüldü. İzole edilen plazmit DNA miktarı belirlendikten sonra örnekler -20 °C'de saklandı.

3.2.3 DNA Çalışmaları ile İlgili Metotlar

3.2.3.1 DNA Miktar Tayini

İzole edilen DNA'nın miktarını ve saflığını belirlemek amacıyla, DNA örneklerinden 2 µL'lik örnekler alındı. Ayrıca, kör ölçüm için 2 µL dH₂O da µDrop™ plakaya eklendi. Spektrofotometrik ölçümler, 260-280 nm dalga boylarındaki absorbans değerleri üzerinden gerçekleştirildi. Elde edilen absorbans değerleri kullanılarak DNA miktarı ve saflığı aşağıdaki formül yardımıyla hesaplandı.

$$\text{DNA miktarı (ng/µL)} = A_{260} \times 50 \text{ ng/µL} \times (10 \text{ mm} / 0,49 \text{ mm})$$
$$\text{Saflık} = A_{260} / A_{280}$$

Şekil 3.5: DNA miktar ve saflık hesabı.

3.2.3.2 Primer Tasarımı

Tez çalışmasında kullanılan primerlerin tasarımı aşamasında, www.ncbi.nlm.nih.gov, www.idtdna.com ve www.restrictionmapper.org adreslerinden faydalanıldı. Primerlerin tasarım sürecinde saç tokası yapısının oluşmamasına, T_m değerlerinin birbirine yakın olmasına dikkat edildi. Tasarlanan primerlerin uygunluğunu değerlendirmek için NCBI Blast, T_m, saç tokası ve %GC analizleri yapıldı. Bu analizler, tasarlanan primerlerin hedeflenen genom bölgesiyle uyumluluğunu ve istenilen özelliklere sahip olup olmadığını kontrol etmek amacıyla gerçekleştirildi.

3.2.3.3 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

ADAMTS-8 geninin klonlama çalışmalarında hedef dizilerin amplifikasyonu için Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) oluşturuldu ve bu reaksiyon 50 µL son hacmine sahipti. Çoğaltılacak bölgeye özel olarak tasarlanmış ileri (forward) ve geri (reverse) primerler (*b.k.*

Tablo 3.4), 100 pmol/ μ L'ye sulandırılarak 1 μ L kullanıldı. Kalıp olarak TS-8[-413/+323] promotor parçası 1 μ L kullanıldı. Ayrıca, 10 mM dNTP karışımından 1 μ L ve 25 mM MgCl₂'den 2 μ L, Taq polimeraz tamponundan (10X) 5 μ L ve 5 U/ μ L Taq polimeraz enziminden 0,5 μ L eklenerek PCR reaksiyonu oluşturuldu. PCR döngü koşulları Tablo 3.5'te belirtildiği şekilde uygulandı. Elde edilen PCR ürünleri agaroz jele yüklendi görüntüledi.

Tablo 3.4: ADAMTS-8 promotor amplifikasyonunda kullanılan primer dizileri ve özellikleri.

Primer Adı	Nükleotit Dizisi (5'→3')	Ürün Büyüklüğü
ADAMTS-8 Geri	AAGCTTCATGGGGGCTGCGGCGGTG	
ADAMTS-8 UTR İleri	AAG CTT GGA AGC ACC GAG TGG GCT G	232 bç
ADAMTS-8 İleri	CTCGAGAAGTTGTAGTTGACACTTCA	549 bç

Tablo 3.5: PCR reaksiyonu çalışma koşulları.

Segment	Döngü Sayısı	Sıcaklık	Süre
1	1	94 °C	4 dk.
		94 °C	45sn.
2	35	58 °C	45sn.
		72 °C	45sn.
3	1	72 °C	10 dk.

3.2.3.4 DNA Agaroz Jel Elektrofözezi

DNA'yı jelde görselleştirmek amacıyla %1'lik bir agaroz jel hazırlandı. %2'lik jel hazırlamak için 100 mL 0,5X TBE tamponu için 2 g agaroz tartıldı tamponda çözülerek kaynatıldı. Agaroz jel, yaklaşık 45-50 °C olana kadar soğutuldu sonrasında son konsantrasyonu 0,5 μ g/mL olacak şekilde etidyum bromür (Et-Br) ilave edilerek homojen bir karışım elde edildi. Tarakları önceden yerleştirilmiş olan elektroföze kasetine jel döküldü. Jel polimerleştikten sonra taraklar çıkarıldı ve kaset, 0,5X TBE tamponuyla dolu olan elektroföze tankına yerleştirildi. İlk kuyucuğa 1 kb DNA büyüklük belirteci (marker) sonraki kuyulara ise 6X yükleme boyası ile karıştırılan örnekler yüklendi. Elektroföze 90 volt akımında 45 dk. boyunca yürütüldü. Jel, UV görüntüleme sisteminde görselleştirilerek fotograflandı. DNA agaroz jel elektrofözezi çalışmasında kullanılan çözeltiler Tablo 3.6'te belirtilmiştir.

Tablo 3.6: DNA agaroz jel elektroforezi için gerekli çözeltiler.

Çözelti	Bileşimi ve Hazırlanışı
5X TBE Tamponu	445 mM Tris Base-Borik asit ve 10 mM EDTA içeren (pH 8,3) çözelti hazırlandı. 54 g Tris Baz, 27,5 g Borik asit ~900 mL dH ₂ O'da çözüldü ve 20 mL 0,5 M EDTA (pH 8,0) eklendi. pH 8,3'e ayarlanıp hacim 1 L'ye tamamlandı. Otoklavlanıp kullanıldı.
Et-Br Stok Çözelti	Son derişimi 10 mg/mL olarak hazırlandı ve ışık almayan bir şişede +4 °C'de saklandı.
1 kb DNA Marker	1 µL (DNA ladder) : 1 µL (Yükleme boyası) : 4 µL (dH ₂ O) oranında karıştırılarak hazırlandı.

3.2.3.5 Agaroz Jelden DNA'nın Geri Kazanımı

Agaroz jel üzerindeki DNA bantları, UV ışığına maruz bırakılmadan ve jel hacmi minimize edilerek kesildi. Daha sonra, kesilen agaroz jel parçaları belirlenerek ependorf tüplere konuldu ve her 100 mg agaroz jel için 100 µL bağlama tamponu eklenerek 1:1 oranında bağlama tamponu ile işleme tabi tutuldu. Jel-tampon karışımı, 60 °C'deki ısıtıcı blokta yaklaşık 10 dk. boyunca inkübe edilerek jelin tamamen erimesi sağlandı. Bu erimiş jel solüsyonunun 800 µL'si, GeneJET™ saflaştırma kolonuna transfer edilerek kolon 1 dk. boyunca 13.500 rpm'de santrifüj edildi. Transferden sonra kolona 700 µL yıkama tamponu eklendi ve 1 dk. boyunca 13.500 rpm'de santrifüj edildi. Kolonun alt kısmı döküldü ve yıkama kalıntılarını uzaklaştırmak için kolon boş olarak 2 dk. santrifüj edildi. Son olarak, kolon yeni ependorfa alınarak üzerine 55 °C'de ısıtılmış 50 µL dH₂O eklendi ve 13.500 rpm'de 2 dk. boyunca santrifüj yapılarak elüsyon gerçekleştirildi. Elde edilen örnek -20 °C'de saklandı.

3.2.3.6 Restriksiyon Endonükleaz Enzimleri ile Kesim Reaksiyonu

Primer veya plazmitlerin restriksiyon endonükleaz enzimleri tarafından hedeflenen kesim bölgelerine yönelik kesim işlemleri gerçekleştirildi. Bu bağlamda, kullanılacak restriksiyon endonükleaz enzimleri için önerilen enzim miktarları, tampon, DNA ve son hacim göz önüne alınarak kesim reaksiyonları oluşturuldu. Kesim reaksiyonlarında kullanılan enzim miktarının reaksiyonun toplam hacminin %10'unu aşmamasına özen gösterildi. Kesim reaksiyonları, üreticinin önerdiği optimum sıcaklık ve inkübasyon sürelerine uygun olarak gerçekleştirildi. Kesim ürünleri agaroz jel elektroforezi kullanılarak ayrıştırıldı ve UV ışık altında görüntülendi.

3.2.3.7 Ligasyon

Araştırmalarda, klonlanacak DNA (insert) ile lineer vektörün birbirine bağlanması amacıyla ligasyon reaksiyonu gerçekleştirildi. Farklı son hacimlere göre hazırlanan ligasyon ortamları, Tablo 3.7'da belirtilen bileşenlerle oluşturulup +16 °C'de gece boyunca inkübasyona bırakıldı. Ligasyon ürünleri daha sonra kompetent hücrelere transforme edildi ve rekombinant koloniler tespit edildi.

Tablo 3.7: Ligasyon bileşenleri.

Bileşenler	Miktar	
	► Son hacim 20 µL	► Son hacim 30 µL
İnsert DNA	12 µL	19 µL
Lineer vektör	5 µL	7 µL
T4 DNA ligaz tampon (10X)	2 µL	3 µL
T4 DNA ligaz (5 U/µL)	1 µL	1 µL

3.2.4 Hücre Kültürü ile İlgili Teknikler

3.2.4.1 Besiyeri Serumunun Hazırlanması

Hücre kültüründe hücre büyümesini desteklemek amacıyla Fetal Calf Serum (FCS) kullanıldı. FCS, ticari olarak temin edilip soğuk zincirle taşınarak -20°C'de muhafaza edildi. Stok FCS, ilk kullanımdan önce +4°C'de bir gece boyunca çözülerek hazırlandı ve 56°C'de 1 saat boyunca ısıtarak inaktive edildi. İnaktive edilen FCS, steril 50 mL'lik falkonlara paylaştırılarak -20°C'de saklandı ve kullanıma hazır hale getirildi.

3.2.4.2 Hücre Kültürü Besiyerinin Hazırlanması

Hücre kültürü deneylerinde besiyeri olarak Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) kullanıldı. DMEM, ticari olarak temin edilip +4°C'de saklandı. DMEM'in içeriğinde L-Glutamin bulunmuyorsa, kullanımdan önce %1'lük L-Glutamin (200 mM steril stoktan) ilave edildi, böylece son konsantrasyonu yaklaşık 2 mM oldu. SW480 ve Saos-2 hücre hatları için kullanılan tam besiyerinde DMEM, hacimce %10 fetal calf serum (FCS) içerecek şekilde hazırlandı. Eğer besiyerine antibiyotik eklenecekse, 100X'lik penisilin-streptomisin solüsyonundan son konsantrasyonu 1X olacak şekilde eklenerek kullanıldı.

3.2.4.3 Hücre Kültüründe Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

Hücre kültürü çalışmaları sırasında kullanılan çözeltiler ve hazırlanma prosedürleri Tablo 3.8’de belirtilmiştir.

Tablo 3.8: Hücre kültüründe kullanılan çözeltiler ve hazırlama prosedürleri.

Çözelti	Bileşimi ve Hazırlanışı
PBS (1X) (Phosphate Buffered Salin)	PBS ticari olarak tablet formunda temin edildi ve önerildiği şekilde (bir tablet 100 mL dH ₂ O’da çözülerek) hazırlandı. Bu çözelti otoklavlanarak steril edildi ve +4°C’de saklandı.
Trypsin-EDTA (TE) Çözeltisi	1X PBS içinde %0,25 (w/v) tripsin ve 0,53 mM EDTA içeren çözelti hazırlandı. Bu çözelti 0,22 µm’lik filtreden geçirilerek steril edildi ve falkonlara paylaştırılarak -20 °C’de saklandı.
Trypan Mavi	1X PBS içinde %0,4 (w/v) trypan mavisi çözeltisi hazırlandı. 0,4 g trypan mavisi 80 mL PBS’de çözülerek yavaş yavaş kaynatıldı. Daha sonra oda sıcaklığına soğutulup PBS ile son hacmi 100 mL’ye tamamlandı.

3.2.4.4 Hücre Soyunun Başlatılması

Hücre kültürü çalışmalarında aseptik tekniklere önem verildi. İlk adım olarak, çalışmaya başlamadan önce gerekli malzemeler, %70’lik alkol ile silinerek laminar flow kabini içine alındı. Besiyeri bileşenleri ve diğer çözeltiler, kullanıma uygun hale getirilmek üzere 37 °C’deki su banyosunda ısıtıldı. Daha sonra, -80 °C’de cryovial tüplerde dondurulmuş halde muhafaza edilen hücre soylarından biri seçilip, 37 °C’deki su banyosunda hızlıca eritildi. Eriyen hücreler, içinde %10’luk FCS’li DMEM bulunan bir 15 mL’lik falkona transfer edildi. Hücre süspansiyonu, oda sıcaklığında 1000 rpm’de 5 dk. boyunca santrifüj edildi. Santrifüj işlemi sonrasında süpernatant uzaklaştırıldı ve geriye kalan hücre pelleti, 1-2 mL tam besiyerinde süspanse edildi. Hücre süspansiyonu, belirli boyutlardaki flasklara (25 cm² ya da 75 cm²) transfer edildi. Flasklara tam besiyeri eklenerek, flaskların son hacmi (25 cm² için 5 mL, 75 cm² için 15 mL) tamamlandı. Son olarak, etiketlenen flasklar, hücrelerin sağlıklı bir şekilde büyüüp çoğalması için 37 °C’deki %5 CO₂’li inkübatöre yerleştirildi. Bu adımların tamamı, aseptik koşullara uygun bir şekilde gerçekleştirildi.

3.2.4.5 Hücrelerin Pasajlanması

Hücre kültürü çalışmalarında titiz aseptik teknikler uygulandı. İncelenmeden önce, gerekli malzemeler laminar flow kabine alkol ile silindi. Besiyeri bileşenleri ve çözeltiler, kullanıma

uygun hale gelmeleri için 37 °C'deki su banyosunda ılıtıldı. -80 °C'de dondurulmuş hücre soylarından biri seçilip, 37 °C'deki su banyosunda eritildi. Eriyen hücreler, tam besiyeri içeren bir falkona aktarıldı ve santrifüjlenerek süpernatant uzaklaştırıldı. Geriye kalan hücre pelleti, tam besiyeri ile süspanse edildi. Hücre süspansiyonu, farklı flasklara eşit şekilde dağıtılarak tam besiyeri eklenip inkübasyon için hazırlandı. Hücrelerin büyüüp çoğalması için flasklar, %5 CO₂ içeren 37 °C'deki inkübatöre yerleştirildi. Ayrıca, incelenme aşamasında flask yüzeyinin %80-90 oranında kapladığı belirlendiğinde pasajlama işlemi uygulandı. Flask içindeki besiyeri uzaklaştırma, hücrelerin 2 kez 1X PBS ile yıkanması, Tripsin-EDTA eklenmesi, tripsin inaktivasyonu, santrifüj işlemi ve tekrar flasklara transfer işlemleri adım adım gerçekleştirilerek başarıyla tamamlandı.

3.2.4.6 Hücrelerin Dondurulması

İleriki aşamalarda kullanılmak üzere hücre soyları dondurularak muhafaza edildi. Bu süreç, sağlıklı bir şekilde büyüyen ve flask yüzeyini %80-90 oranında kaplayan hücrelerin besiyerinden ayrılmasıyla başladı. Hücreler, önce 2 kez 1X PBS ile yıkanarak temizlendi, ardından Tripsin-EDTA (TE) eklenerek yüzeyden ayrıştırıldı. Tripsin inaktivasyonu için tam besiyeri eklenerek hücre süspansiyonu 1.000 rpm'de 5 dk. süreyle santrifüj edildi. Elde edilen süpernatant atıldıktan sonra kalan hücre pelleti, 1 mL %10 (v/v) DMSO içeren FCS ile süspanse edildi. Son olarak, hücre süspansiyonu cryovial tüpe konularak -80 °C'de dondurularak uzun vadeli muhafaza sağlandı.

3.2.4.7 Hücre Canlılığının ve Sayısının Belirlenmesi

Hücre kültürü çalışmalarında tutarlı ve tekrarlanabilir sonuçlar elde etmek amacıyla hücrelerin canlılığı ve sayısı belirlendi. Bu amaçla, sağlıklı bir şekilde büyütülen hücrelerin oluşturduğu pellet, belirlenmiş bir hacimde tam besiyeri ile homojen bir şekilde süspanse edildi. Daha sonra, bu hücre süspansiyonundan alınan bir örnek, tripan mavisi ile boyanmış ve nazıkçe karıştırılarak homojen bir karışım elde edildi. Tripan mavisi ile boyanan hücreler, belirli bir süre oda sıcaklığında inkübe edildi. Inkübasyon sonrasında, hücre örneği Thoma lamına aktarıldı ve mikroskop altında incelendi. Bu inceleme sırasında, Thoma lamındaki canlı ve ölü hücreler sayıldı. Canlı hücreler, tripan mavisi içine almazken, ölü hücreler boyayı içine aldı. Mikroskop görüntüsünden elde edilen hücre sayıları kullanılarak mL başına düşen toplam hücre ve canlı hücre sayıları hesaplandı.

Total hücre sayısı (mL'deki) = Alandaki toplam hücre sayısı x 2 x 10⁴

Canlı hücre sayısı (mL'deki) = Alandaki canlı hücre sayısı x 2 x 10⁴

$$\text{Canlılık yüzdesi} = \frac{\text{Alandaki canlı hücre sayısı}}{\text{Alandaki total hücre sayısı}} \times 100$$

Şekil 3.6: Thoma lamı yardımıyla gerçekleştirilen hücre sayısı formülleri.

3.2.5 Transkripsiyonel Aktivitenin Belirlenmesi ile İlgili Metotlar

Bu çalışmada kullanılan SW480 ve Saos-2 hücre hattı, bir dizi pasaj işleminden geçirilerek büyütüldü ve canlı hücre sayısı mL başına belirlendi. Hücreler, 100 mm'lik kültür kabına, 7x10⁶ hücre/kültür kabı olacak şekilde dağıtıldı ve bir gece boyunca inkübasyona bırakıldı. Transfeksiyon öncesinde kullanılacak çözeltiler oda sıcaklığına getirildi ve çökeltme kontrol edildi. Çözelti A (~10 µg DNA ve 2,5 M CaCl₂) ve Çözelti B (2X HeBS) hazırlandı (*b.k.* Tablo 3.9). Çözelti A, Çözelti B'ye damla damla eklenerek DNA: Kalsiyum fosfat presipitasyon kompleksi oluşturuldu ve inkübasyon sonrasında hücrelere eklenerek 37 °C'deki %5 CO₂ içeren inkübatörde 8-16 saat inkübe edildi. İnkübasyonun ardından transfeksiyon ortamı uzaklaştırıldı, hücreler 2 kez 1X PBS ile yıkanarak flasklara tam besiyeri eklenip, 37 °C'deki %5 CO₂ içeren inkübatörde transfeksiyonun 72. saatinde kadar inkübasyona devam edildi. Geçici transfeksiyonun inkübasyon süresince hücrelere, devam edecek çalışmanın amacına bağlı olarak tripsinizasyon ile RNA pelletleri elde edildi ya da protein özütlerinin elde edilmesi için RIPA solüsyonu ile kazıma işlemi yapıldı.

Tablo 3.9: Kalsiyum fosfat presipitasyonunda kullanılan çözeltiler.

Çözelti	Bileşimi ve Hazırlanışı
2,5 M CaCl ₂	36,75 g CaCl ₂ (MW: 147,01) 100 mL dH ₂ O'da çözüldü. Çözelti 0,22 µm'lik filtreden geçirilerek steril edildi ve ependorf tüplere paylaştırılarak -20 °C'de saklandı.
2X HEPES-Buffered Saline (2X HeBS)	1,19 g HEPES (MW:238,3), 1,63 g NaCl (MW:58,44) ve 0,02 g Na ₂ HPO ₄ (MW:141,96) ~90 mL dH ₂ O'da çözüldü. pH 7,05'e ayarlanıp hacim 100 mL'ye tamamlandı. Bu çözelti 0,22 µm'lik filtreden geçirilerek steril edildi ve ependorf tüplere paylaştırılarak -20 °C'de saklandı.
- 50 mM HEPES - 280 mM NaCl - 1,5 mM Na ₂ HPO ₄ (pH 7,05-7,12)	

Tablo 3.10: Kalsiyum fosfat presipitasyonunda kullanılan çözelti bileşenleri.

Flask / Plate	Çözelti A			Çözelti B	Kültür Hacmi
	DNA	2,5 M CaCl ₂	dH ₂ O ile	2X HeBS	
96-well	~ 0,1 µg	0,45 µL	4,5 µL	4,5 µL	200 µL
24-well	~ 0,5 µg (0,3-0,7 µg)	2,25 µL	22,5 µL	22,5 µL	500 µL
12-well	~ 1 µg (0,5-1,2 µg)	4,5 µL	45 µL	45 µL	1 mL
6-well	~ 2 µg (1-3 µg)	9 µL	90 µL	90 µL	2 mL
35 mm	~ 2 µg (1-3 µg)	9 µL	90 µL	90 µL	2 mL
60 mm	~ 7,5 µg (2-10 µg)	27 µL	270 µL	270 µL	5 mL
100 mm	~ 15 µg (6-20 µg)	63 µL	630 µL	630 µL	10 mL
T25 flask	~ 10 µg (4-20 µg)	31,5 µL	315 µL	315 µL	5 mL
T75 flask	~ 20 µg (10-30 µg)	94,5 µL	945 µL	945 µL	15 mL

3.2.5.1 Salınan Sistem Lusiferaz Aktivitesinin Ölçülmesi

Salınan Sistem Lusiferaz Aktivitesinin ölçümü için “Ready-To-Glow Dual Secreted Luciferase Assay” (Clontech) kiti kullanıldı. 100 mm’lik hücre kültürü petrisine yapılan transfeksiyon sonrasında SW480 hücreleri 96 kuyucuklu plakaya bölünerek transfeksiyonun 24, 48 ve 72. saatlerinde hücre kültürü medyumununun 100 µL’si ependorflara aktarıldı. Her bir ependorftan 10’ar µL alınarak 384 kuyucuktan oluşan plakaya konuldu. Kit içerisinde bulunan 10X Lusiferaz Substratı, Reaksiyon Tamponu ile 1X’e seyreltildi. Meydana gelen 1X’lik Lusiferaz Substratı ve Reaksiyon Tamponu karışımından 1 µL alınarak önceden içine 10 µL transfeksiyon medyası eklenmiş kuyucuklara eklenerek, luminometre kullanılarak hızlı bir şekilde sonuç elde edildi.

3.2.5.2 SEAP (Sekrete Edilen Alkalın Fosfataz) Etkinliğinin Belirlenmesi

Alkalın Fosfataz Aktivitesi ölçümlerinde "Ready-To-Glow Dual Secreted Luciferase Assay" (Clontech) kiti kullanıldı. Transfeksiyonun 48 ve 72 saati sonunda, medyundan 5 µL alınarak 384 kuyucuklu plakaya yerleştirildi. Kit içerisindeki 5X dilüsyon tamponu 1X’e sulandırılarak her kuyucuğa 15 µL eklenerek işlem tamamlandı.

Plakadaki örneklerin reaksiyonu için alüminyum folyo ile kaplanmış plaka, 65°C’deki su banyosunda 30 dk. boyunca ısıtıldı. Daha sonra, işlem görmüş plaka buz üzerinde bir süre bekletildi ve oda sıcaklığına getirildi. Plakaya, SEAP substratından 20’şer µL eklenerek, 30 dk. boyunca bu özel çözelti ile inkübasyona bırakıldı. Bu süre zarfında, örnekte belirli bir

enzimatik reaksiyon meydana geldi. İnkübasyonun tamamlanmasının ardından, elde edilen sonuçlar luminometre kullanılarak ölçüldü.

3.2.6 RNA ile İlgili Metotlar

RNA çalışmalarında, ortam ve malzemelerdeki RNaz'ların inaktivasyonu için %0,1 DEPC'li su kullanıldı. Ayrıca çalışmada kullanılan tamponlar, %0,1 DEPC'li su ile hazırlandı. %0,1 DEPC'li su hazırlamak için 1 mL dietil pirokarbonat, son hacmi 1 L olacak şekilde dH₂O içine eklenerek iyice karıştırıldı. Bu karışım, 37 °C'de 12 saat inkübe edildikten sonra 121 °C'de 20 dk. otoklavlanarak kullanıma hazır hale getirildi.

3.2.6.1 RNA İzolasyonu

-80°C'de muhafaza edilen hücre pelletleri, buz içerisine alınarak çözüldü. Deney başlamadan önce bençler, pipet kutuları ve otomatik pipetler önce %70'lük alkol ile temizlendi, ardından %0,1'lik DEPC'li su ile silinerek steril hale getirildi. Sterilizasyon işlemi tamamlandıktan sonra, total RNA'nın izolasyonu Innuprep RNA 2.0 kiti kullanılarak gerçekleştirildi. Bu prosedür, genetik materyalin etkili bir şekilde elde edilmesini ve gelecekteki kullanımlar için korunmasını sağlamak üzere kitin önerileri doğrultusunda uygulandı. Elde edilen RNA örnekleri, -80°C'de saklanmak üzere kaldırıldı.

3.2.6.2 RNA Miktar Tayini

İzole edilen RNA'nın miktarını ve saflığını belirlemek amacıyla spektrofotometrik ölçümler gerçekleştirildi. Bu süreçte, RNA örneklerinden 2'şer µL alındı ve kör olarak 2 µL dH₂O, µDropTM plakaya konuldu ve 260 nm ve 280 nm dalga boylarında ölçüm alındı. Ölçüm sonuçlarına göre elde edilen absorbans değerleri kullanılarak RNA miktarı ve saflığı belirlendi. Belirtilen veriler, aşağıdaki formüller kullanılarak hesaplandı.

$$\text{RNA miktarı (ng/}\mu\text{L)} = A_{260} \times 40 \text{ ng/}\mu\text{L} \times (10 \text{ mm}/0,49 \text{ mm})$$
$$\text{Saflık} = A_{260} / A_{280}$$

Şekil 3.7: RNA miktar ve saflık hesabı.

3.2.6.3 Formaldehit Jel Elektroforezi

RNA'ların kalitesini değerlendirmek için FA agaroz jel elektroforezi yapıldı. Ancak, RNA örnekleri RNaz'ların potansiyel degradasyonuna karşı hassas olduğundan, malzeme ve ortamın RNaz içermemesi için özel önlemler alındı. Cam malzemeler, hacimce %0,1 DEPC'li suda gece boyu bekletildikten sonra otoklavlandı. Tank ve aparatlar, %0,5 (w/v) SDS solüsyonunda yıkayıp %0,1 DEPC'li suyla durulandıktan sonra saf etanolden geçirilip, etüvde kurumaya bırakıldı. Çalışmada kullanılan çözeltiler Tablo 3.11'de belirtilmiştir.

Tablo 3.11: Formaldehit jel elektroforezinde kullanılan çözeltiler.

Çözelti	Bileşimi ve Hazırlanışı
10X FA Tamponu - 0,2 M MOPS - 0,05 NaAc - 0,01 M EDTA (pH 7,0)	41,9 g MOPS (MW:209,26), 6,8 g NaAc (MW: 136,08) ve 20 mL 0,5 M'lık EDTA (pH 8,0) çözeltisi ~900 mL %0,1'lik DEPC'li suda çözüldü. pH'ı 7,0'ye ayarlanıp son hacim DEPC'li suyla 1 L'ye tamamlandı. Bu çözelti ışık almayacak şekilde oda sıcaklığında saklandı.
1X FA Tamponu (0,25 M FA içeren)	100 mL 10X FA tamponu ve 20 mL %37'lik (12,3 M) FA karıştırıldı ve son hacim DEPC'li suyla 1 L'ye tamamlandı.

%1'lik formaldehit içeren agaroz jel hazırlamak için 50 mL son hacim için 0,5 g agaroz, 5 mL 10X FA tamponunda çözülerek %0,1'lik DEPC'li suyla tamamlandı. Elde edilen karışım mikrodalgada kaynatıldı, ardından 50 °C'ye soğutuldu. %37'lik (12,3 M) formaldehit, 900 µL eklenerek karışım homojen bir şekilde karıştırıldı. Jele son konsantrasyonu 0,5 µg/mL olacak şekilde etidyum bromür (Et-Br) eklendi. Polimerleşme tamamlandıktan sonra, tarakları önceden yerleştirilmiş olan elektroforez kasetine jel döküldü. Polimerleşme tamamlandıktan sonra taraklar çıkarıldı ve 0,25 M formaldehit içeren 1X FA tamponu içeren tanka kaset yerleştirildi. Örnekler, 2X yükleme boyasıyla karıştırıldı ve 70 °C'de 10 dk. bekletilerek ısı ile denatüre edildi. Denatüre edilmiş örnekler, buz üzerinde soğutulduktan sonra jelle yüklendi ve 80 voltta 45 dk. yürütüldü. Jel, UV görüntüleme sisteminde görüntülendi.

3.2.6.4 RT-PCR Reaksiyonu

RT-PCR tekniği kullanılarak, izole edilen RNA örneklerine iki aşamalı bir işlem uygulandı. İlk aşamada, RNA'dan cDNA sentezi Reverse Transkripsiyon (RT) reaksiyonu ile gerçekleştirildi. İkinci aşamada ise, Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) yöntemi

kullanılarak ilk aşamada sentezlenen cDNA ve gen özgü primerler ile ilgili gen bölgesinin amplifikasyonu gerçekleştirildi.

3.2.6.5 RT Reaksiyonu ile cDNA Sentezi

RNA örneklerinin miktarı belirlendikten ve kalite kontrolü yapıldıktan sonra, her bir örnekten 1 µg kalıp RNA kullanılarak cDNA sentezi için Reverse Transkripsiyon (RT) reaksiyonu gerçekleştirildi. RT reaksiyonunda kullanılan bileşenler ve yapılan işlemler Tablo 3.12'te detaylı olarak gösterilmiştir. Hazırlanan cDNA'lar -20 °C'de muhafaza edildi.

Tablo 3.12: RT reaksiyon bileşenleri ve koşulları.

Bileşenler	Miktar
Kalıp-RNA	- (1 µg)
Oligo-dT-primer (0,5 µg/µL)	1 µL
dH ₂ O	Son hacim 12,5 µL
► Beş dakika 65 °C'de inkübasyon yapıldı.	
▪ <i>İnkübasyon sonunda sırasıyla aşağıdaki bileşenler eklendi.</i>	
Reaksiyon tampon (5X)	4 µL
RiboLock RNaz inhibitor (20 U/µL)	0,5 µL
dNTP karışım (10 mM)	2 µL
Reverse transkriptaz (200 U/µL)	1 µL
Toplam hacim	= 20 µL
▪ <i>Bileşenler nazikçe karıştırıldı ve tüplere kısa süreli santrifüj yapıldı.</i>	
► 42 °C'de 60 dk. ve 72 °C'de 10 dk. inkübasyon yapıldı.	

3.2.6.6 qRT-PCR

Çalışma kapsamında genlerin mRNA düzeyindeki ifadelerini kantitatif olarak belirlemek amacıyla real-time PCR analizi yapıldı. Sentezlenen cDNA'ların her birine, en az 3 tekrar içeren bir şekilde ADAMTS-8, SP1 ve Hβ-2-M geni ekspresyon primerleri kullanılarak real-time PCR gerçekleştirildi. Bu amaçla, uygun bileşenlerle hazırlanan örnekler, 96 kuyucuklu plakaya yerleştirildi. Daha sonra plakanın üstü, saydam jelatin ile sıkıca kapatıldı. Real-time PCR analizi, belirtilen döngü koşulları altında Light Cycler® 480 (Roche) cihazı kullanılarak gerçekleştirildi.

Tablo 3.13: qRT-PCR bileşenleri.

Bileşenler	Miktar (µL)
cDNA	1
RealQ Plus 2X Master Mix Green	6,25
İleri primer (10 pmol/µL)	0,5
Geri primer (10 pmol/µL)	0,5
dH ₂ O	4,25
Toplam	= 12,5 µL

Tablo 3.14: qRT-PCR reaksiyon koşulları.

Segment	Döngü Sayısı	Sıcaklık	Süre
Ön inkübasyon	1	95 °C	10 dk.
Amplifikasyon	40	95 °C	30 sn.
		55 °C	30 sn.
		72 °C	30 sn.
Erime Eğrisi	1	95 °C	5 sn.
		65 °C	1 dk.
Soğutma	1	40°C	30 sn.

Elde edilen veriler, Livak yöntemine göre detaylı bir analize tabi tutuldu. ADAMTS-8 geni ve normalizasyon için H β -2-M geni üzerinde en az üç tekrarlı çalışma gerçekleştirildi ve bu çalışmaların Cycle threshold (Ct) değerlerinin ortalamaları hesaplandı. H β -2-M geninin Ct ortalaması, ADAMTS-8 geninin Ct ortalamasından çıkarıldı ve elde edilen sonuç, 2'nin üssü alındı. Kontrol grupları, çalışma boyunca kullanılan gruplar arasında kendine bölünerek "1" birimi olarak kabul edildi. Deney grupları ise kontrol grubu sonuçlarına bölünerek, 1'in katları şeklinde değerlendirildi. Bu elde edilen sonuçlar, GraphPad programında grafikleştirilip detaylı bir şekilde analiz edildi. Ayrıca, SP1 ekspresyon primerleri kullanılarak gerçekleştirilen overekspresyon çalışmaları, real-time PCR analizi ile doğrulandı.

Tablo 3.15: Ekspresyon çalışmalarında kullanılan primerler.

Primer Adı	Nükleotit Dizisi (5'→3')
Hβ-2-M ileri	TTTCTGGCCTGGAGGCTATC
Hβ-2-M geri	CATGTCTCGATCCCACTTAACT
ADAMTS-8 ileri	GATGCGTCCATGGCTGCCTTCTA
ADAMTS-8 geri	TGCCAGTTGCAGAAGTTACGCAG
SP1 ileri	AAACATATCAAAGACCCACCAGAAT
SP1 geri	ATATTGGTGGTAATAAGGGCTGAA

3.2.7 Protein ile İlgili Teknikler

3.2.7.1 Western Blot Yöntemi ile Protein Analizi

ADAMTS-8 ve SP1 protein ifadesini değerlendirmek için Western blot yöntemi kullanıldı. Çalışmada protein analizi için kullanılan çözeltilerin ve bileşenlerin spesifik ayrıntıları Tablo 3.16.'de sunulmaktadır.

Tablo 3.16: Western blot analizinde kullanılan çözeltiler ve hazırlama prosedürü.

Çözelti	Bileşimi - Hazırlanışı
RIPA Tamponu	Son konsantrasyonunda; 10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 140 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, %0,1 (w/v) sodyum deoksikolat, %0,1 (w/v) SDS ve %1 (v/v) Triton X-100 bulunan çözelti hazırlanır. Son hacmine göre proteaz inhibitörü eklendi ve 15 mL'lik falkonlara paylaştırılarak -20 °C'de saklandı.
Bradford Reaktifi	0,1 g Coomassie brilliant blue (G-250), 50 mL %95'lik etil alkol içinde çözüldü ve 100 mL %85 (w/v) fosforik asit eklenerek karıştırıldı. Son hacim dH ₂ O ile 1 litreye tamamlandı. Çözelti iki kez filtre kağıdından geçirilip ışık almayan bir şişede +4°C'de saklandı.
Ayırma (Alt) Jel Tamponu	% 0,4 (w/v) SDS içeren 1,5 M Tris-base (pH 8,8): 18,17 g Tris-base (MW:121,14) ve 0,4 g SDS ~80 mL dH ₂ O'da çözüldü. pH 8,8'e ayarlanıp hacim 100 mL tamamlandı. +4°C'de saklandı.
Yığma (Üst) Jel Tamponu	% 0,4 (w/v) SDS içeren 0,5 M Tris-base (pH 6,8): 6 g Tris-base (MW:121,14) ve 0,4 g SDS ~80 mL dH ₂ O'da çözüldü. pH 6,8'e ayarlanıp hacim 100 mL tamamlandı. +4°C'de saklandı.
Yürütme Stok Tamponu (10X)	0,25 M Tris-base ve 1,92 M glisin içeren çözelti (pH 8,3): 30,3 g Tris-base (MW:121,14) ve 144,4 g glisin (MW:75,07) ~700 mL dH ₂ O'da çözüldü. pH 8,3'e ayarlanıp son hacmi 1 L'ye tamamlandı.
%10 (w/v) SDS Çözeltisi	10 g SDS (Sodyum dodesil sülfat) dH ₂ O'da çözülerek son hacmi 100 mL'ye tamamlandı. Oda sıcaklığında saklandı.
Yürütme Tamponu (1X)	100 mL 10X yürütme stok tamponu ve 10 mL %10 (w/v) SDS çözeltisi karıştırılıp hacim 1 L'ye tamamlandı. Son konsantrasyon: 25 mM Tris-base, 92 mM glisin ve %0,1 SDS (w/v) (pH 8,3).
Transfer Tamponu	100 mL 10X yürütme stok tamponu, 200 mL metanol ile karıştırılıp son hacim dH ₂ O ile 1 L'ye tamamlandı. Çözeltiye 500 µL %10 (w/v) SDS eklendi ve -20 °C'de soğutularak kullanıldı.
10X Stok TBS (Tris-Buffered Saline)	0,2 M Tris-base ve 1,5 M NaCl içeren çözelti (pH 7,5): 24,22 g Tris-base (MW:121,14) ve 87,66 g NaCl (MW:58,44) ~ 700 mL dH ₂ O'da çözüldü. pH 7,5'e ayarlanıp son hacim 1 L'ye tamamlandı. +4°C'de saklandı.
1X TBST Çözeltisi	1X TBS'de %0,1 (v/v) Tween-20 içeren çözelti: 100 mL 10X stok TBS ile 1 mL Tween-20 karıştırdı ve son hacim dH ₂ O ile 1 L'ye tamamlandı.
Bloklama Tamponu	%5 (w/v) yağsız süt tozu içeren 1X TBST: 50 mL 1X TBST çözeltisi içinde 2,5 g yağsız süt tozu çözünerek hazırlandı ve +4°C'de saklandı.
Jel Boyama Çözeltisi	0,1 g Coomassie brilliant blue R-250, 50 mL metanolde çözüldü ve 10 mL asetik asit eklenerek karıştırıldı. Son hacmi dH ₂ O ile 100 mL'ye tamamlandı.
Jelden Boya Giderici Çözelti	Hacimce; %5 metanol, %7,5 asetik asit ve %87,5 dH ₂ O ile hazırlandı.
Ponceau Boyası	0,1 g ponceau-S, 100 mL % 5 (v/v) asetik asit çözeltisinde çözüldü.

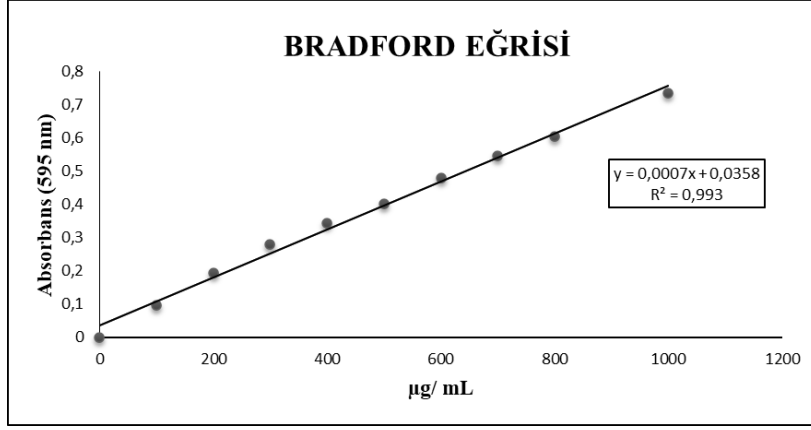
3.2.7.2 Hücresel Proteinlerin Ekstraksiyonu

Protein degradasyonunu önlemek amacıyla tüm adımlar ya buz üzerinde ya da +4 °C'de gerçekleştirilmiştir. Bu süreçte, -20 °C'de saklanan RIPA tamponu +4 °C'de çözülerek kullanılmıştır. 100 mm'lik hücre petri kaplarında bulunan over ekspre edilmiş hücreler medyumdan uzaklaştırıldı. Ardından soğuk PBS ile 2 defa yıkandı. RIPA tamponu, kullanılacak hücre sayısına göre optimize edilmiş ve hücre kazıyıcısı yardımıyla petri yüzeyinden kazınarak soğuk ependorf tüpüne alınmıştır. Hücreler pipetajla süspansiyon haline getirilmiştir.

Daha sonra, tüpler ultrasonik su banyosunda üç defa 2 dk. boyunca sonike edilip 2 dk. buza alınarak lizise devam edilmiştir. Hücre lizati, horizontal çalkalayıcıda buz üzerinde 15 dk. boyunca inkübe edildikten sonra 13.500 rpm'de (+4 °C'de) 15 dk. süreyle santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonunda, süpernatanttan uzaklaştırılmış ve örnekteki protein miktarı bradford yöntemi kullanarak belirlenmiştir. Elde edilen örnekler -80 °C'de saklanmıştır.

3.2.7.3 Proteinlerin Kantitatif Belirlenmesi

Örneklerdeki protein miktarı, Bradford yöntemiyle nicel olarak belirlendi. Bradford reaktifi ve Şekil 3.8'de belirtilen farklı konsantrasyonlarda hazırlanmış BSA çözeltileri kullanılarak bir standart eğri hazırlandı. Bu kapsamda, her biri en az 3 tekrarlı olacak şekilde 100-1000 µg/mL aralığında olan BSA standart çözeltileri, 96 kuyucuklu bir plakaya 5 µL olarak eklenerek standart eğri oluşturuldu. Aynı plakaya kör olarak 5 µL dH₂O da eklendi. Ardından, her bir kuyucuğa 250 µL Bradford reaktifi eklenip, 10 dk. boyunca karanlık bir ortamda inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında, spektrofotometrede 595 nm dalga boyunda absorbans ölçüldü. Standart BSA çözeltilerindeki protein miktarına karşılık gelen absorbans değerlerinden yola çıkarak bir standart eğri oluşturuldu (Şekil 3.8). Standart eğri üzerinden örneklerin absorbansına karşılık gelen protein miktarı belirlendi. Bu yöntem, örneklerdeki protein konsantrasyonlarını doğru bir şekilde hesaplamak için kullanıldı.



Şekil 3.8: Bradford eğrisi ve formülü.

3.2.7.4 SDS-PAGE

Hücre ekstraktlarından elde edilen proteinleri moleküler büyüklüklerine göre sınıflandırmak amacıyla Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE) kullanıldı. SDS-PAGE yöntemi, negatif yüklü proteinlerin poliakrilamid jel matrisinde elektrik alanı etkisiyle hareket etmelerine dayanmaktadır. Bu çerçevede, daha önce Tablo 3.16'da detaylandırılan çözeltiler önceden hazırlandı. Bunun yanı sıra, çalışma için gereken araçlar ve cam malzemeler titizlikle dH₂O ile temizlenip %70'lik etanol ile dezenfekte edildi. Cam levhalar kurulandıktan sonra, jel döküm standına yerleştirildi ve jel dökme işlemine geçiş yapmak üzere hazır hale getirildi. Bu noktada, deneyin güvenilirliğini sağlamak için özenle detaylı bir hazırlık yapıldı ve SDS-PAGE uygulaması eksiksiz bir şekilde gerçekleştirildi.

SDS-PAGE deneyi için değişen oranlara sahip jeller oluşturuldu; bu jeller, %10'luk ayırma jelini ve %4'lük yığma jeli içeriyordu ve kesintili bir şekilde döküldü. Başlangıçta, Tablo 3.16'da tanımlanan %10'luk ayırma jeli (alt jel) malzemeleri kullanılarak, cam levhalar arasına hava kabarcığı oluşturmada üst bölüme 2-3 cm boşluk kalacak şekilde döküldü. Ardından, jel yüzeyinin düzenli oluşumu için %90'luk izopropanol (ya da dH₂O) eklenerek süreç tamamlandı. Jel, 30 dk. boyunca polimerizasyona bırakıldıktan sonra, yüzeyindeki izopropanol özenle döküldü ve ardından kurutma kağıdı kullanılarak alkol kalıntısından kurtarıldı.

Sonrasında, Tablo 3.17'da tanımlanan %4'lük yığma jeli (üst jel) malzemeleri kullanılarak, yığma jeli alttaki jelin üstüne döküldü. Ardından, cam levhaların üst bölgesine kuyu oluşturacak tarak özenle yerleştirildi. Yığma jeli, polimerizasyon için 30 dk. bekletildikten sonra tarak dikkatlice çıkarıldı ve kuyular 1X yürütme tamponu ile temizlendi. Cam levhalar daha sonra jel kasetine yerleştirildi, elektroforez tankına konuldu ve levhalar arası boşluk 1X yürütme tamponu ile dolduruldu.

Tablo 3.17: SDS-PAGE jellerinin bileşenleri ve hazırlanma oranları.

Bileşenler	%10 Ayırma Jeli (2 jel için miktarlar)	%4 Yığma Jeli (2 jel için miktarlar)
Ayırma (Alt) Jel Tamponu	2,5 mL	-
Yığma (Üst) Jel Tamponu	-	2,5 mL
Akrilamid/Bisakrilamid (%40 37.5/1)	2,5 mL	625 µL
dH ₂ O	5 mL	3,05 mL
% 10 (w/v) APS	100 µL	50 µL
TEMED	10 µL	5 µL

Protein miktarı belirlenmiş olan örnekler, jel üzerine yüklemek üzere hazırlandı. Bu bağlamda, en az miktarı içeren örneğin (20 µL'deki miktar referans alınarak) diğer örnekler de aynı miktarlarda olacak şekilde ependorf tüplere yerleştirildi. Her bir örneğin üzerine, 5 µL yükleme boyası eklendi. Bu yükleme boyası, ticari 4X Laemmli örnek tamponundan 90 µL ve β-merkaptoetanol'den 10 µL karıştırılarak hazırlandı. Örneklerin son hacmi 25 µL olacak şekilde yığma jel tamponu eklendi. Örneklerdeki proteinler, denatürasyonu sağlamak amacıyla 95 °C'de beş dk. boyunca bekletildi. Jeldeki ilk kuyuya, 5 µL büyüklüğündeki belirteç (PageRuler™ Prestained Protein Ladder) eklendi. Diğer kuyulara, önceden boyanmış ve denatüre edilmiş protein örnekleri yüklendi. Elektroforez tankının alt bölümüne, kullanılan jel sayısına göre uygun miktarda 1X yürütme tamponu eklendi. Jeldeki örnekler 80 Volttta 1.5-2 saat süresince yürütüldü (mavi örnek çizgisi ayırma jeli tabanına 1 cm kadar yaklaşıncaya kadar).

3.2.7.5 SDS Jeldeki Proteinlerin Membrana Blotlanması

Proteinlerin SDS jelinden transferi için Bio-Rad Trans Blot sistemi ve PVDF (Millipore™) membranı tercih edildi. SDS-PAGE işlemi tamamlandıktan sonra, cam levhalar arasındaki ayırma jeli çıkartıldı ve yığma jeli kesilerek uzaklaştırıldı. Geriye kalan ayırma jeli, stabilize etmek için 5 dk. boyunca oda sıcaklığında bekletildiği soğuk transfer tamponu içine aktarıldı. Ayrıca, transfer esnasında kullanılan aletler, kağıt (Whatman 3 MM) ve süngerler de transfer sıvısında bekletildi. Ayırma jeliyle aynı boyutta (8,5 x 5,2 cm) kesilmiş PVDF membran, 1 dk. süreyle metanolde bekletilip aktive edildi ve daha sonra soğuk transfer sıvısına alındı. Sonrasında, sandwich hazırlama sürecine geçildi. Bu bağlamda, transfer kaseti arasına (-) kutuptan başlayarak (siyah tabanın üstüne) sırasıyla sünger-kağıt-jel-membran-kağıt-sünger şeklinde yerleştirildi. Süreçte hava kabarcığı oluşmamasına özen gösterilerek, silindirik aparatla katmanların üzerinden geçildi. Oluşturulan sandwich transfer kasetine dikkatlice sıkıştırıldıktan sonra, soğuk transfer tamponu ile doldurulmuş tanka yerleştirildi ve +4 °C'de 1 gece (16 saat) boyunca 90 mA'de elektroforetik transfer yapıldı.

3.2.7.6 Proteinlere Antikor Uygulanması (İmmünoblotlama)

Proteinlerin transfer olduğu PVDF membran üzerindeki non-spesifik bağlanmaları engellemek amacıyla bloklama yapıldı. Bu kapsamda, membran, oda sıcaklığında 1 saat boyunca 20 mL bloklama tamponu içinde horizontal çalkalayıcıda inkübe edildi (Tablo 3.15). Daha sonra bloklama tamponu uzaklaştırıldı ve membran, üç kez 5 dk'lık aralıklarla 1X TBST ile yıkandı (Tablo 3.15'ye bakınız). Membranın ADAMTS-8 ve β -aktin proteinlerini içeren bölgeleri ayrı ayrı primer antikorlarla (bloklama tamponunda seyreltilen 1/250 ADAMTS-8 antikor ve 1/5000 β -aktin antikor) +4 °C'de bir gece boyunca döner hareketli çalkalayıcıda inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında membran, üç kez 5 dk'lık aralıklarla 1X TBST ile yıkandı ve sekonder antikorla (1/10000 mouse β -aktin antikor) oda sıcaklığında 1 saat boyunca döner hareketli çalkalayıcıda inkübe edildi. Membran en son olarak üç kez 5 dk'lık aralıklarla 1X TBST ile yıkandı ve görüntüleme işlemine geçildi.

3.2.7.7 Görüntüleme ve Analizi

Spesifik antikorlarla işaretlenmiş olan proteini görselleştirmek için (Pierce™) ECL Western blot substratı kullanıldı. Üreticinin önerdiği şekilde hazırlanan ECL substrat ile membran işlem gördü ve 1 dk. boyunca karanlık bir ortamda inkübe edildi. Daha sonra, membran, UVP BioSpectrum™ görüntüleme sistemi üzerinde görüntülendi ve fotoğraflandı. Membran fotoğraflarındaki protein bantları, ImageJ programında densitometrik olarak analiz edildi.

Deney ve kontrol gruplarında normalizasyon amacıyla β -aktin proteini de değerlendirildi. ADAMTS-8 ve β -aktin analiz sonuçları oranlanarak GraphPad programında grafikleştirildi.

3.2.7.8 İstatistiksel Analiz

Tekrarlanan deney verileri, GraphPad (v9.4.1.681) yazılımında gerçekleştirilen one-way ANOVA testi ile analiz edildi ve p değeri 0,05'in altında olan sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Karşılaştırılan gruplar, grafik üzerinde asteriks (*) ile işaretlendi. Eğer $p < 0,05$ ise (*) ile, $p < 0,01$ ise (**) ve $p < 0,001$ ise (***) ile gösterildi.

3.2.8 Kromatin İmmuno Presipitasyonu (ChIP)

ChIP, temel olarak bir proteinin genomdaki bağlama bölgelerini belirlemek için yaygın olarak kullanılan bir moleküler biyoloji tekniğidir. Bu süreç aşağıdaki adımları içermektedir:

1. SW480 hücrelerinin çapraz bağlanma için formaldehit ile tespiti: Hücreler, formaldehit gibi bir çapraz bağlayıcı kullanılarak sabitlenir. Bu adım, protein-DNA etkileşimlerini stabilize ederek hücrelerin orijinal durumunu koruma amacını taşır.
2. Kromatinin hazırlanması: Sabitlenmiş hücreler, uygun tamponlar kullanılarak hücre zarlarının parçalanması ve çekirdeklerin açılması işlemine tabi tutulur. Bu aşamada, kromatin kompleksi açığa çıkarılır ve protein-DNA etkileşimleri serbest hale getirilir.
3. Kromatinin parçalanması: Genellikle ultrasonikasyon tekniği kullanılarak, kromatin uygun boyutlara bölünür. Bu işlem, istenen DNA parçalarının belirlenen boyut aralığında olmasını sağlamak için gerçekleştirilir.
4. Antikor immunopresipitasyonu adımı, SP1 proteininin belirli bir bağlanma bölgesini çekmek üzere 2 μ g miktarında SP1 antikoru kullanıldı. Bu antikorlar, kromatinle etkileşime girerek hedef protein-DNA komplekslerine spesifik olarak bağlanır. Bu bağlanma sayesinde, SP1 proteinlerinin bulunduğu protein-DNA kompleksleri izole edilir, böylece bu komplekslerin moleküler düzeyde incelenmesi ve anlaşılması mümkün olur.
5. Protein-DNA komplekslerinin tersine çevrilmesi ve proteinlerin çözünmesi: İmmunopresipite edilen kompleksler içerisindeki protein-DNA bağları, sıcaklık artışı ve enzimatik sindirim kullanılarak çözülmekte. Bu adım, proteinlerin çözünmesini sağlayarak, DNA'nın serbestleşmesine olanak tanır. İmmunopresipitasyon esnasında oluşan bağlar, bu aşamada çözülüp, protein ve DNA'nın ayrılmasını mümkün kılar.

6. İzole edilen DNA'nın saflaştırılması ve karakterizasyonu: Proteinlerin çözünmesinin ardından, DNA izole edilir ve saflaştırılır. Sonrasında, izole edilen DNA'nın analizi için qPCR yöntemi kullanılarak veriler elde edilir ve GraphPad programı ile grafikler oluşturulur.

ChIP protokolünün basamakları EZChIP™ Milipore kiti kullanılarak gerçekleştirildi.

3.2.8.1 Kromatin İmmunopresipitasyonunda Fiksasyon Aşaması

SW480 hücreleri, yapışık durumda bulunan 100 mm'lik kültür kabında 10 mL büyüme ortamı içerisinde %80-90 yoğunlukta olduğunda deney başlatıldı. SP1 ko-transfeksiyonu yapılarak ChIP prosedürne başlandı. ChIP deneylerine başlamak için, medyuma 366,6 µL %37 formaldehit eklendi. Oda sıcaklığında, horizontal çalkalayıcıda nazikçe çalkalayarak 10 dk. boyunca reaksiyonu başlatıldı. İnkübasyon süresinin sonunda, reaksiyona girmemiş olan formaldehit kalıntılarını temizlemek için her hücre kabının üzerine 1,3 mL 10X Glisin eklendi. Bu karışım, horizontal çalkalayıcıda nazikçe çalkalanarak 5 dk. süreyle oda sıcaklığında inkübe edildi. Sonrasında yıkama aşamasına geçildi. İlk olarak, büyüme kabı buz üzerine yerleştirildi. Medyum, bir pipetle uzaklaştırıldı. Ardından, her petri kabı için 10 mL soğuk 1X PBS eklenerek hücreler yıkandı. Bu aşama, 3 kez tekrarlandı. Bu adımdan sonra hücreleri kazımak için 1 mL 1X PBS'e 3.25 µL Proteaz İnhibitör Kokteyl II ekledik (Kullanılacak petri hacmine göre kat alınarak hesaplanır) ve tüpleri buz üzerinde soğuttuk. 1X Proteaz İnhibitör Kokteyl II içeren 2 mL soğuk PBS, 100 mm'lik hücre kabına eklendi. Hücre kabı, 5 dk. boyunca buz üzerinde inkübe edildi. Sonrasında, hücreler hücre kazıyıcı kullanılarak yüzeyden ayrıştırıldı ve 2 mL'lik ependorf tüplerine transfer edildi. Daha sonra, 700 x g'de 4°C'de 8 dk. süreyle santrifüj edildi. Santrifüjleme sırasında, bir sonraki adım için gerekli liziz tamponu hazırlandı. Bu tampon, her bir petri kabı için gereken 666 µL SDS Lizis Tampon'a 3.3 µL Proteaz İnhibitör Kokteyl II ekleyerek kullanıma hazır hale getirildi. Santrifüj sonrasında süpernatant uzaklaştırıldı. Her hücre pelleti, 666 µL SDS Lizis Tamponu içeren 1X Proteaz İnhibitör Kokteyli II ile çözüldü. Çözülen hücreler, her bir santrifüj tüpünde 300-400 µL arasında paylaştırıldı. Her bir tüpte 300-400 µL olacak şekilde paylaşılan hücre lizatı, buz ile dolu ultrasonik sonikasyon cihazı kullanılarak çapraz bağlı DNA'ları 200-1000 bp aralığında parçaladı. Bu işlem için 5 defa, 10 saniyelik sonikasyon ve ardından 10 saniyelik buzda bekleme gerçekleştirildi. Sonikasyonun sonrasında, 13,500 x g'de 4°C'de 10 dk. süreyle santrifüj yapıldı ve süpernatant 100 µL'lik bölümlere ayrıldı. Her bir 100 µL'lik süpernatant, bir

immünopresipitasyon yapmak için yeterli olan 1×10^6 hücre lizatını içermektedir. İstenirse, 5 μ L'lik hücre lizatı alınabilir ve DNA'nın parçalanıp parçalanmadığı, Bölüm 3.2.3.6'da anlatıldığı gibi agaroz jel analiziyle kontrol edilebilir. Bu aşamada hücre lizatları, -80°C 'de 2 aya kadar saklanabilir.

3.2.8.2 Kromatin İmmünopresipitasyonunda Çapraz Bağlı Protein/DNA'nın İmmünopresipitasyonu

Her immünopresipitasyon için, 600 μ L Çözelti Tamponu ve 3 μ L Proteaz İnhibitör Kokteyli II eklenmeli. Çözelti tamponu buzda muhafaza edilir. Hücre lizatına 100 μ L ekleyerek toplam hacmi 700 μ L yapılır. Pozitif kontrol (Anti-RNA Polimeraz II), negatif kontrol (IgG), ve ilgilenilen antikor (SP1) içermelidir. 700 μ L hücre lizatının antikor işlemine tabi tutulmadan önce, her immünopresipitasyona 42 μ L Protein G Agarozu eklenir. Bu aşamada Protein G Agarozu, non-spesifik bağlanabilen protein parçacıklarını temizlemek için kullanılır. Protein G Agarozu ekledikten sonra, 4°C 'de 1 saat boyunca 360° rotasyonlu bir döndürücüde inkübe edilir. Daha sonra 5000 g'de 1 dk. süresince santrifüjlenir. Bu adımdan sonra, Protein G Agarozu pellet haline geldi. Protein G Agarozu, gelecekteki aşamalarda kullanılmak üzere $+4^{\circ}\text{C}$ 'de saklanmak üzere alındı. Elde edilen süpernatant, hiçbir antikor ile işlem görmemiş kontrol için ileriye dönük basamaklarda kullanılmak üzere bir tüpe 7 μ L (%10 giriş) olarak ayrıldı. Daha sonra kalan ~ 700 μ L süpernatant örnekleri, uygun antikorlarla işleme tabi tutuldu (*b.k.* Tablo 3.18). Antikor ilavesinden sonra, bir gece boyunca 4°C 'de döndürülerek inkübe edildi. Ertesi gün, her bir immünopresipitasyon (IP) örneğine Protein G Agaroz'un antikor/antijen/DNA kompleksine bağlanmasını sağlamak için 42 μ L Protein G Agaroz eklendi ve 1 saat boyunca 4°C 'de döner bir inkübatörde inkübe edildi. İnkübasyon süresinin sonunda, 5000 g'de 1 dk. süresince santrifüj yapılarak Protein G Agaroz pellet haline getirildi. Sonrasında süpernatant kısmı ayrı bir tüpe transfer edildi. Protein G Agaroz/Antikor/Kromatin kompleksinin bulunduğu pellet yıkanarak temizlendi. Her bir IP örneği, soğuk bir tampon içinde 700 μ L olarak suspende edilip yıkandı. Yıkama işlemi için 3-5 dk. boyunca inkübe edildi ve ardından 5000 g'de 1 dk. süresince santrifüjlenerek Protein G Agaroz-Antikor/Kromatin kompleksi temizlendi. Yıkama adımları Tablo 3.18'de belirtilen şekilde uygulandı.

Tablo 3.18: ChIP’te amacına uygun kullanılan antikorlar ve miktarları.

Kullanım Amacı	Antikor
Pozitif Kontrol	Anti-RNA Polimeraz II (1 µg)
Negatif Kontrol	Normal Rabbit IgG (1 µg)
İlgilenilen Antikor	SP1 (rabbit) (2 µg)
! İlgilenilen antikor için 1-10 µg olacak şekilde uygulanmalıdır.	
! İlgilenilen antikor Mouse ise negatif kontrol olarak Normal Mouse IgG tercih edilmelidir.	

Tablo 3.19: ChIP’te kullanılan yıkama tamponları ve kaç kez kullanıldıkları.

Tampon İsimleri	Uygulama Sayısı
Düşük Tuzlu immün Kompleks Yıkama Tamponu	1 kez
Yüksek Tuzlu immün Kompleks Yıkama Tamponu	1 kez
LiCl Immune kompleks Yıkama Tamponu	1 kez
TE Tamponu	2 kez

3.2.8.3 Kromatin İmmunopresipitasyonunda Protein/DNA Komplekslerinin Elüsyonu

Tüm IP tüpleri için elüsyon karışımı hazırlandı. Her tüp için oluşturulan karışım, 7 µL %20 SDS, 14 µL 1 M NaHCO₃ ve 119 µL steril distile su içermektedir. Input tüpleri, bu karışımdan 140 µL eklenerek oda sıcaklığında bekletildi. Diğer yandan, her bir antikor/agaroz kompleksi içeren tüpe 70 µL elüsyon karışımı eklenerek işlem tamamlandı.

Tüpler nazikçe çalkalanarak homojenleştirildi. Bu işlemten sonra, oda sıcaklığında 15 dk. boyunca inkübe edildi. İnkübasyon süresinin sonunda, 5000 g’de 1 dk. süresince

santrifüjlendi. Santrifüjleme işlemi sonrasında elde edilen süpernatant, yeni bir tüpe aktarıldı. Elüsyon tamponu eklenip oda sıcaklığında bekletildikten sonra, tekrar 5000 g'de 1 dk. süresince santrifüjleme adımı gerçekleştirildi. Elde edilen pellet halindeki agarozlar tekrar kullanım için +4°C'ye kaldırıldı.

3.2.8.4 Kromatin İmmunopresipitasyonunda Protein/DNA Komplekslerinin Serbest DNA'ya Çevrilmesi

Bölüm 3.2.6.3'te eklenen elüsyon tamponu sonrasında %10 input örnekleri ve IP tüplerine 5.6 µL 5 M NaCl ilavesiyle DNA, 65°C'de bir gece boyunca inkübe edildi. Tüm tüplere 0.7 µL RNase eklenerek, 37°C'de 30 dk. süreyle inkübe edildi. Sonrasında RNaz A'nın etkisini durdurmak için her bir tüpe 2.8 µL 0.5 M EDTA, 5.6 µL 1 M Tris-HCl ve 0.7 µL Proteinaz K eklenerek, 45°C'de 1-2 saat boyunca inkübe edildi.

3.2.8.5 Kromatin İmmunopresipitasyonunda DNA Saflaştırması

Her bir örnek için, kit içerisinde yer alan Spin filtresi ve toplama tüpü çıkarılır. DNA numune tüplerine (IP'ler ve Input) 140 µL olacak şekilde 700 µL Bind Reagent “A” eklenir ve tamamen karıştırılır. Her bir numune için 1 hacimde DNA örneğine karşılık gelen 5 hacim Bind Reagent “A” kullanılır. Bu aşamada çözünme süreci gözlenir. Toplama tüpündeki spin filtresine, 600 µL numune/Bağlama Reaktifi “A” karışımı aktarılır. En az 13,500 g hızında 30 saniye süreyle santrifüjleme yapıldıktan sonra spin filtresi, toplama tüpünden çıkarıldı ve tüp içindeki sıvı drenajı gerçekleştirildi. Spin filtresi tekrar aynı toplama tüpüne yerleştirildi. Kalan 600 µL numune/Bağlama Reaktifi “A” karışımı, spin filtresine transfer edildi ve bu adımlar tekrarlandı. Toplama tüpündeki spin filtresine 350 µL Yıkama Reaktifi “B” eklenip, 13,500 g hızında 30 saniye süreyle santrifüjleme yapıldı. Daha sonra spin filtresi toplama tüpünden çıkarıldı ve toplama tüpü muhafaza edildi. Toplama tüpündeki sıvı boşaltıldı. Ardından, aynı toplama tüpüne boş spin filtresi geri konuldu ve 13,500 g hızında 30 saniye süreyle santrifüjleme yapıldı. Toplama tüpü ve sıvı kısmı atıldı, spin filtresi temiz bir yeni toplama tüpüne yerleştirildi. Elüsyon Tamponu “C”den 35 µL, doğrudan beyaz spin filtre membranının merkezine eklenerek 5 dk. oda sıcaklığında bekletildi.

Sonrasında, 13,500 g hızında 30 saniye boyunca santrifüjleme gerçekleştirildi. Spin filtresi çıkarılarak atıldı. Toplama tüpündeki eluat artık saflaştırılmış DNA'yı içermektedir. Saflaştırılan DNA, Real Time PCR için hazırlık aşamasını oluşturan, Tablo 3.20'de belirtilen şartlara ve Tablo 3.19 'daki primerlerle birlikte kuruldu.

Tablo 3.20: ChIP Real Time PCR’ında kullanılan primerler ve dizileri.

Primer Adı	Nükleotit Dizisi (5'→3')	Bölge	Ürün Büyükülüğü
TS8 ChIP İLERİ 1	GCAACTAGCAGTATCCAGAAGAGA	-687/-792	105 bç
TS8 ChIP GERİ 1	AGTGGTAAGTTACCAGCACTGAG		
TS8 ChIP İLERİ 2	CTTAGGGTTAACCAGGTGGGTTGT	-637/-503	135 bç
TS8 ChIP GERİ 2	GAGAGGAGGAAAAGGTCATGCTAA	-637/-503	
TS8 ChIP İLERİ 3	CTTCGGAAGATGCATCCTGGAC	-353/-234	119 bç
TS8 ChIP GERİ 3	CTCTACGCGTGGACCCACGTTA	-353/-234	
TS8 ChIP İLERİ 4	GGAAACGGGAATAGTGAGAGATCA	-87/+38	126 bç
Primer Adı	Nükleotit Dizisi (5'→3')	Bölge	Ürün Büyükülüğü
TS8 ChIP GERİ 4	CAGCCGCCTCCTGCCTCCTC	-87/+38	
TS8 ChIP İLERİ 5	AGCTGCTCGCGCTCGGCTCG	+91/+232	141 bç
TS8 ChIP GERİ 5	TCTCCAGGAAAAGCGGAATCAATC	+91/+232	
TS8 ChIP İLERİ 6	GGGCCGAGTCGGCCTTGAC	+188/+312	124 bç
TS8 ChIP GERİ 6	CGGTGGCTGCGCGCAGGAGA	+188/+312	

3.2.9 İmmünofloresan Deneyi (IFC)

İmmünofloresan deneyinde belirli bir protein hücre içinde floresan (ışıklı) bir sinyal oluşturacak şekilde etiketlenir. Bu etiketlenen hücreler, floresan mikroskop kullanılarak görüntülenir, böylece belirli bir proteinin lokalizasyonu veya varlığı görsel olarak belirlenebilir.

Bu amaçla bölüm 3.2.5’te belirtilen şekilde SP1 transkripsiyon faktörü SW480 hücre hattında over ekspresyona uğratıldı. SP1 over ekspresyon çalışmasının doğrulanması amacıyla Anti-rabbit IgG (H+L), F(ab')₂ Fragment (Alexa Fluor® 488 Conjugate) sekonder antikor kullanılırken, ADAMTS-8 ifadesinin tespiti için sekonder antikor olarak Anti-mouse IgG

(H+L), F(ab')₂ Fragment (Alexa Fluor® 594 Conjugate) sekonder antikor kullanıldı. Deneye başlamadan önce aşağıdaki tabloda belirtilen malzemeler hazırlandı.

Tablo 3.21: Floresan çalışmalarında kullanılan çözeltiler.

Çözelti	Bileşimi ve Hazırlanışı
% 4 (w/v) PFA (Paraformaldehit) Çözeltisi	~ 80 mL 1X PBS ısıtmalı manyetik karıştırıcıda 55 °C'ye getirildi ve üzerine 4 g paraformaldehit eklenip karıştırıldı. 10 N NaOH çözeltisinden (~ 200 µL) berrak çözelti oluşana kadar damla ilave edildi. Çözelti oda sıcaklığına getirildi ve pH'ı 7,2'ye ayarlanıp son hacmi 1X PBS ile 100 mL'ye tamamlandı. Bu çözelti 0,45 µm filtreden geçirilip ependorf tüplere paylaştırıldı. Tüpler ışık almayacak şekilde -20 °C'de saklandı.
DAPI Boyası (300 nM)	14,3 mM (5mg/mL) DAPI stok çözeltisinden 2,1 µL alınıp 97,9 µL 1X PBS ile karıştırıldı. Bu 300 µM'lik ara dilüsyon, 1:1.000 oranında 1X PBS'de seyreltilerek 300 nM DAPI boyası hazırlandı.

Transfeksiyondan sonra hücreler (kontrol ve SP1 over ekspresyon grubu), kuyucularına steril yuvarlak lameller yerleştirilmiş olan 24 kuyucuklu plakaya 125×10^3 hücre/kuyu olacak şekilde bölündü. Plaka, hücrelerin tutunması için 1 gece (16 sa.) 37 °C'deki %5 CO₂ içeren inkübatöre kaldırıldı. Ertesi gün Fiksasyon için hücrelere 250 µL %4 (w/v) paraformaldehit çözeltisi eklendi ve oda sıcaklığında 15 dk. inkübe edildi. Fiksatif ortamdan uzaklaştırılıp hücreler üç kez 1X PBS ile yıkandı. Hücrelere, zarlarını zayıflatmak için 250 µL %0,1 (v/v) Triton X-100 içeren PBS eklendi ve on dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Hücreler iki kez 1X PBS ile yıkandı. Hücrelere 250 µL %1 (w/v) BSA içeren PBS eklenip 1 sa. oda sıcaklığında inkübe edilerek bloklama yapıldı. Hücreler iki kez 1X PBS ile 5 dk. boyunca yıkandı. Hücrelere 100 µL primer antikor (1/100 oranında %1 BSA içeren PBS ile seyreltilmiş ADAMTS-8 antikor ve 1/200 oranında %1 BSA içeren PBS ile seyreltilmiş SP1 antikor) eklenerek nemlendirilmiş kutuda 1 gece +4°C'de inkübe edildi. Ertesi gün primer antikor uzaklaştırılıp hücreler iki kez 1X PBS ile 5 dk. boyunca yıkandı. Bundan sonraki işlemlere oda sıcaklığında ve karanlık ortamda devam edildi. Hücrelere 100 µL sekonder antikor 1/400 oranında eklenerek nemlendirilmiş kutuda 1 sa. oda sıcaklığında inkübasyon yapıldı. Sekonder antikor uzaklaştırılıp hücreler üç kez 1X PBS ile 5 dk. boyunca yıkandı. Nükleus boyaması için 1 µg/mL DAPI (4'',6'' diamino-2-phenylindole 2HCl) boyası eklendi ve 5 dk inkübasyona bırakıldı. Daha sonra PBS ile yıkama yapıldı.

Preperatların mikroskopiye hazırlanması amacıyla lamaların üzerine floresans sinyalin zamanla solmasını engellemek için Mounting medyum (%90 gliserol + %10 PBS) damlatıldı ve hücreler arada kalacak şekilde dikkatlice kapatıldı. 1 gece kuruması için oda sıcaklığında beklendi. Hazırlanan preparatlar floresan mikroskobu kullanılarak görüntülendi ve fotoğrafları çekildi. Floresan görüntüler ImageJ programında analiz edilerek GraphPad programında grafiklendirildi.



4. BULGULAR

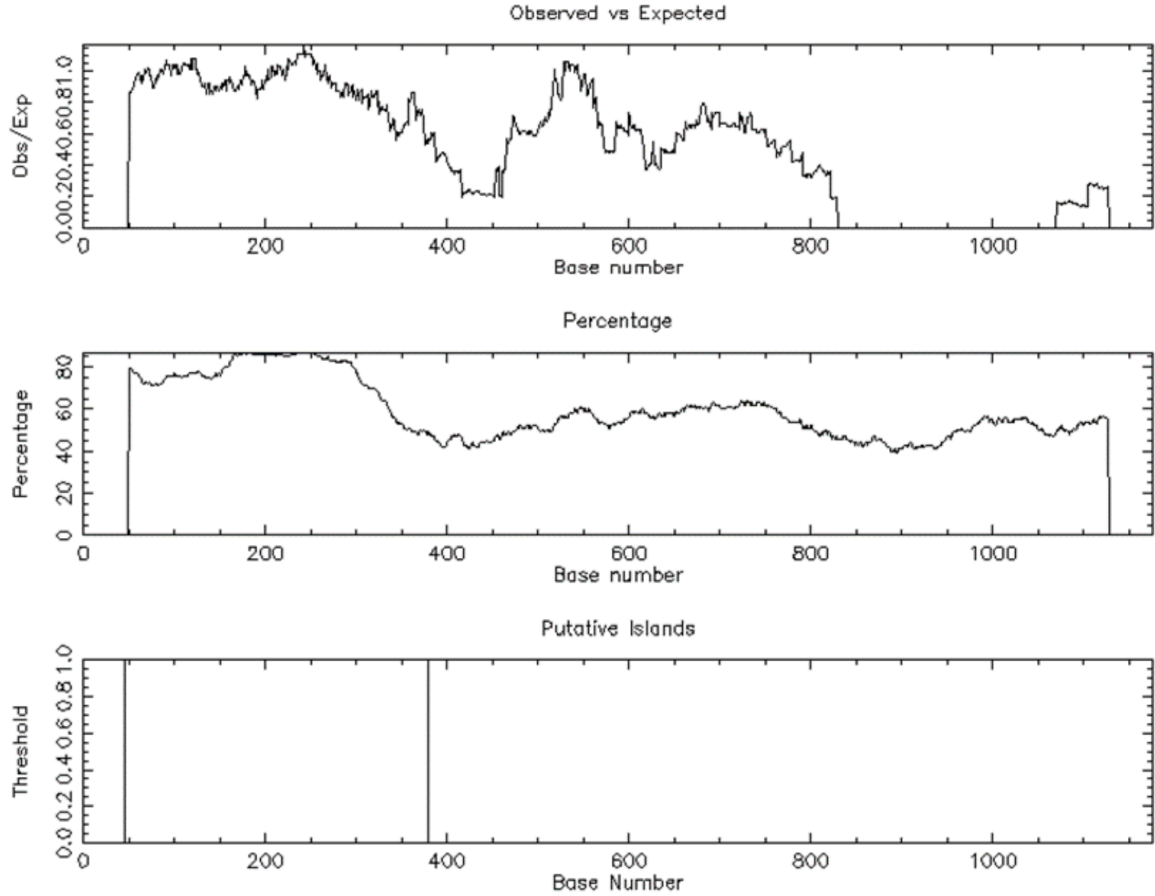
4.1 ADAMTS-8 Promotorunun Karakterizasyonu

ADAMTS-8 cDNA dizisi ile ADAMTS-8 promotor dizisi karşılaştırılarak transkripsiyonun başlangıç bölgesi (+1) mor renk ile, ADAMTS-8 promotorunun 323 bç'lik UTR bölgesi mavi renk ile, ADAMTS-8 promotorunun TATA kutusu turuncu renk ile, ATG bölgesi ise kırmızı renk ile işaretlenmiştir (*b.k.* Şekil 4.13).

```
-854 TTGTTCTTGGGGCTGTGGCAACGCAGTGAAAGGGCCTGCCACCTTACTTGAAGTC -797
-796 CCGGGCAACTAGCAGTATCCAGAAGAGAAGACCTTTTTCAGGGACTGGAGGTCTG -742
-741 TTTCCCTCTTGGGGAAATGCTAACTTCCAACCTCAGTGCTGGTAACTTACCACTG -687
-686 TGCTGGCCTCTGCCCCACCTGCCCTCTAACAGGACAGTGAGAGTCCCTCTTAGGG -632
-631 TTAACCAGGTGGGTGTGTTTTGGTTTTGGTTTTGTTTTCCCATCTTCAGTTTGG -577
-576 AGTGAAAGTTAGGAAGGCTGTGCAGTAGTGATGAGAGGAGGGCATGATTTTAGCA -522
-521 TGACCTTTTCTCCTCTCCCTTTATGCTTTACAATGAAAAGCTCAGGAACCTTCT -467
-466 CCCCACACAGTCGGATCTCCGGAGGCATCTGCAGGGATCCCAACAGTGTCGGGCT -412
-411 CTGCAGTCGGACTCTGCAGGGATCCGAACAGGGTCGCTGAGACCAGTGCACGAGC -357
-356 CTCTTCGGAAGATGCATCCTGGACTCTTGGCCGAGAGGAGAAAGCGGTTGGGGT -302
-301 CTCCCAGGGACTCTTTCTAAAGGGTCAGTCCAGCATGGTAGGGGTTAACGTGGGT -247
-246 CCACGCGTAGAGGGAAAGGAAAGAAGTTGTAGTTGACACTTCAGGGGGGCGGGTG -192
-191 GCGGACGGGTCTCGCTGCCTGATTGGTTTTGCATTTTCATCCCAATTTTTTTTTTCT -137
-136 CCACTCTCTCTCCCTCTTTTCAGTTTCTCTCTCTGATCCCAGGGGAGGGGAAACG -82
-81 GGAATAGTGAGAGATCAAAAATAAACCTCTTATGTCAAGCCGGAAGGAAGTATA -27
-26 AATAAGAAGGGCTCGGCAGCCCACTCGGTGCTTCCCGGGGTGGGGAGGAGGCAGG +29
+30 AGGCGGCTGCGCGGGGCTGGCGCGGGCAGAGGCGGAGGACGGGCGCACGCGGGCC +84
+85 GGGGCCAGCTGCTCGCGCTCGGCTCGGGGGCGGCGGCGGGAGGAGCGGGCTGC +139
+140 GCCAGCCAGAGGGGCGCGGGGAGCGCTCCCGCCACCGGGCCCCGCGGGCCGA +194
+195 GTCGGCCTTGACCCGATTGATTCCGCTTTTCCTGGAGAGAGCGGCCGGGCGCG +249
+250 CTCGGGCGCCAGCACCTGCCGCGCCTGGCGGGCTTTCCTTCTCTCCTGCGCGC +304
+305 AGCCACCGCCGAGCCCCATG +323
```

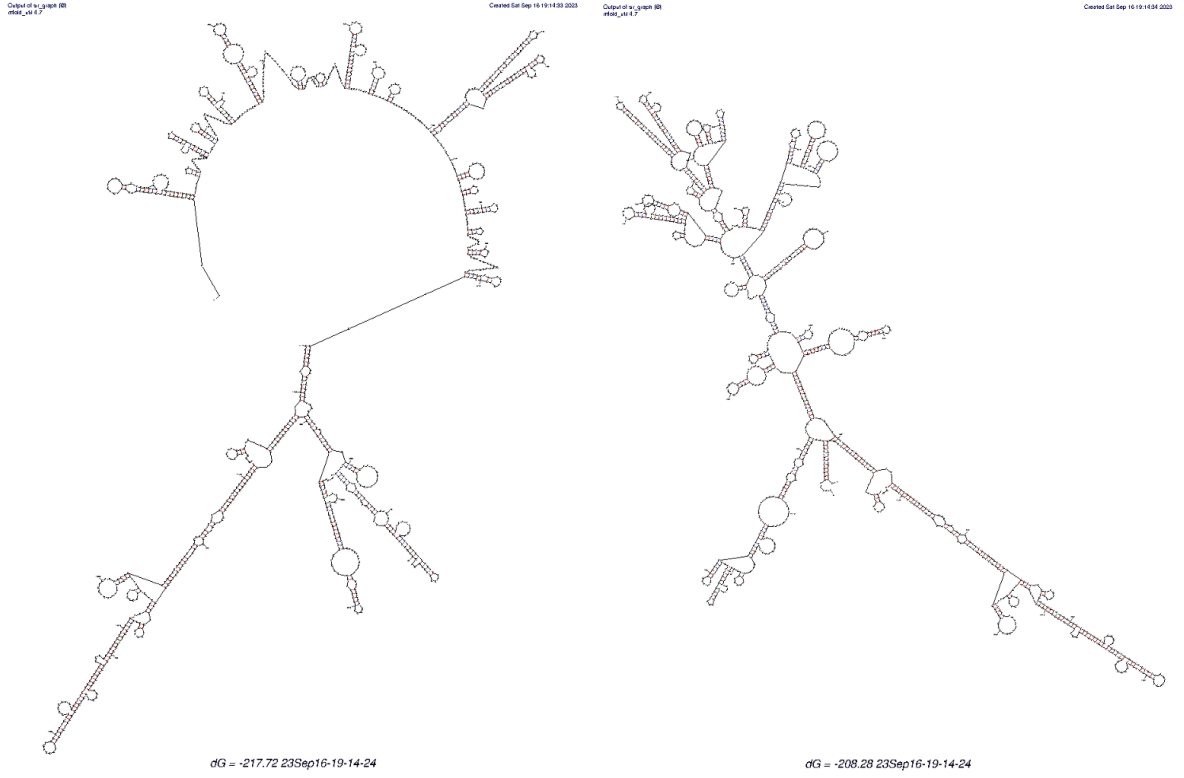
Şekil 4.1: ADAMTS-8 Promotoruna ait biyoinformatik analiz.

Yapılan EMBOSS CpG Plot analizine göre (+277/-57) bazlar arasında CpG adası oluşması muhtemel olduğu gözlemlendi. 1177 bç'lik muhtemel promotor bölgesinin %GC içeriği %59,9 olarak hesaplandı. (-199/+98) bazları arasında GC içeriği %87'ye ulaştığı görüldü. (+273/+56) baz lokasyonlarında “GGCGCGGGCAGG” dizisinin oluşturduğu saç tokası yapıları tespit edildi (b.k. Şekil 4.14).



Şekil 4.2: ADAMTS-8 promotoru CpG adası ve % GC analizi.

ADAMTS-8 promotor bölgesinin sekonder yapıları mFold programı kullanılarak belirlendi. Analiz sonucunda 12 tane sekonder yapı tespit edildi. Sekonder yapılara ait maksimum ΔG değerleri -217.72 kcal/mol ve minimum ΔG değerleri -208.28 kcal/mol olacak şekilde gösterildi (b.k. Şekil 4.3).



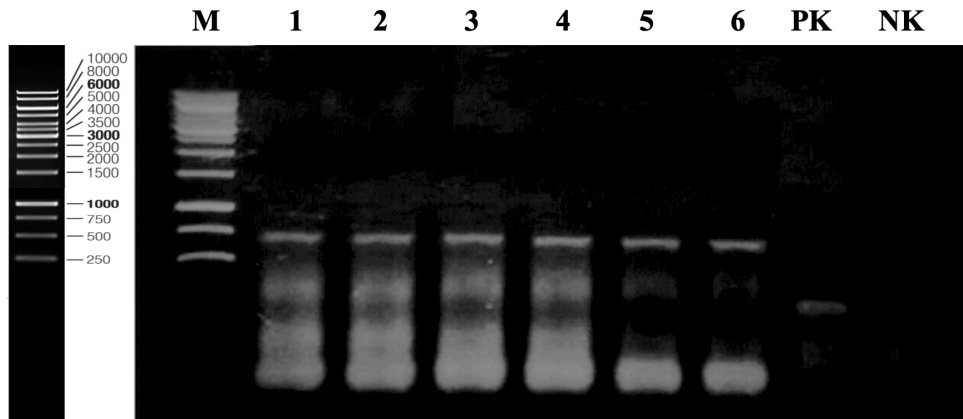
Şekil 4.3: ADAMTS-8 promotorundaki maksimum ve minimum ΔG değerli sekonder yapılar.

4.2 ADAMTS-8 Geninin Promotor Parçalarının Klonlanması

4.2.1 ADAMTS-8 Geninin TS-8[-226/+323] Promotor Parçasının PCR Amplifikasyonu

ADAMTS-8 promotor parçalarından TS-8[-854/+323], TS-8[-665/+323] ve TS-8 [-413/+323] 119Z101 Numaralı proje kapsamında klonlanmıştır. Bu tez çalışması kapsamında ise TS-8[-226/+323] ve TS-8[-223/+9] ADAMTS-8 promotor konstraktları klonlanmıştır. Çalışmalara beş promotor parçası kullanılarak devam edilmiştir.

TS-8[-413/+323] promotor parçası, TS-8[-226/+323] konstraktının klonlanması amacıyla bölüm 3.2.3.3’de anlatıldığı gibi PCR reaksiyonunda kalıp olarak kullanıldı. Amplifikasyon için spesifik ADAMTS-8 primerleri kullanılarak gerekli bileşenler reaksiyona dahil edildi. Reaksiyon, başlangıç denatürasyonu; 94°C’de 3dk, (Denatürasyon; 94°C’de 45sn, Bağlanma; 58°C’de 45sn, Uzama; 72°C’de 45sn) x 35 döngü ve son basamak olarak uzama; 72°C’de 45sn koşullarına uygun olacak şekilde çalıştırıldı. Amplifikasyonun sonucunda Spesifik TS-8[-226/+323] bantları bölüm 3.2.3.4’de bahsedilen şekilde agaroz jel elektroforezinde gözlemlendi (*b.k.* Şekil 4.4). Elde edilen bantlar bölüm 3.2.3.5’de anlatılan şekilde jelden geri kazanıldı ve ligasyon işlemi için hazır hale getirildi. Pozitif kontrol olarak bilinen cDNA kalıp olarak kullanılarak, insan beta mikroglobulin geni çoğaltılmıştır.

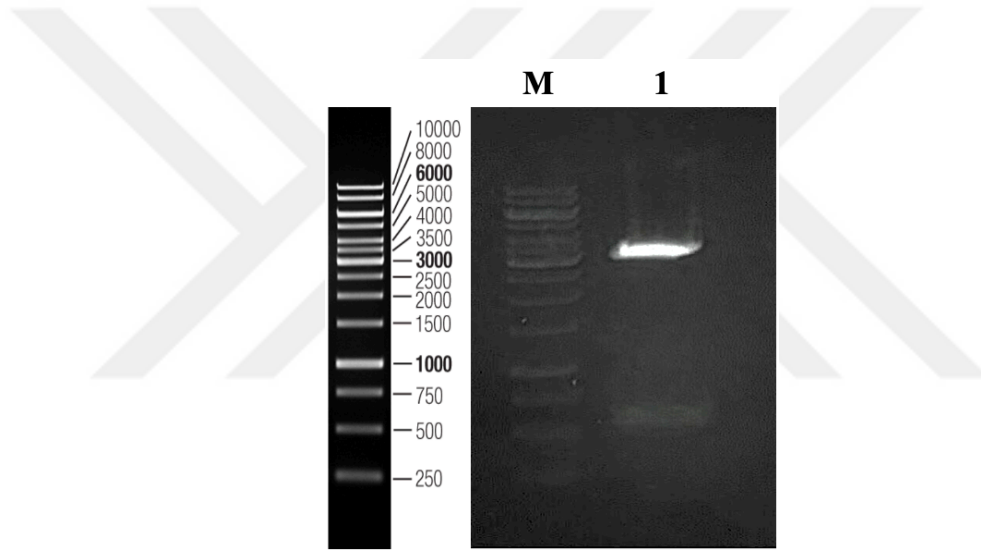


Şekil 4.4: ADAMTS-8 TS-8[-226/+323] promotor parçasının PCR amplifikasyonu agaroz jel elektroforezi görüntüsü.

(M: 1kb DNA büyüklük belirteci (Thermo Sci., SM0311), 1-6: TS-8[-226/+323] PCR sonucu, PK: Pozitif Kontrol, NK: Negatif Kontrol)

4.2.1.1 TS-8[-226/+323] Promotor Parçasının, pGEM-T Easy Vektör Sistemine Ligasyonu ve Rekombinant Kolonilerin Tespiti

Agaroz jel elektroforezinden geri kazanılan TS-8[-226/+323] promotor parçasının, pGEM-T Easy vektörüne ligasyonu bölüm 3.2.3.7’de bahsedilen reaksiyon bileşenleri yardımıyla 16°C’de gece boyu inkübe edilerek gerçekleştirildi. Sonraki gün ligasyon ürünleri Bölüm 3.2.2.3’de belirtilen şekilde *E. coli* JM109 kompeten hücrelerine transforme edildi. Rekombinant kolonilerin tespiti için elde edilen beyaz kolonilerden tek koloni seçimi yapıldı ve ön kültür hazırlandı. Bölüm 3.2.2.6’daki protokol basamakları takip edilerek ön kültürlerden plazmit izolasyonu yapıldı. Plazmitler XhoI/HindIII enzimleri ile kesilerek agaroz jel elektroforezinde yürütüldü ve rekombinant koloni tespit edildi (b.k. Şekil 4.5).



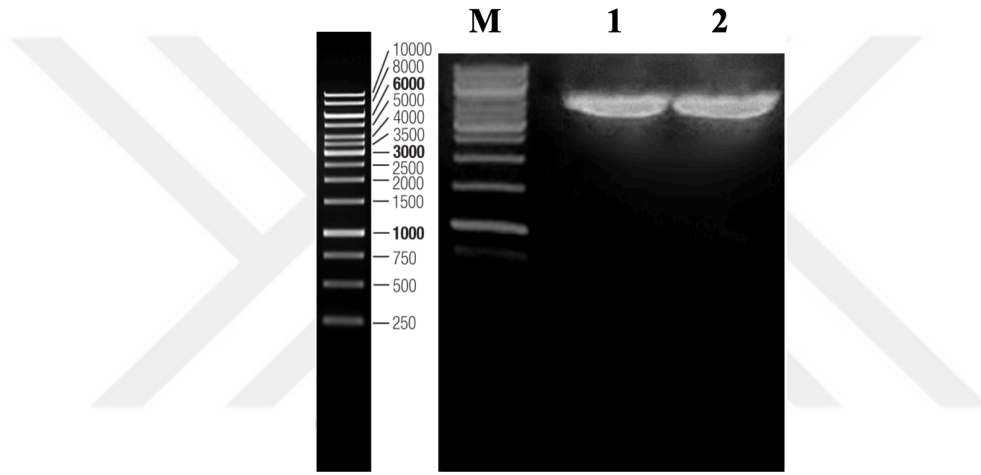
Şekil 4.5: ADAMTS-8 TS-8[-226/+323] promotor parçasını içeren pGEM-T Easy vektörünün XhoI ve HindIII enzimleriyle kesilerek rekombinant koloni tespiti.

(M: 1kb DNA büyüklük belirteci (Thermo Sci. SM0311), 1: Plazmit kesim sonucu)

4.2.2 TS-8[-226/+323] Promotor Parçasının pMetLuc Haberci Gen Vektörüne Alt Klonlanma Çalışması

4.2.2.1 pMetLuc Haberci Gen Vektörünün ve TS-8[-226/+323] Promotor Parçasının Hazır Hale Getirilmesi

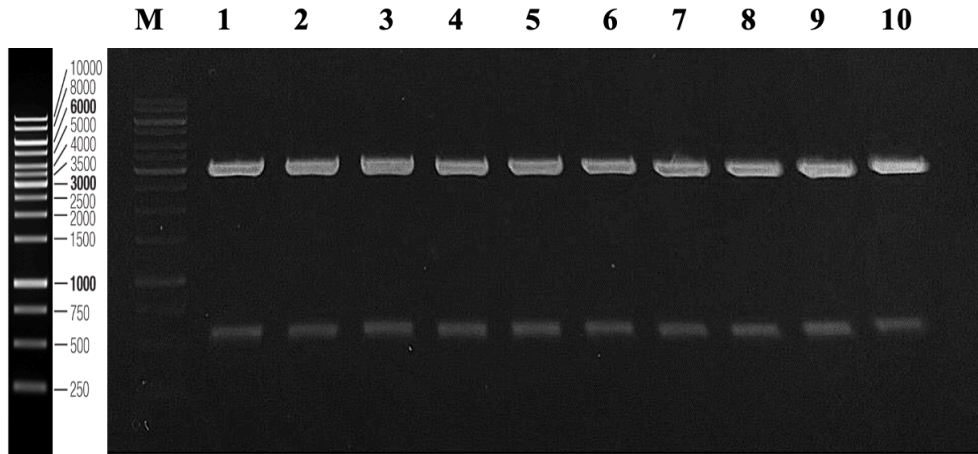
TS-8[-226/+323] promotor parçasının pMetLuc haberci vektörüne alt klonlanması için öncelikle haberci vektör bölüm 3.2.3.6’da bahsedilen şekilde XhoI ve HindIII restriksiyon endonükleaz enzimleri yardımıyla 37 °C’de gece boyu inkübasyona bırakıldı. Kesim sonucu agaroz jel elektroforezi yardımıyla görüntülendi (*b.k.* Şekil 4.6) ve vektör ligasyon basamağında kullanılmak üzere bölüm 3.2.3.5’de anlatılan şekilde jelden geri kazanıldı.



Şekil 4.6: pMetLuc haberci gen vektörünün XhoI ve HindIII restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesiminin agaroz jel görüntüsü.

(M: 1kb DNA büyüklük belirteci (Thermo Sci. SM0311), 1-2: pMetLuc haberci gen vektörü kesim sonucu)

TS-8[-226/+323] promotor parçasını içeren pGEM-T Easy vektörü ise pMetLuc haberci vektör ile aynı uçlara sahip olması için XhoI ve HindIII restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesildi. Agaroz jelde yürütülen kesim örnekleri (*b.k.* Şekil 4.7) jelden geri kazanılarak ligasyon için hazır hale getirildi.

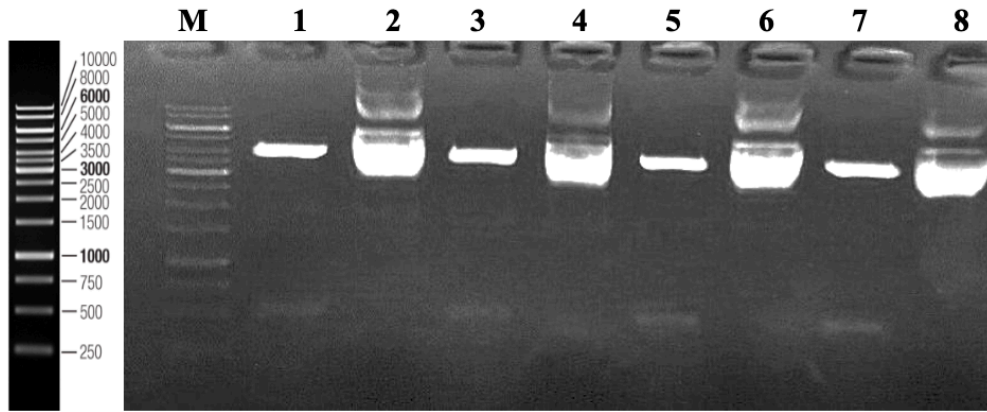


Şekil 4.7: Rekombinant pGEM-T Easy vektörünün XhoI ve HindIII restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesimi.

(M: 1kb DNA büyüklük belirteci (Thermo Sci. SM0311), 1-10: TS-8[-226/+323] promotor parçasını içeren pGEM-T Easy vektörü)

4.2.2.2 TS-8[-226/+323] ADAMTS-8 Promotor Parçasının pMetLuc Vektörüne Ligasyonu ve Rekombinant Kolonilerin Tespiti

Uygun uçları oluşturulmuş pMetLuc haberci gen vektörü ve TS-8[-226/+323] promotor parçası 20 µL son hacimde gece boyu 16 C’de inkübe edildi. Ligasyon ürünü bölüm 3.2.2.5’te belirtilen protokole uygun olarak hazırlanmış olan *E. coli* JM109 kompetent hücrelerine bölüm 3.2.2.3’deki basamakları takip ederek transforme edildi. Sonraki gün elde edilen koloniler ön kültürlendi ve gece boyu inkübasyona tabi tutuldu. Santrifüjlenerek elde edilen kültür pelletlerinden bölüm 3.2.2.6’da tarif edildiği gibi plazmit DNA izolasyonu yapıldı. Elde edilen plazmitlerin rekombinant olup olmadığını belirlemek amacıyla, DNA miktarları spektrofotometrik olarak belirlendi ve 1mg DNA, XhoI ve HindIII restriksiyon endonükleaz enzimleri kullanılarak kontrol kesimi gerçekleştirildi. Kesim işleminin sonucunda elde edilen dört koloninin de rekombinant olduğu agaroz jelde gözlemlendi (b.k. Şekil 4.8).

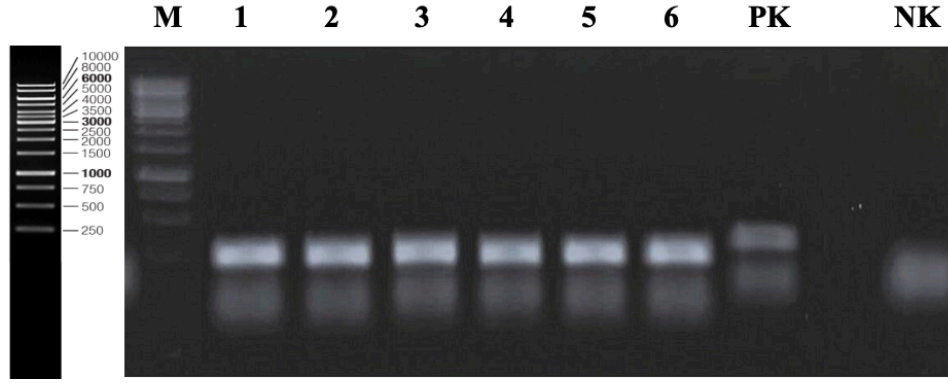


Şekil 4.8: Rekombinant olması muhtemel plazmidlerin XhoI ve HindIII restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesimi.

(M: 1kb DNA büyüklük belirteci (Thermo Sci. SM0311), 1-3-5-7: Kesim işlemine tabi tutulmuş rekombinant plazmidler, 2-4-6-8: Kesim reaksiyonundan önce izole edilen plazmitler)

4.2.3 ADAMTS-8 Geninin TS-8[-223/+9] Promotor Parçasının Promotor Parçasının PCR Amplifikasyonu

TS-8[-223/+9] promotor konstraktının amplifikasyonu için TS-8[-223/+9] parçanın amplifikasyonunda olduğu gibi bölüm 3.2.3.3'de anlatılan şekilde TS-8[-413/+323] promotor parçası PCR reaksiyonunda kalıp olarak kullanıldı. Ortama spesifik primerler eklenerek reaksiyon, başlangıç denatürasyonu; 94°C'de 3dk, (Denatürasyon; 94°C'de 45sn, Bağlanma; 58°C'de 45sn, Uzama; 72°C'de 45sn) x 35 döngü ve son basamak olarak uzama; 72°C'de 45sn olacak şekilde gerçekleştirildi. Amplifikasyon sonunda agaroz jel elektroforezi yardımıyla spesifik bantlar gözlemlendi (*b.k.* Şekil 4.9). Bölüm 3.2.3.5'deki basamaklar takip edilerek jelden kazanılan bantlar ligasyon işlemi için hazır hale getirildi. Pozitif kontrol olarak bilinen cDNA kalıp olarak kullanılacak, insan beta mikroglobulin geni çoğaltılmıştır.

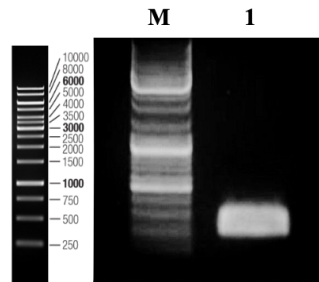


Şekil 4.9: TS-8[-223/+9] promotor parçasının PCR amplifikasyonunun jel elektroforezi ile tespiti.

(M: 1kb DNA büyüklük belirteci (Thermo Sci. SM0311), 1-7: TS-8[-223/+9] parçanın PCR sonucu, PK: Pozitif Kontrol, NK: Negatif Kontrol)

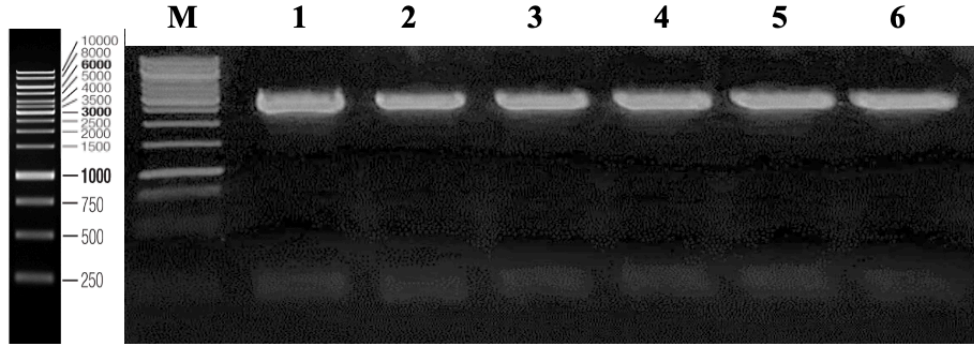
4.2.3.1 TS-8[-223/+9] promotor parçasının, pGEM-T Easy Vektör Sistemine Ligasyonu ve Rekombinant Kolonilerin Tespiti

Agaroz jel elektroforezinden bölüm 3.2.3.5'te anlatılan şekilde geri kazanılan TS-8[-223/+9] promotor parçasının geri kazanımı 5 µl agaroz jele yüklenerek geri kazanım kalitesi kontrol edildi (*b.k.* Şekil 4.10). TS-8[-223/+9] promotor parçasının pGEM-T Easy vektörüne ligasyonu, bölüm 3.2.3.7'de belirtildiği şekilde 16°C'de gece boyu inkübe edilerek gerçekleştirildi. Sonraki gün ligasyon ürünleri Bölüm 3.2.2.3'de belirtilen protokole uygun olarak *E. coli* JM109 kompeten hücrelerine transforme edildi. Rekombinant kolonilerin tespiti için edilen beyaz kolonilerden tek koloni seçimi yapılarak ön kültür hazırlandı. Bölüm 3.2.2.6'daki protokol takip edilerek ön kültürlerden plazmit izolasyonu yapıldı. Plazmitler XhoI/HindIII enzimleri ile kesilerek agaroz jel elektroforezinde yürütüldü ve rekombinant koloniler tespit edildi (*b.k.* Şekil 4.11).



Şekil 4.10: TS-8[-223/+9] promotor parçasının agaroz jelden geri kazanım kontrolü.

(M: 1kb DNA büyüklük belirteci (Thermo Sci. SM0311), 1-7: Geri kazanılan TS-8[-223/+9] parçası)



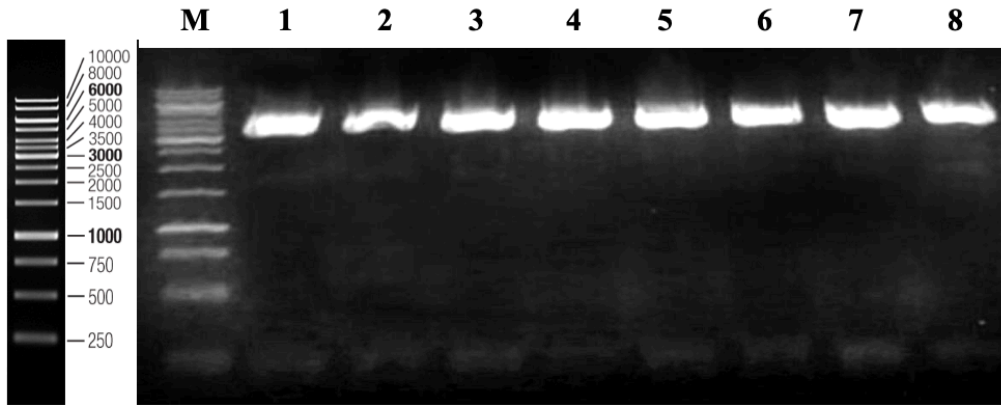
Şekil 4.11: TS-8[-223/+9] promotor parçasını içeren pGEM-T Easy vektörünün XhoI ve HindIII enzimleriyle kesimi sonucu rekombinant kolonilerin tespiti.

(M: 1kb DNA büyüklük belirteci (Thermo Sci. SM0311), 1: Plazmit kesim sonucu)

4.2.4 TS-8[-223/+9] Promotor Parçasının pMetLuc Haberci Gen Vektörüne Alt Klonlanma Çalışması

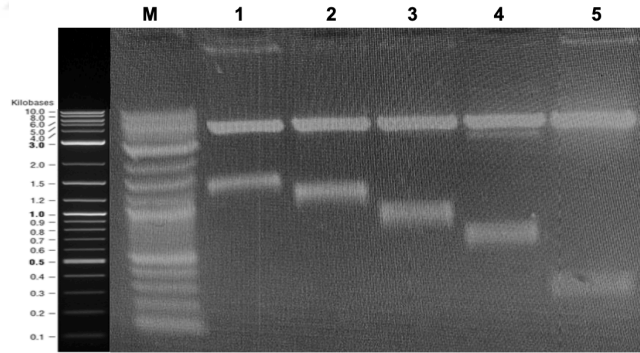
4.2.4.1 TS-8[-223/+9] ADAMTS-8 Promotor Konstraktının pMetLuc Vektörüne Ligasyonu ve Rekombinant Kolonilerin Tespiti

Bölüm 4.2.2.1’de hazır hale getirilen pMetLuc haberci gen vektör ve geri kazanılan TS-8[-223/+9] promotor parçası bölüm.3.2.3.7’de belirtilen birleşenler yardımı ile 20 µL son hacimde gece boyu 16 C’de inkübe edildi. Ligasyon ürünü bölüm 3.2.2.3’deki protokol takib edilerek hazırlanan *E. coli* JM109 kompetent hücrelerine transforme edildi. Sonraki gün elde edilen koloniler ön kültürlendi ve gece boyu inkübasyona tabi tutuldu. Santrifüjlenek elde edilen kültür pelletlerinden bölüm 3.2.2.6’da belirtilen şekilde plazmit DNA izolasyonu yapıldı. Elde edilen plazmitlerin rekombinant olup olmadığını belirlemek amacıyla DNA miktarları Spektrofotometrik olarak belirlendi. Ardından kontrol kesimi gerçekleştirilmek üzere 1mg DNA, XhoI ve HindIII restriksiyon endonükleaz enzimleri yardımıyla kesildi. Kesim işleminin sonucunda elde edilen sekiz koloninin rekombinant olduğu agaroz jelde gözlemlendi (b.k. Şekil 4.12).



Şekil 4.12: Rekombinant olması muhtemel plazmidlerin XhoI ve HindIII restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesimi.

Hazır hale getirilen beş promotor parçası hücre kültürü çalışmalarında kullanılmak üzere bölüm.3.2.2.7’de belirtilen protokol takip edilerek yüksek miktarda ve yeterli saflıkta plazmit DNA izolasyonu gerçekleştirildi. Elde edilen plazmitler XhoI/HindIII restriksiyon enzimleri yardımıyla bölüm 3.2.3.6’da belirtilen koşullarda kesildi ve bölüm 3.2.3.4’te belirtilen şekillerde agaroz jel elektroforezinde görüntülendi (*b.k.* Şekil 4.13).



Şekil 4.13: ADAMTS-8 promotor konstraktlarının XhoI/HindIII restriksiyon enzimleri ile kesimi.

(M: 1kb DNA büyüklük belirteci (NEB,N3200S), 1: TS-8[-854/+323] promotor parçasının XhoI/HindIII kesimi; 2: TS-8[-665/+323] promotor parçasının XhoI/HindIII kesimi ; 3: TS-8 [-413/+323] promotor parçasının XhoI/HindIII kesimi ; 4: TS-8[-226/+323] promotor parçasının XhoI/HindIII kesimi ; 5: TS-8[-223/+9] promotor parçasının XhoI/HindIII kesimi.)

4.2.5 TS-8[-226/+323] ve TS-8[-223/+9] ADAMTS-8 promotor konstraktlarının dizi analizi sonuçları

Çalışmada kullanılan PCR'a dayalı klonlama stratejisinin doğru bir şekilde gerçekleştiğini kanıtlamak amacıyla rekombinant plazmitler BMLabosis şirketine (ANKARA) dizilemeye gönderildi. Dizileme sonuçları, Bio-edit programı kullanılarak gen bankasında bulunan muhtemel ADAMTS-8 promotor bölgesi ile karşılaştırıldı (*b.k.* Şekil 14-15).

	10	20	30	40	50	60	70
ADAMTS-8 (549BÇ)	CATGGGGGCTGCGGGCGGTGGCTGCGCGCAGGAAAGGGAAGAGCCCGCCAGGCGCGGGCAGGTGCTGGCG						
ADAMTS-8 NCBI	CATGGGGGCTGCGGGCGGTGGCTGCGCGCAGGAGAGGGAAGAAAGCCCGCCAGGCGCGGGCAGGTGCTGGCG						
	80	90	100	110	120	130	140
ADAMTS-8 (549BÇ)	GCCCCGAGCGCGGCCCGGCCGCTCTCTCCAGGAAAAGCGGAATCAATCGGGTGCAAGGCCGACTCGGCCCG						
ADAMTS-8 NCBI	GCCCCGAGCGCGGCCCGGCCGCTCTCTCCAGGAAAAGCGGAATCAATCGGGTGCAAGGCCGACTCGGCCCG						
	150	160	170	180	190	200	210
ADAMTS-8 (549BÇ)	CGGGGCCCCGGCGGGCGGGAGCGCTCCCCGGCGGGCCCTCTGGCTGGCGCAGCCGCTCCTCCCGCGCCG						
ADAMTS-8 NCBI	CGGGGCCCCGGCGGGCGGGAGCGCTCCCCGGCGGGCCCTCTGGCTGGCGCAGCCGCTCCTCCCGCGCCG						
	220	230	240	250	260	270	280
ADAMTS-8 (549BÇ)	CGCCCCCGAGCCGAGCGCGAGCAGCTGGCCCCGGCCCGCGTGCGCCCGTCTCCGCCCTTGCCCGCGCCA						
ADAMTS-8 NCBI	CGCCCCCGAGCCGAGCGCGAGCAGCTGGCCCCGGCCCGCGTGCGCCCGTCTCCGCCCTTGCCCGCGCCA						
	290	300	310	320	330	340	350
ADAMTS-8 (549BÇ)	GCCCCGCGCAGCCGCTCTGCTCTCTCCCCACCCCGGGAAGACCGAGTGGGCTGCCGAGCCCTTCTTA						
ADAMTS-8 NCBI	GCCCCGCGCAGCCGCTCTGCTCTCTCCCCACCCCGGGAAGACCGAGTGGGCTGCCGAGCCCTTCTTA						
	360	370	380	390	400	410	420
ADAMTS-8 (549BÇ)	TTTATACTTCCTTCCCGGCTTGACATAAGAGGTTTATTTTGGATCTCTCACTATTCCCGTTTCCCTCCC						
ADAMTS-8 NCBI	TTTATACTTCCTTCCCGGCTTGACATAAGAGGTTTATTTTGGATCTCTCACTATTCCCGTTTCCCTCCC						
	430	440	450	460	470	480	490
ADAMTS-8 (549BÇ)	CTGGGATCGGAGAGAGAACTGAAAAGAGGGAGAGAGAGTGGAGAAAAAAATTGGGATGAAATGCAAA						
ADAMTS-8 NCBI	CTGGGATCAGAGAGAGAACTGAAAAGAGGGAGAGAGAGTGGAGAAAAAAATTGGGATGAAATGCAAA						
	500	510	520	530	540		
ADAMTS-8 (549BÇ)	ACCAATCAGGCAGCGAGACCCGTCCGCCACCCGCCCCCTGAAGTGTCAACTACAACCTT						
ADAMTS-8 NCBI	ACCAATCAGGCAGCGAGACCCGTCCGCCACCCGCCCCCTGAAGTGTCAACTACAACCTT						

Şekil 4.14: Klonlanan TS-8[-226/+323] ADAMTS-8 promotor bölgesine ait dizileme sonuçlarının gen bankasındaki dizi ile karşılaştırılması.

	10	20	30	40	50
ADAMTS-8 232bç		GGAAGCACCGAGTGGGCTGCCGAGCCCTTCTTATTTATACTTCCTTCCCGGCTTGA			
ADAMTS-8 NCBI		GGAAGCACCGAGTGGGCTGCCGAGCCCTTCTTATTTATACTTCCTTCCCGGCTTGA			
	80	90	100	110	120
ADAMTS-8 232bç		TTTTGATCTCTCACTATTCCCGTTTCCCCTCCCCTGGGATCAGAGAGAGAACTGA			
ADAMTS-8 NCBI		TTTTGATCTCTCACTATTCCCGTTTCCCCTCCCCTGGGATCAGAGAGAGAACTGA			
	150	160	170	180	190
ADAMTS-8 232bç		AGTGGAGAAAAAAATTGGGATGAAATGCAAAACCAATCAGGCAGCGAGACCCGT			
ADAMTS-8 NCBI		AGTGGAGAAAAAAATTGGGATGAAATGCAAAACCAATCAGGCAGCGAGACCCGT			
	220	230			
ADAMTS-8 232bç		CCTGAAGTGTCAACTACAACCTCTT			
ADAMTS-8 NCBI		CCTGAAGTGTCAACTACAACCTCTT			

Şekil 4.15: Klonlanan TS-8[-226/+323] ADAMTS-8 promotor bölgesine ait dizileme sonuçlarının gen bankasındaki dizi ile karşılaştırılması.

4.3 ADAMTS-8 Promotorunun Fonksiyonel Analizi

4.3.1 SW480 Hücre Hattında Kalsiyum-Fosfat Presipitasyon Metodu ile Geçici Transfeksiyonun Salınan Lusiferaz Sisteminde Optimize Edilmesi

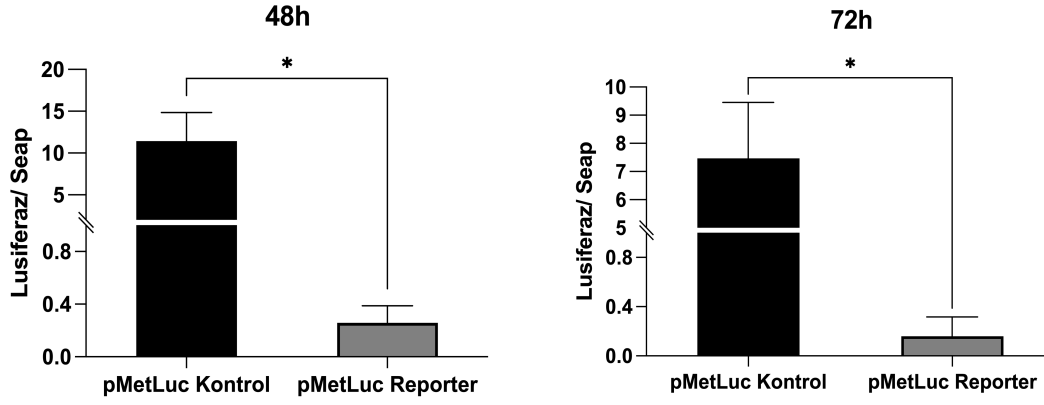
SW480 hücrelerinde gerçekleştirilen kalsiyum-fosfat presipitasyonunun optimizasyonu amacıyla pMetLuc Kontrol, pMetLuc Reporter ve pSeap2 Kontrol vektörleri kullanıldı.

Çalışmada kullanılan pMetLuc Reporter vektörü, ADAMTS-8 geninin promotor parçalarını klonladığımız aynı zamanda herhangi bir promotor parçası içermediği için transfeksiyon deneylerinde negatif kontrol olarak tercih ettiğimiz vektördür.

Kullanılan pMetLuc Kontrol vektörü, viral bir promotor parçası içerdiğinden yüksek lusiferaz aktivitesine sahiptir bu sebeple transfeksiyon deneylerinde pozitif kontrol olarak tercih ettiğimiz vektördür.

Son olarak pSeap2 Kontrol vektörü ise viral promotora sahiptir ve transfeksiyon sonucunda yüksek alkalen fosfataz aktivitesi gösteren bir vektördür. Bu sayede transfeksiyon deneylerinde salınım mekanizmasının işleyişini kontrol etmektedir. Deneylerde Luciferaz aktivitesi seap aktivitesine oranlanarak normalize edildi.

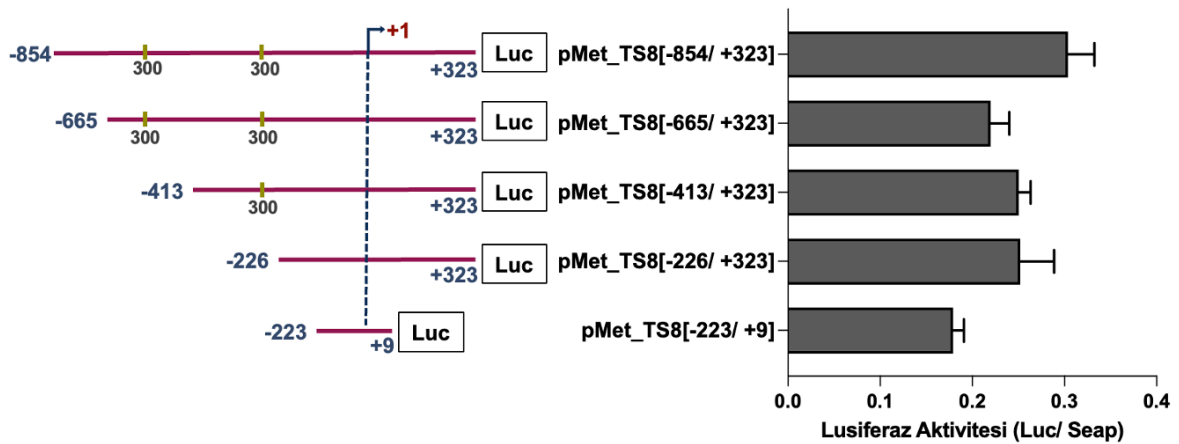
Kalsiyum-fosfat presipitasyonu ile geçici transfeksiyon deneylerinde pMetLuc Kontrol ve pMetLuc Reporter transfeksiyonu bölüm 3.2.5'te anlatıldığı gibi kuyucuk başı 500.000 hücre içeren 12 kuyucuklu plakalara altı tekrarlı olacak şekilde tasarlandı. Geçici transfeksiyon uygulamasının 48 ve 72. saatlerinde ortamdan 50 µL medyum çekildi ve bölüm 3.2.5.1'de anlatılan şekilde lusiferaz ve seap aktiviteleri luminometre yardımıyla ölçüldü. Elde edilen Lusiferaz/Seap değerleri GraphPad programı kullanılarak grafiklendirildi. Değerlendirilmeler sonucunda transfeksiyon etkinliğinin 48. saatte on kata kadar ulaştığı ve bu etkinliğin 72. saatte yedi kata kadar devam ettiği gözlemlendi (*b.k.* Şekil 4.16).



Şekil 4.16: Kalsiyum-fosfat presipitasyon metodu ile geçici transfeksiyonun 48 ve 72. saatlerindeki etkinliği.

4.3.2 ADAMTS-8 Promotor Parçalarının Bazal Aktivitesinin Belirlenmesi

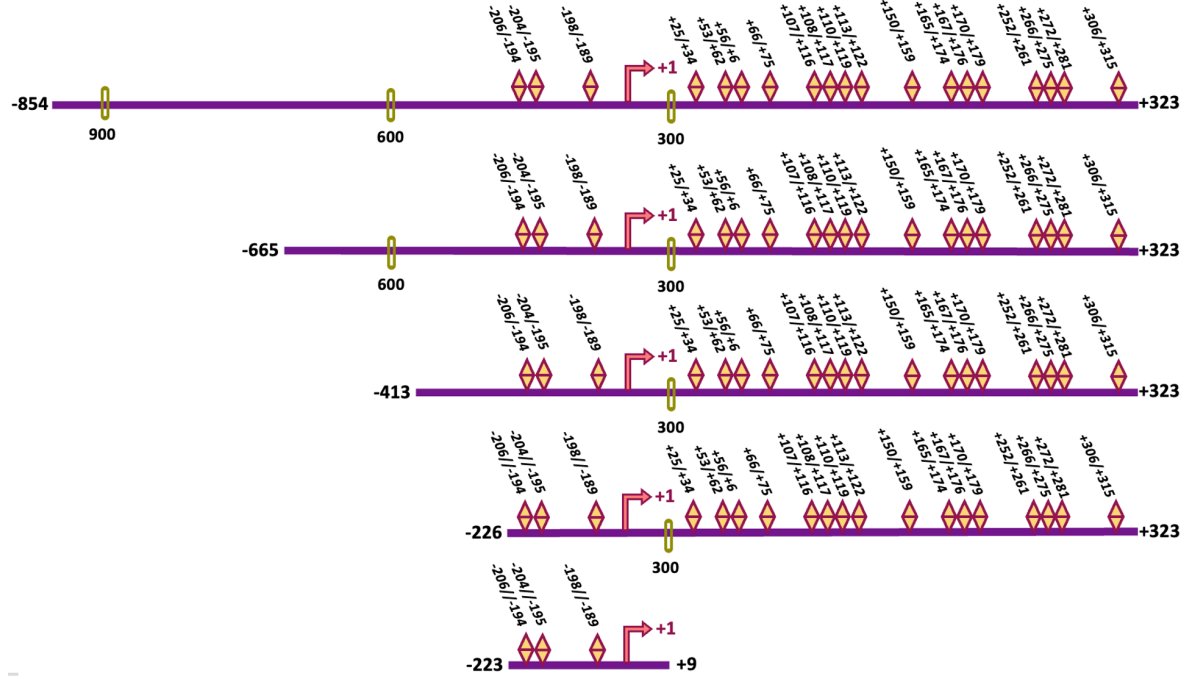
pMetLuc haberci gen vektörüne (pMetLuc Reporter) klonladığımız ADAMTS-8 promotor parçaları bölüm 3.2.5'te anlatılan şekilde 100mm'lik petri kaplarındaki SW480 hücrelerine 10µg olacak şekilde kalsiyum-fosfat metodu ile transfekte edildi. Ölçümlerde kullanacağımız tekrar sayısını arttırmak için her promotor parçasını içeren SW480 hücreleri 96 kuyucuklu plakalara kuyucuk başına 3×10^4 hücre olacak şekilde paylaştırıldı. Elde edilen lusiferaz aktivitesi, Seap aktivitesine bölünerek normalize edildi. Tüm bazal aktiviteler kıyaslandığında TS-8[-854/+323] promotor parçasının en yüksek bazal aktiviteyi gösterdiği tespit edildi (*b.k.* Şekil 4.17).

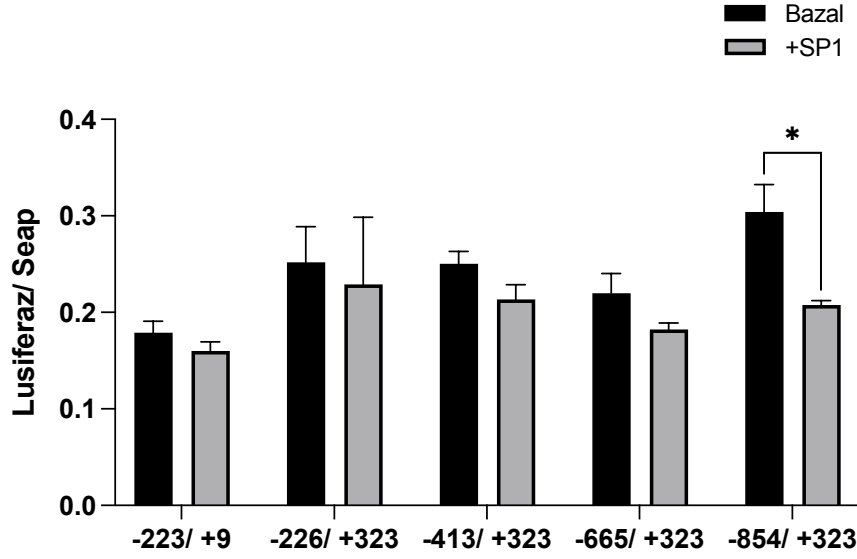


Şekil 4.17: ADAMTS-8 promotor parçalarının bazal aktivitelerinin karşılaştırılması.

4.3.3 ADAMTS-8 Promotoru *In Siliko* Analizi ve Kotransfeksiyon Çalışmaları

ADAMTS-8 geninin promotoruna bağlanması muhtemel transkripsiyon faktörleri incelendiğinde özellikle SP1 transkripsiyon faktörünün bağlanma bölgelerinin promotorda oldukça yoğun olduğu PROMO programı yardımıyla tespit edildi. Tespit edilen bağlanma bölgeleri ADAMTS-8 promotor parçalarında SP1 bağlanma alanlarını işaretleyecek şekilde diyagramda gösterildi (b.k. Şekil 4.18).

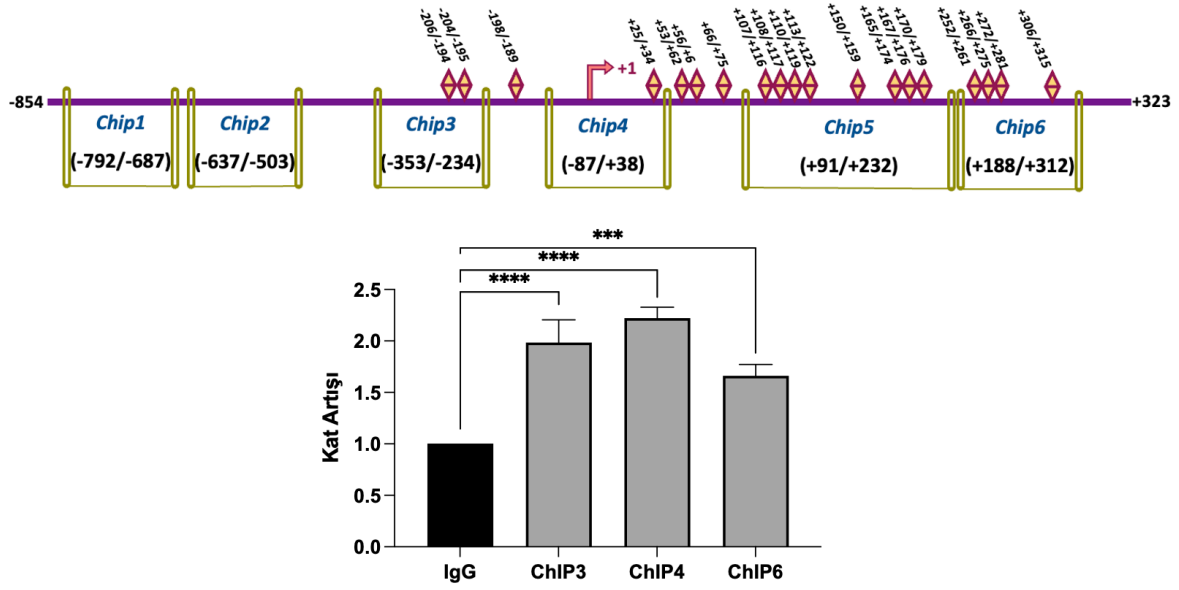




Şekil 4.19: ADAMTS-8 promotor parçalarının SP1 ile kotransfeksiyonu sonucu karşılaştırmalı lusiferaz aktiviteleri.

4.3.4 ADAMTS-8 Promotoruna Bağlanan SP1 Transkripsiyon Faktörünün ChiP Analizi ile Belirlenmesi

ADAMTS-8 promotorundaki muhtemel bağlanma bölgelerini belirlediğimiz SP1 transkripsiyon faktörünün promotora fonksiyonel olarak bağlanıp bağlanmadığını belirlemek amacıyla spesifik ChiP primerleri tasarlandı. Öncelikli olarak SW480 hücrelerinde SP1 over ekspresyonu gerçekleştirildi ve bu hücrelerden bölüm 3.2.8'deki prosedür kapsamında hücre lizatları elde edildi. İmmünopresipitasyon işlemi için spesifik SP1 antikorunu kullanıldı. Oluşan DNA/Protein kompleksi ayrıştırılarak elüsyon alındı ve kolon sistemi yardımıyla DNA saf hale getirildi. DNA örnekleri bölüm 3.2.6.6'da belirtilen şekilde qRT-PCR reaksiyonunda kullanıldı. Elde edilen veriler IgG antikorunu uyguladığımız negatif kontrol grubuna göre kat alınarak değerlendirildi ve GraphPad programı yardımıyla grafiklendirildi (*b.k.* Şekil 4.20). Bu sonuçlar doğrultusunda SW480 hücre hattında SP1 transkripsiyon faktörünün ADAMTS-8 promotorunda belirlenen ChiP 3, ChiP 4 ve ChiP 6 bölgelerine istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde fonksiyonel olarak bağlandığı tespit edildi.



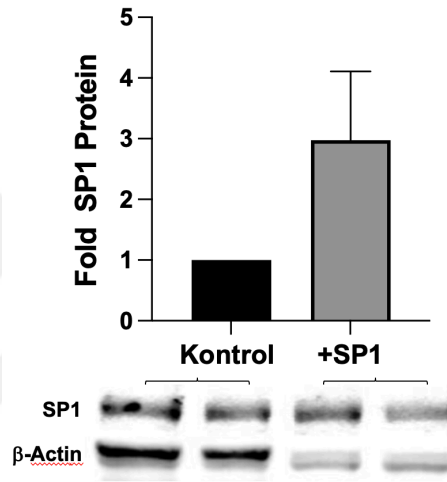
Şekil 4.20: ADAMTS-8 promotoruna bağlanan SP1 transkripsiyon faktörünün ChIP analizi.

4.4 C/EBP, USF ve SP1 Transkripsiyon Faktörünün ADAMTS-8 Geninin Regülasyonuna Etkisi

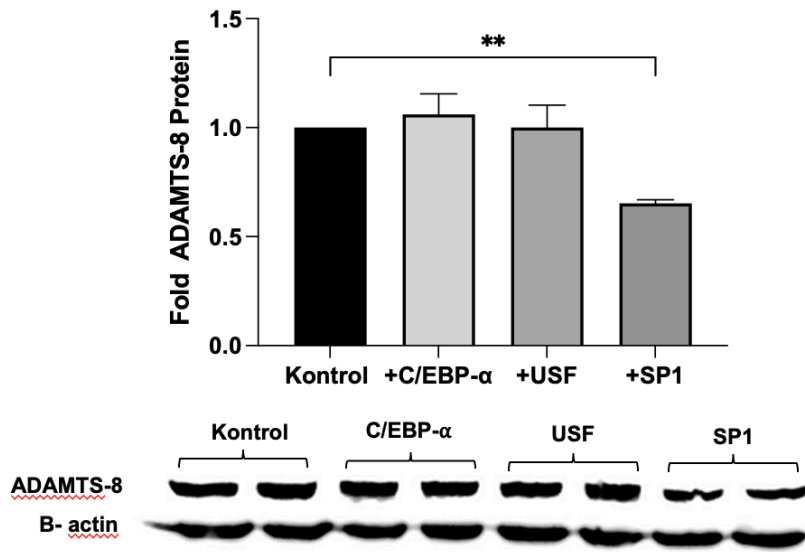
4.4.1 SP1, USF, C/EBP Transkripsiyon Faktörlerinin ADAMTS-8 Protein İfadesine Etkisinin Western Blot ile Belirlenmesi

SW480 hücrelerinde SP1 transfeksiyon faktörünün over ekspresyonunu kanıtlamak ve ADAMTS-8 geninin C/EBP, USF ve SP1 aracılı regülasyonunu protein düzeyinde incelemek amacıyla öncelikle bölüm 3.2.5'te belirtilen şekilde transkripsiyon faktörleri kalsiyum fosfat metodu ile geçici olarak hücrelere transfekte edildi. Transfeksiyonun 48. saatinde bölüm 3.2.7.2'de belirtilen rıpa ile kazıma yöntemi kullanılarak protein ekstraktları elde edildi bu işlemde transfeksiyon işlemi gerçekleştirilmemiş olan grup kontrol grubu olacak şekilde adlandırıldı. Elde edilen proteinler 30 µg olacak şekilde bölüm 3.2.7.4'te belirtildiği gibi SDS page jeline yüklendi ve 80 V'da serbest mA'da yürütüldü. Daha sonra PVDF membrana aktarım için ıslak transferde 1 gece +4 derecede inkübe edildi. Ertesi gün non-spesifik bağlanmaları engellemek için bölüm 3.2.7.4'de tarif edilen şekilde membranlar süt tozu ile bloklandı. Yıkama basamakları gerçekleştirildikten sonra membranlardan biri SP1 over ekspresyonu kanıtlamak amacıyla SP1 antikoru (1:400) ile gece boyu +4 derecede inkübe edildi ve ertesi gün anti-rabbit ikincil antikoru (1:5000) ile 1 saat oda sıcaklığında bölüm 3.2.7.6'da anlatılan şekilde muamele edildi. Diğeri ise ADAMTS-8 antikoru (1:500, mouse) ile gece boyu +4 derecede muamele edildi. Membranlar daha sonra normalizatör

olarak kullanacağımız β -aktin (1:5000, mouse) antikoruna ile 1,5 saat oda sıcaklığında muamele edildi ve anti-mouse ikincil antikor (1:10000) ile 1 saat muameleye bırakıldı. Yıkama basamaklarının ardından ECL çözeltisi kullanılarak bölüm 3.2.7.7’de belirtilen şekilde bantlar görünür hale getirildi. Elde edilen bantların densitometrik analizleri Image J programı yardımıyla hesaplandı. Çift terkar olacak şekilde jelle yüklenen protein örnekleri GraphPad programı yardımıyla istatistiksel olarak analiz edildi. Analiz sonucunda SW480 hücrelerinde SP1 transkripsiyon faktörünün protein düzeyinde 3 kata kadar over ekspresyonu olduğu (*b.k.* Şekil 4.21) ve ADAMTS-8 protein seviyesini azalttığı gözlemlendi (*b.k.* Şekil 4.22).



Şekil 4.21: SW480 hücre hattında SP1 transfeksiyon faktörünün over ekspresyonunun protein düzeyinde ifadesi.

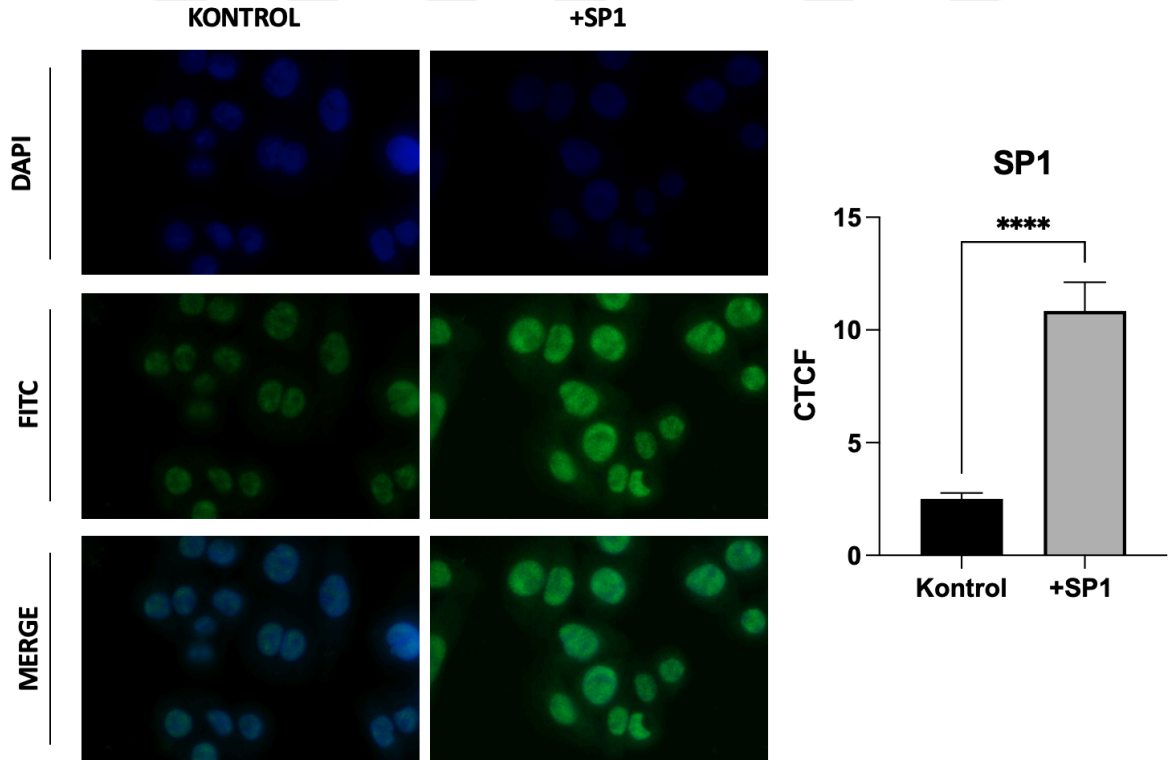


Şekil 4.22: SW480 hücrelerinde C/EBP- α , USF ve SP1 transkripsiyon faktörlerinin geçici transfeksiyonunun ADAMTS-8 protein ifadesine etkisi.

4.4.2 SP1 Transkripsiyon Faktörünün ADAMTS-8 Protein İfadesine Etkisinin İmmüno Floresan Yöntemi ile Gösterimi

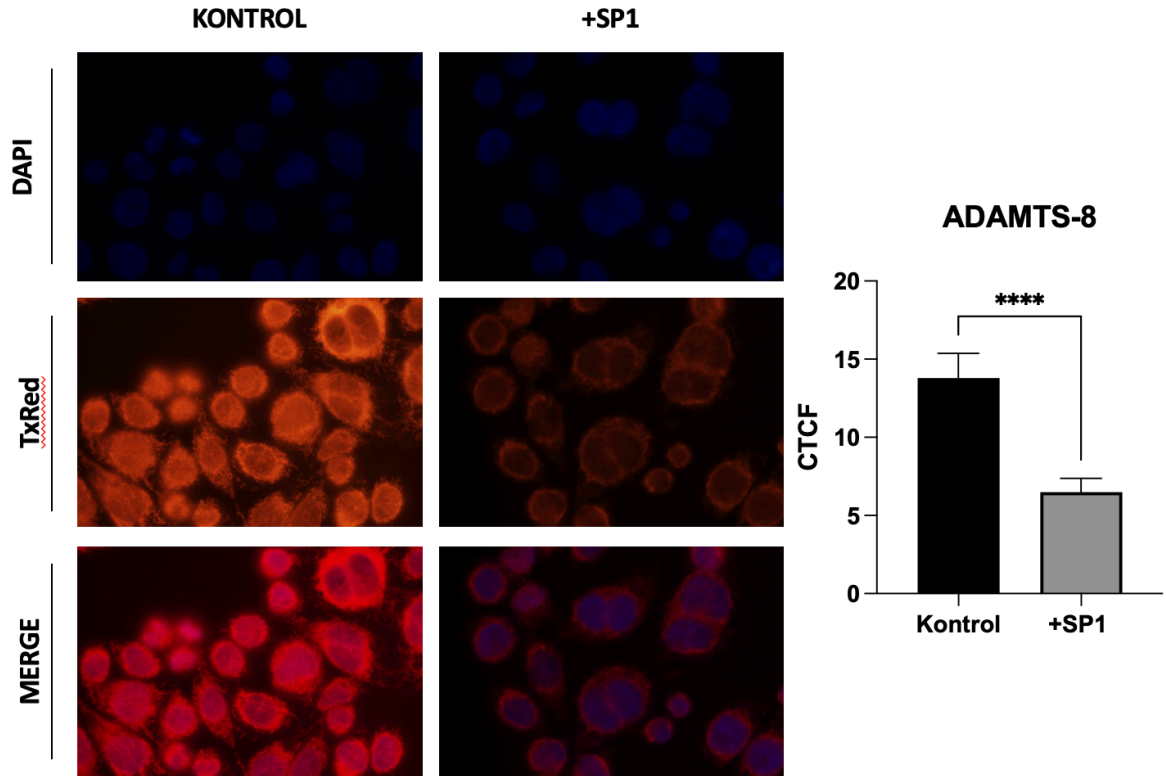
ADAMTS-8 ve SP1 proteinin lokalizasyonunu görüntülemek ve SP1 over ekspresyonunun ADAMTS-8 ifadesine etkisini incelemek amacıyla immüno floresan deneyini gerçekleştirdik. Bunun için öncelikle SW480 hücre hattında SP1 transkripsiyon faktörü over ekspre edildi. Daha sonra hem kontrol grubu hem de over ekspresyona uğramış olan hücreler, bölüm 3.2.7.3'te anlatılan şekilde hazırlanmış olan 24 kuyucuklu plakaya kuyucuk başına 125×10^3 hücre olacak şekilde paylaştırıldı. Hücreler yüzeye fikse edildikten sonra sırasıyla primer ve sekonder antikorlarla muamele edildi. Çekirdek boyaması için DAPI ile muamelenin ardından hazır hale getirilen preparatlar floresan mikroskobu yardımıyla fotoğraflandı ve Image J programı ile analiz edildi.

Elde edilen sonuçlara göre Anti-rabbit IgG (H+L), F(ab')₂ Fragment (Alexa Fluor® 488 Conjugate) sekonder antikor ile işaretlenen SP1 proteininin özellikle nükleusta lokalize olduğunu ve kontrol grubuna ile kıyaslandığında over ekspresyonun neredeyse 5 kat gerçekleştiği kanıtlanmıştır.



Şekil 4.23: SW480 hücre hattında SP1 over ekspresyonunun immüno floresan yöntemi ile gösterimi.

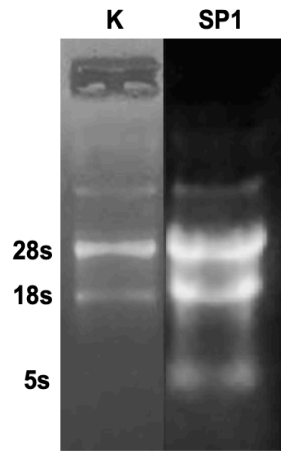
SP1 over ekspresyonuna uğrayan SW480 hücrelerinde ADAMTS-8 ifadesindeki değişikliği belirlemek için bölüm 3.2.7.3'te belirtilen şekilde ADAMTS-8 primer antikorundan (1/100) sonra Anti-mouse IgG (H+L), F(ab')₂ Fragment (Alexa Fluor® 594 Conjugate) sekonder antikor kullanıldı. Floresan görüntüleme sonucunda ADAMTS-8 proteinin sitoplazmada lokalize olduğunu ve western blot analiziyle uyumlu olacak şekilde SP1 over ekspresyonu sonrasında SW480 hücrelerindeki ifadesinin neredeyse yarıya düştüğü tespit edildi.



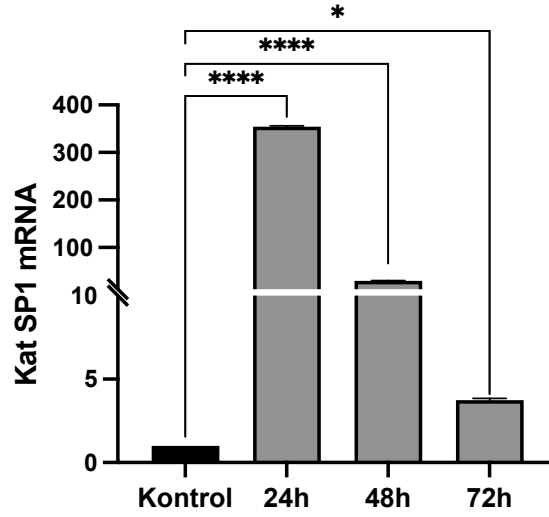
Şekil 4.24: SW480 hücre hattında SP1 over ekspresyonu ile ADAMTS-8 ifadesindeki değişikliğin immünofloresan ile gösterimi.

4.4.3 SP1 Transkripsiyon Faktörünün ADAMTS-8 mRNA İfadesine Etkisinin qRT-PCR Yöntemi ile Belirlenmesi

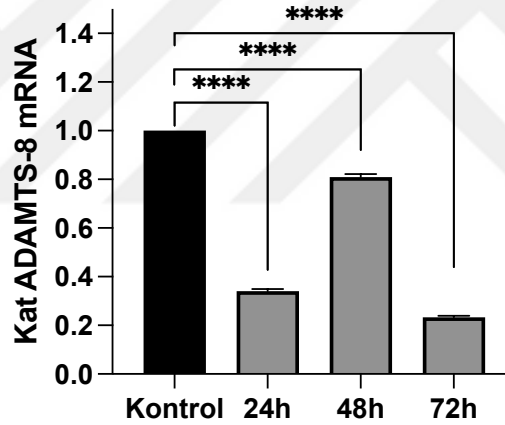
ADAMTS-8 genini protein düzeyinde regüle ettiğini belirlediğimiz SP1 transfeksiyon faktörünün mRNA düzeyinde ADAMTS-8 ifadesine etkisini belirlemek amacıyla SW480 hücrelerinde SP1 over ekspresyonu gerçekleştirildi. Transfeksiyonun 24, 48 ve 72. saatlerinde bölüm 3.2.4.5'te belirtilen şekilde hücreler tripsinizasyon işlemi yardımıyla pellet haline getirildi. Elde edilen pelletlerden bölüm 3.2.6.1'de anlatılan prosedür takip edilerek RNA izolasyonu gerçekleştirildi. İzole edilen RNA'lar bölüm 3.2.6.3'te belirtilen şekilde hazırlanmış formaldehit jel elektroforezi yardımıyla görüntülendi (*b.k.* Şekil 4.23). Bölüm 3.2.6.2'de belirtilen hesaplamalar kullanılarak RNA miktar tayini yapıldı ve cDNA sentezi gerçekleştirildi. SW480 hücre hattında SP1 transkripsiyon faktörünün over ekspresyonunun mRNA düzeyinin belirlenmesi için spesifik SP1 ekspresyon primerleri, SP1 over ekspresyonunun ADAMTS-8 mRNA düzeyine etkisinin belirlenmesi amacıyla Spesifik ADAMTS-8 ekspresyon primerleri ve H β -2-M ekspresyon primerleri kullanılarak bölüm 3.2.6.6'da belirtilen şekilde gerçek zamanlı PCR (qRT-PCR) reaksiyonu kuruldu. SP1 transfekte edilmemiş hücreler kontrol grubu olarak kullanıldı ve her örnek 3 tekrarlı olacak şekilde çalışıldı. Elde edilen değerler Livak metoduna göre analiz edildi ve GraphPad programı yardımıyla grafiklendirildi. Analizler sonucunda SW480 hücre hattında SP1 over ekspresyonunun 300 kata kadar arttığı ve saate bağlı olarak geçici transfeksiyon etkinliğinin azaldığı gözlemlendi (*b.k.* Şekil 4.24). Öte yandan SP1 over ekspresyonunun ADAMTS-8 mRNA seviyesini kontrol grubuna göre üç saat diliminde de istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde azalttığı tespit edildi (*b.k.* Şekil 4.25).



Şekil 4.25: SW480 hücrelerinden elde edilen kontrol ve SP1 over ekspresyon grubuna ait RNA'ların formaldehit agaroz jel görüntüsü.



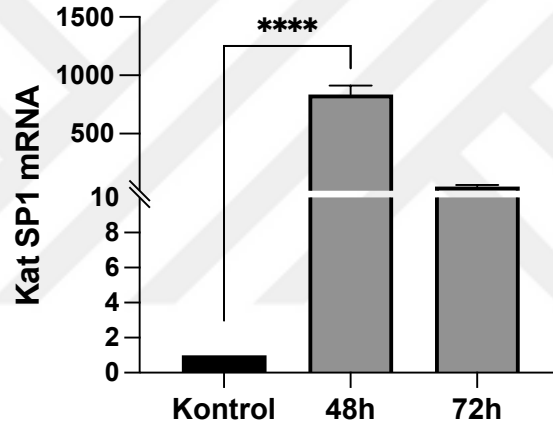
Şekil 4.26: SW480 hücre hattında SP1 over ekspresyon seviyesinin saate bağlı değişimi.



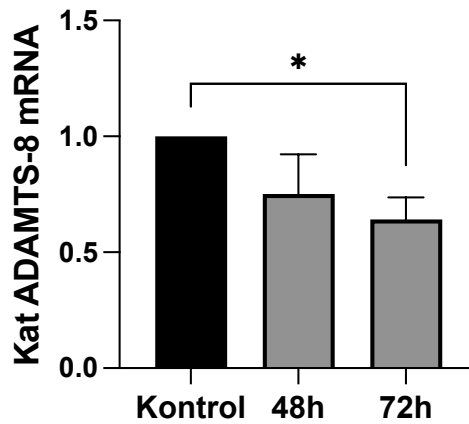
Şekil 4.27: SW480 hücre hattında SP1 over ekspresyonunun ADAMTS-8 mRNA ifadesine etkisinin saate bağlı değişimi.

SP1 over ekspresyonunun ADAMTS-8 gen ifadesini hem protein hem de mRNA düzeyinde SW480 hücre hattında azalttığı gözlemlendi. Bu kapsamda SP1 over ekspresyonunun farklı hücre hatlarında ADAMTS-8 gen ifadesine etkisini incelemek için Saos-2 hücre hattı yan model olarak çalışıldı. Çalışmada Bölüm 3.2.5'te belirtilen şekilde Saos-2 hücreleri büyütüldü ve kalsiyum fosfat metodu kullanılarak geçici transfeksiyon işlemi gerçekleştirildi. SP1 over ekspre edilmemiş hücreler kontrol grubu olarak kullanıldı. Bölüm 3.2.6.1'de anlatılan protokol takip edilerek transfeksiyonun 48 ve 72. saatlerinde Saos-2 hücrelerinden RNA izolasyonu gerçekleştirildi. RNA miktarı bölüm 3.2.6.2'de verilen

formül kullanılarak belirlendi ve cDNA sentezi gerçekleştirildi. SP1 over ekspresyonunun Saos-2 hücre hattındaki mRNA düzeyinin belirlenmesi için spesifik SP1 ekspresyon primerleri kullanılırken, over ekspresyonun ADAMTS-8 gen ifadesine etkisinin belirlenmesi için spesifik ADAMTS-8 ekspresyon primerleri kullanıldı. Her cDNA örneği 3 tekrarlı olacak şekilde qRT-PCR reaksiyonunda bölüm 3.2.6.6’da belirtilen şekilde çalışıldı. Elde edilen değerler Livak metoduna göre insan β -2-M geninin değerlerine bölünerek normalize edildi. Kat değerleri GraphPad programı yardımıyla grafiklendirildi. Analizler sonucunda Saos-2 hücre hattında istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde SP1’in 800 kata kadar over ekspre olduğu ve ADAMTS-8 gen ifadesini mRNA düzeyinde azalttığı tespit edildi (b.k. Şekil 4.26-27).



Şekil 4.28: Saos-2 hücre hattında SP1 over ekspresyon seviyesinin saate bağlı değişimi.



Şekil 4.29: Saos-2 hücre hattında SP1 over ekspresyonunun ADAMTS-8 mRNA ifadesine etkisinin saate bağlı değişimi.

5. SONUÇLAR VE ÇIKARIMLAR

Gen regülasyonu, canlı organizmaların temel biyolojik süreçlerini düzenlemek ve koordine etmek amacıyla kritik bir role sahiptir. Gen ifadesinin sıkı bir kontrol altında tutulması aracılığıyla, organizmaların çevresel değişikliklere uyum sağlamasını, hücrelerin özelleşmesini, farklılaşmasını ve gelişim süreçlerini düzenlemeyi hedefler. Prokaryotlarda, gen regülasyonu operonlar üzerinden gerçekleşir. Operonlar, bir araya gelmiş genlerin ortak düzenlemeye tabi tutulduğu yapıları ifade eder [168]. Ökaryotlarda ise gen regülasyonu daha komplekstir ve çeşitli mekanizmalar içerir [169]. Transkripsiyon faktörleri, epigenetik modifikasyonlar ve DNA sarmalının yapısı gibi faktörler bu süreci yönlendirir. Her genin kendine özgü bir promotor bölgesi vardır ve bu bölgelere transkripsiyon faktörleri bağlanarak hücre bölünmesi, farklılaşma, embriyonik gelişim gibi süreçleri kontrol eder. Bu faktörler, DNA üzerinde belirli dizilere bağlanarak gen ifadesini özelleştirir. Ayrıca, bu faktörlerin 3 boyutlu yapıları, DNA bağlama özgülüğünü belirler [170].

Giriş kısmında belirtildiği gibi, çinko parmaklar, gen ifadesinin düzenlenmesinde kilit bir mekanizma olan transkripsiyon faktörlerinin yapısını oluşturmaktadır. Özellikle SP1'in gen düzenleme yeteneği, birçok önemli biyolojik süreçte kritik rol oynayan faktörlerin transkripsiyonunu etkileyebilme kapasitesiyle ilişkilidir. SP1, transkripsiyonun başlamasını yönlendiren TATA kutusu bulunmayan promotorlarda yer alan GC açısından zengin motifleri (GC/GT kutuları) tanıyan üç çinko parmak içermektedir. Bu motiflere bağlanarak, SP1, RNA polimeraz II'nin doğru konumda yerleşmesine ve transkripsiyonun başlatılmasına etkili bir şekilde yardımcı olur. SP1 aynı zamanda metastaz süreçlerinde etkili olan faktörlerin ifadesini düzenleyerek kanserin yayılmasına katkıda bulunmaktadır [171].

ADAMTS'ler memeli ve omurgasızlarda bulunan, hücreler arası matriksin yapısal proteinleri işleyen matriks metalloproteinazlardır [145]. ADAMTS ailesi üyelerinin; morfogenez, anjiyogenez, hücre adezyonu, prokollejen ve von Willebrand faktörünün matürasyonu, proliferasyon, migrasyon, kanser, ovulasyon ve artrit ile ilgili hücre dışı matriksin işlenmesinde görev aldığı belirlenmiştir [172]. ADAMTS ailesi üyeleri çeşitli biyolojik süreçlerde yer aldığı gibi osteoartrit ve ateroskleroz gibi patolojik süreçlerle ve Ehler-Danlos Sendromu, Weill-Marchesani Sendromu, Trombositopenik Purpura gibi bazı genetik defekt ve bozukluklarla da ilişkilendirilmişlerdir [173]. Özellikle kalp ve akciğerlerde yüksek düzeyde ifade olduğu belirlenen ailenin METH-2 olarak da bilinen

üyesi ADAMTS-8, ADAMTS-1 ile ailenin antianjiyogenik olarak tanımlanan üyelerindendir [107]. Ailenin diğer üyelerinden ADAMTS1, 4, 5 ve 15 ile yüksek dizi homolojisi gösterir ve hücre dışı matriks proteoglikanlarını parçalayabilmektedir. ADAMTS-8'in, bazı kanser tiplerinde promotor metilasyonu ile ifadesinin baskılandığı ve azalan ADAMTS-8 ifadesinin çoğunlukla kanser hücrelerinin invazyon ve metastazı ile ilişkili olduğu belirlenmiştir [174]. Li ve arkadaşları, ADAMTS-8'in Kolorektal kanser (CRC) hücre hatlarında ve primer tümör dokularında önemli ölçüde azaldığını gözlemlemiştir. ADAMTS-8'in HCT116 ve HT-29 kolorektal kanserli hücre hatlarındaki ektopik ekspresyonunun hücre proliferasyonunu, invazyon ve migrasyonunu baskıladığı ve apoptozu indüklediğini göstermişlerdir [155].

ADAMTS-8 geninin kendi düzenleyici mekanizmaları henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Transkripsiyonel düzenlemenin, ADAMTS-8 promotorunun nasıl düzenlendiği konusunda, bu genin temel transkripsiyonel aktivatörleri veya baskılayıcıları hakkında literatürde herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Fakat literatüre bakıldığında GC bazları açısından zengin promotor sekansına sahip olan bazı ADAMTS ailesi üyelerinin SP1 aracılı regülasyonları konusunda yapılan çalışmalar bulunmaktadır. Örneğin; ADAMTS-1 geninin progesteron aracılı regülasyonu, C/EBP β , NF1-benzeri faktör ve SP1/3 faktörleri aracılığıyla dolaylı olarak sağlandığı belirtilmektedir [175]. Yine SP1'in ADAMTS-16 promotor aktivitesini indüklediği gösterilmiştir [176]. SP1'in, MMP3 ve ADAMTS-4 genlerinin TNF- α aracılı upregülasyonunda görev yaptığı belirlenmiştir. Ekibimiz tarafından ailenin bir diğer üyesi prokollajen N proteinaz alt grubuna dahil ADAMTS-3'ün osteosarkomada SP1 ile regüle olduğu çalışılmıştır. 2016 yılında ise HEP3B hücrelerinde normoksik koşulda SP1 tarafından baskılandığı bulunmuştur. Bu baskılanma hipoksik durumda korunamadığı belirlenmiştir. Ayrıca 2018 yılında SP1 transkripsiyon faktörünün, Saos-2 ve MG63 hücrelerindeki ADAMTS3 transkripsiyonel aktivitesini azalttığı da bulunmuştur.

Yapılan biyoinformatik analizlerle ADAMTS-8 promotorunun GC bazları açısından zengin bir içeriğe sahip olduğu hatta çalışılan bölgede CpG adalarının oluşma potansiyelinin yüksek olduğu belirlendi. Hem ailenin diğer üyelerinin regülasyonunda görev alması hem de ADAMTS-8 promotorunda oldukça fazla bağlanma alanı bulunması SP1 Transkripsiyon faktörünü çalışmamız için dikkat çekici hale getirmiştir. Bu sebeple ADAMTS-8 geninin

SP1 aracılı regülasyonunu incelememiz ADAMTS-8'in transkripsiyonel düzenlemesi üzerine yapılmış ilk araştırma niteliğindedir.

Yapılan analizler sonucunda ilk olarak ADAMTS-8 geninin transkripsiyon başlangıç noktasını, UTR bölgesini, TATA kutusunu ve ATG bölgesini promotor bölgesindeki sırasıyla mor, mavi, turuncu ve kırmızı renklerle işaretlenerek belirtildi. EMBOSS CpG Plot analizi, (+277/-57) bazlar arasında potansiyel bir CpG adası oluşumunu işaret etti bu durum genin epigenetik düzenleme açısından önemlidir. Promotor bölgesinin %GC içeriği özellikle (-199/+98) baz çiftleri arasındaki yüksek GC içeriği, genin transkripsiyonel düzenlemede etkili olabilecek önemli bir özellik olarak öne çıkmaktadır. Ayrıca, (+273/+56) baz lokasyonlarında bulunan 'GGCGCGGGCAGG' dizisi, saç tokası yapılarıyla belirginleşmiş, bu da promotorun karmaşıklığını artırmaktadır. Sekonder yapı analizi ile ADAMTS-8 promotor bölgesinde 12 farklı yapı tespit edildi. Bu yapıların enerji seviyeleri, genin transkripsiyonel aktivitesi üzerinde olası bir etkiye işaret edebilir.

119Z101 numaralı proje kapsamında İnsan ADAMTS-8 genine ait promotor bölgesinin klonlanma çalışmaları için ilk olarak gen bankasında bulunan ADAMTS-8 (GenBank erişim no: NM_007037.6) geninden yararlanılarak transkripsiyon başlangıç noktasından yaklaşık 1177 bp üst bölgede bulunan muhtemel promotor bölgesini genomik DNA'yı kalıp olarak kullanıldı ve spesifik primerlerle çoğaltılarak pGEM-T easy vektörüne klonlandı. Daha sonra transkripsiyonel aktivite çalışmalarında kullanılmak üzere 5' ucu sabit tutularak beş farklı boyutta TS-8[-854/+323], TS-8[-665/+323], TS-8 [-413/+323], TS-8[-226/+323] ve TS-8[-223/+9] ADAMTS-8 promotor parçası pMet Luc vektörüne klonlandı. Dizi analizi ile doğrulandıktan sonra her bir promotor parçası SW480 hücrelerine geçici olarak transfekte edildi. Transfeksiyonun 48. Saatinde ölçülen lusiferaz aktiviteleri karşılaştırmalı olarak grafiklendirildi. ADAMTS-8 geninin en yüksek promotor aktivitesinin TS-8[-854/+323] promotor parçasına ait olduğu gözlemlendi.

ADAMTS-8 promotoru PROMO program yardımıyla in silico olarak analiz edildi. ADAMTS-8 promotorunda bağlanma bölgesi oldukça çok olan SP1 transkripsiyon faktörünün, ADAMTS-8 promotor parçalarının aktivitesine etkisi ko-transfeksiyon çalışmaları ile araştırılmıştır. SP1 ekspresyon vektörleri her bir promotor parçası ile birlikte geçici transfeksiyon metodu ile SW480 hücrelerine transfekte edildi. Sonucunda SP1'in transkripsiyonel aktiviteyi azaltıcı yönde etki ettiği ve promotor parçalarından TS-8[-854/+323]'ü anlamlı bir şekilde regüle ettiği

tespit edildi. Bu durum SP1'in diğ er ADAMTS aile  yerinin regülasyonuna etkisinden farklılığıyla dikkat çekicidir.

ADAMTS-8 promotorundaki muhtemel bağlanma bölgelerini belirlediğimiz SP1 transkripsiyon faktörünün promotora fonksiyonel olarak bağlanıp bağlanmadığını belirlemek amacıyla spesifik ChIP analizi gerçekleştirildi. ADAMTS-8(-353/-234), ADAMTS-8(-87/+38) ve ADAMTS-8(+188/+312) bölgelerine bağlanmanın gerçekleştiği doğrulandı. Sonuçlar, SP1'in ADAMTS-8 promotor bölgesine spesifik olarak bağlandığını ve bu bölgelerde transkripsiyonel aktivitesini düzenlediğini göstermektedir. Özellikle, ADAMTS-8 geninin düzenlenmesinde önemli bir rol oynayan SP1'in, belirlenen bu bağlanma bölgelerindeki aktivitesi, genin ekspresyon düzeyi üzerinde etkili olabilir. Bu bağlamda, SP1'in ADAMTS-8 geninin regülasyonunda spesifik bir rol oynadığı görülmektedir. Bunun yanı sıra, elde edilen bu sonuçlar, ADAMTS-8'in regülasyonunda başka faktörlerin de potansiyel olarak etkili olabileceğini düşündürmektedir.

C/EBP, USF ve SP1'in ADAMTS-8 geninin regülasyonuna etkisini belirlemek için üç transfeksiyonun faktörünü içeren ekspresyon vektörü geçici transfeksiyon yöntemi ile ayrı ayrı SW480 hücre hattında over ekspre edildi. Deney gruplarından elde edilen proteinler western blot analizine götürüldü. Spesifik ADAMTS-8 antikoru ile muamelenin ardından C/EBP ve USF'nin ADAMTS-8 protein seviyesinde herhangi bir değişikliğe sebep olmadığını gözlemlerken, SP1 transkripsiyon faktörünün ADAMTS-8 protein seviyelerini neredeyse iki kat azalttığı dikkat çekici bir şekilde gözlemlendi. Benzer şekilde gerçekleştirdiğimiz immünofloresan deneyinde SP1 over ekspresyonunun sitoplazmada konumlanmış olan ADAMTS-8 protein seviyesini neredeyse yarıladığını bir kez daha gözlemledik. Bu bulgu, daha önce yürütülen çalışmamızda elde ettiğimiz SP1'in ADAMTS-8 promotor aktivitesini düzenleme yeteneği ile uyumlu bir sonuç olarak ortaya çıkmıştır. SP1'in ADAMTS-8 ekspresyonunu negatif yönde etkilemesi, genin promotor bölgesiyle etkileşerek transkripsiyonel düzenlemeye katkı sağladığını  ne sürdüğümüz bulgularımızla tutarlılık göstermektedir.

ADAMTS-8 genini protein düzeyinde regüle ettiğini belirlediğimiz SP1 transfeksiyon faktörünün mRNA düzeyinde ADAMTS-8 ifadesine etkisini belirlemek amacıyla SW480 hücrelerinde geçici transfeksiyon metodu ile SP1 over ekspresyonu gerçekleştirildi. Farklı zaman aralıklarında toplanan RNA'lerden cDNA sentezlendi. qRT-PCR metodu yardımıyla

hem saate bağlı over ekspresyon seviyesi tespit edildi hem de SP1 transkripsiyon faktörünün ADAMTS-8 mRNA seviyesine etkisi belirlendi. Analiz sonuçlarına göre, SW480 hücre hattında gerçekleştirilen SP1 over ekspresyonunun, 300 kata kadar bir artışa ulaştığı ve zaman içinde geçici transfeksiyon etkinliğinin azaldığı gözlemlendi. Öte yandan SP1 over ekspresyonunun ADAMTS-8 mRNA seviyesini kontrol grubuna göre 24, 48 ve 72 saatlerinin tümünde istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde 5 kata kadar azalttığı tespit edildi.

SP1 over ekspresyonunun ADAMTS-8 gen ifadesini hem protein hem de mRNA düzeyinde SW480 hücre hattında azalttığı gözlemlendi. Bu kapsamda SP1 over ekspresyonunun farklı hücre hatlarında ADAMTS-8 gen ifadesine etkisini incelemek için Saos-2 hücre hattı yan model olarak çalışıldı. Geçici transfeksiyon metodu ile SP1 ekspresyon vektörü SAOS-2 hücrelerine transfekte edildi. Transfeksiyondan 48 saat sonra hücrelerden RNA izole edildi ve cDNA sentezlendi. qRT-PCR metodu kullanılarak hem SP1 over ekspresyonu hem de ADAMTS-8 mRNA seviyesi saate bağlı olarak belirlendi. Analizler sonucunda SP1 over ekspresyonu, ADAMTS-8 mRNA seviyesini SW480 hücre hattında olduğu gibi SAOS-2 hücrelerinde de anlamlı bir şekilde azaltmıştır. Bu bulgular, SP1'in ADAMTS-8 gen ifadesini düzenleyen etkisinin, farklı hücre hatlarında benzer şekilde gerçekleştiğini göstermektedir.

Sonuç olarak bu çalışmada ADAMTS-8 promotörü fonksiyonel olarak ilk kez analiz edildi. Ve çinko parmak ailesinin üyesi olan SP1 transkripsiyon faktörünün ADAMTS-8 genini transkripsiyonel regülasyonundaki rolü ilk kez araştırıldı. Yapılan SP1 over ekspresyon deneyleri hem protein hem de mRNA düzeyinde ADAMTS-8 ekspresyonunun azaldığını doğrulamıştır. Bu durum, SP1'in ADAMTS-8 geninin promotor bölgesine spesifik olarak bağlandığını ve bu bağlanmanın transkripsiyonel aktiviteyi inhibe ettiğini göstermektedir.

6. KAYNAKLAR

- [1] B. Alberts, Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. , *Molecular Biology of the Cell*. . Garland Science., (2014). .
- [2] H. Lodish, Berk, A., Zipursky, S. L., Matsudaira, P., Baltimore, D., & Darnell, J. (*Molecular Cell Biology*. . W. H. Freeman., 2016). .
- [3] J. Smith, Brown, D., & McInnes, R. , *Gene Regulation and Metabolism: Post-Genomic Computational Approaches*. . Cambridge University Press., 2006
- [4] J. T. Kadonaga, "Regulation of RNA polymerase II transcription by sequence-specific DNA binding factors," *Cell*, vol. 116, no. 2, pp. 247-57, Jan 23 2004, doi: 10.1016/s0092-8674(03)01078-x.
- [5] M. C. Thomas and C. M. Chiang, "The general transcription machinery and general cofactors," *Crit Rev Biochem Mol Biol*, vol. 41, no. 3, pp. 105-78, May-Jun 2006, doi: 10.1080/10409230600648736.
- [6] S. T. Smale and J. T. Kadonaga, "The RNA polymerase II core promoter," *Annu Rev Biochem*, vol. 72, pp. 449-79, 2003, doi: 10.1146/annurev.biochem.72.121801.161520.
- [7] R. D. Kornberg, "Mediator and the mechanism of transcriptional activation," *Trends Biochem Sci*, vol. 30, no. 5, pp. 235-9, May 2005, doi: 10.1016/j.tibs.2005.03.011.
- [8] D. S. Latchman, "Transcription factors: an overview," *Int J Biochem Cell Biol*, vol. 29, no. 12, pp. 1305-12, Dec 1997, doi: 10.1016/s1357-2725(97)00085-x.
- [9] J.-C. Wang, "Finding Primary Targets of Transcriptional Regulators," *Cell Cycle*, vol. 4, no. 3, pp. 356-358, 2005/03/01 2005, doi: 10.4161/cc.4.3.1521.
- [10] A. Reményi, H. R. Schöler, and M. Wilmanns, "Combinatorial control of gene expression," *Nature Structural & Molecular Biology*, vol. 11, no. 9, pp. 812-815, 2004/09/01 2004, doi: 10.1038/nsmb820.
- [11] R. Wintjens and M. Rooman, "Structural Classification of HTH DNA-binding Domains and Protein – DNA Interaction Modes," *Journal of Molecular Biology*, vol. 262, no. 2, pp. 294-313, 1996/09/20/ 1996, doi: <https://doi.org/10.1006/jmbi.1996.0514>.
- [12] J. H. Laity, B. M. Lee, and P. E. Wright, "Zinc finger proteins: new insights into structural and functional diversity," *Current Opinion in Structural Biology*, vol. 11,

- no. 1, pp. 39-46, 2001/02/01/ 2001, doi: [https://doi.org/10.1016/S0959-440X\(00\)00167-6](https://doi.org/10.1016/S0959-440X(00)00167-6).
- [13] A. Klug, "The discovery of zinc fingers and their development for practical applications in gene regulation and genome manipulation," *Q Rev Biophys*, vol. 43, no. 1, pp. 1-21, Feb 2010, doi: 10.1017/s0033583510000089.
 - [14] S. Negi *et al.*, "The past, present, and future of artificial zinc finger proteins: design strategies and chemical and biological applications," *J Biol Inorg Chem*, vol. 28, no. 3, pp. 249-261, Apr 2023, doi: 10.1007/s00775-023-01991-6.
 - [15] J. M. Matthews and M. Sunde, "Zinc fingers--folds for many occasions," *IUBMB Life*, vol. 54, no. 6, pp. 351-5, Dec 2002, doi: 10.1080/15216540216035.
 - [16] S. A. Wolfe, L. Nekludova, and C. O. Pabo, "DNA recognition by Cys2His2 zinc finger proteins," *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, vol. 29, pp. 183-212, 2000, doi: 10.1146/annurev.biophys.29.1.183.
 - [17] W. S. Dynan and R. Tjian, "Isolation of transcription factors that discriminate between different promoters recognized by RNA polymerase II," *Cell*, vol. 32, no. 3, pp. 669-80, Mar 1983, doi: 10.1016/0092-8674(83)90053-3.
 - [18] W. S. Dynan and R. Tjian, "The promoter-specific transcription factor Sp1 binds to upstream sequences in the SV40 early promoter," *Cell*, vol. 35, no. 1, pp. 79-87, Nov 1983, doi: 10.1016/0092-8674(83)90210-6.
 - [19] S. Philipsen and G. Suske, "A tale of three fingers: the family of mammalian Sp/XKLF transcription factors," *Nucleic Acids Res*, vol. 27, no. 15, pp. 2991-3000, Aug 1 1999, doi: 10.1093/nar/27.15.2991.
 - [20] S. Denissov *et al.*, "Identification of novel functional TBP-binding sites and general factor repertoires," *Embo j*, vol. 26, no. 4, pp. 944-54, Feb 21 2007, doi: 10.1038/sj.emboj.7601550.
 - [21] G. Suske, "The Sp-family of transcription factors," *Gene*, vol. 238, no. 2, pp. 291-300, 1999.
 - [22] K. S. Moorefield, H. Yin, T. D. Nichols, C. Cathcart, S. O. Simmons, and J. M. Horowitz, "Sp2 localizes to subnuclear foci associated with the nuclear matrix," *Molecular biology of the cell*, vol. 17, no. 4, pp. 1711-1722, 2006.
 - [23] L. Li, S. He, J.-M. Sun, and J. R. Davie, "Gene regulation by Sp1 and Sp3," *Biochemistry and Cell Biology*, vol. 82, no. 4, pp. 460-471, 2004.

- [24] G. Hagen, S. Müller, M. Beato, and G. Suske, "Cloning by recognition site screening of two novel GT box binding proteins: a family of Sp1 related genes," *Nucleic acids research*, vol. 20, no. 21, pp. 5519-5525, 1992.
- [25] C. J. Sherr and J. M. Roberts, "CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression," *Genes & development*, vol. 13, no. 12, pp. 1501-1512, 1999.
- [26] L. Yuan, I.-S. Ahn, and P. F. Davis, "Inhibition of tyrosine phosphorylation of vascular endothelial growth factor receptors in human umbilical vein endothelial cells: a potent anti-angiogenic lipid-rich extract from shark," *Journal of medicinal food*, vol. 10, no. 4, pp. 657-661, 2007.
- [27] M. M. Kavurma and L. M. Khachigian, "Sp1 inhibits proliferation and induces apoptosis in vascular smooth muscle cells by repressing p21WAF1/Cip1 transcription and cyclin D1-Cdk4-p21WAF1/Cip1 complex formation," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 278, no. 35, pp. 32537-32543, 2003.
- [28] B. A. Olofsson, C. M. Kelly, J. Kim, S. M. Hornsby, and J. Azizkhan-Clifford, "Phosphorylation of Sp1 in response to DNA damage by ataxia telangiectasia-mutated kinase," *Molecular Cancer Research*, vol. 5, no. 12, pp. 1319-1330, 2007.
- [29] C. Stevens, L. Smith, and N. B. La Thangue, "Chk2 activates E2F-1 in response to DNA damage," *Nature cell biology*, vol. 5, no. 5, pp. 401-409, 2003.
- [30] G. Bretones, M. D. Delgado, and J. León, "Myc and cell cycle control," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*, vol. 1849, no. 5, pp. 506-516, 2015.
- [31] M. Abdelrahim, R. Smith III, R. Burghardt, and S. Safe, "Role of Sp proteins in regulation of vascular endothelial growth factor expression and proliferation of pancreatic cancer cells," *Cancer research*, vol. 64, no. 18, pp. 6740-6749, 2004.
- [32] A. R. Black, D. Jensen, S.-Y. Lin, and J. C. Azizkhan, "Growth/cell cycle regulation of Sp1 phosphorylation," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 274, no. 3, pp. 1207-1215, 1999.
- [33] W. S. Yang *et al.*, "The transcriptional repressor ZBTB4 regulates EZH2 through a MicroRNA-ZBTB4-specificity protein signaling axis," *Neoplasia*, vol. 16, no. 12, pp. 1059-1069, 2014.
- [34] M. Nicolás, V. Noé, and C. J. Ciudad, "Transcriptional regulation of the human Sp1 gene promoter by the specificity protein (Sp) family members nuclear factor Y (NF-Y) and E2F," *Biochemical Journal*, vol. 371, no. 2, pp. 265-275, 2003.

- [35] L. Wang *et al.*, "Transcription factor Sp1 expression is a significant predictor of survival in human gastric cancer," *Clinical cancer research*, vol. 9, no. 17, pp. 6371-6380, 2003.
- [36] H. Guan *et al.*, "Sp1 is upregulated in human glioma, promotes MMP-2-mediated cell invasion and predicts poor clinical outcome," *International journal of cancer*, vol. 130, no. 3, pp. 593-601, 2012.
- [37] Y. Jiang *et al.*, "A high expression level of insulin-like growth factor I receptor is associated with increased expression of transcription factor Sp1 and regional lymph node metastasis of human gastric cancer," *Clinical & experimental metastasis*, vol. 21, pp. 755-764, 2005.
- [38] Z. Lou, S. O'Reilly, H. Liang, V. M. Maher, S. D. Sleight, and J. J. McCormick, "Down-regulation of overexpressed sp1 protein in human fibrosarcoma cell lines inhibits tumor formation," *Cancer research*, vol. 65, no. 3, pp. 1007-1017, 2005.
- [39] H. Ishibashi *et al.*, "Sp1 decoy transfected to carcinoma cells suppresses the expression of vascular endothelial growth factor, transforming growth factor β 1, and tissue factor and also cell growth and invasion activities," *Cancer research*, vol. 60, no. 22, pp. 6531-6536, 2000.
- [40] Z. Jia *et al.*, "Molecular basis of the synergistic antiangiogenic activity of bevacizumab and mithramycin A," *Cancer research*, vol. 67, no. 10, pp. 4878-4885, 2007.
- [41] F. Nikulenkov *et al.*, "Insights into p53 transcriptional function via genome-wide chromatin occupancy and gene expression analysis," *Cell Death & Differentiation*, vol. 19, no. 12, pp. 1992-2002, 2012.
- [42] R. L. Siegel, K. D. Miller, H. E. Fuchs, and A. Jemal, "Cancer statistics, 2021," *Ca Cancer J Clin*, vol. 71, no. 1, pp. 7-33, 2021.
- [43] L. A. Torre, F. Bray, R. L. Siegel, J. Ferlay, J. Lortet-Tieulent, and A. Jemal, "Global cancer statistics, 2012," *CA: a cancer journal for clinicians*, vol. 65, no. 2, pp. 87-108, 2015.
- [44] U. T. Sankpal, P. Maliakal, D. Bose, O. Kayaleh, D. Buchholz, and R. Basha, "Expression of specificity protein transcription factors in pancreatic cancer and their association in prognosis and therapy," *Current medicinal chemistry*, vol. 19, no. 22, pp. 3779-3786, 2012.
- [45] N. Y. Jiang, B. A. Woda, B. F. Banner, G. F. Whalen, K. A. Dresser, and D. Lu, "Sp1, a new biomarker that identifies a subset of aggressive pancreatic ductal

- adenocarcinoma," *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, vol. 17, no. 7, pp. 1648-1652, 2008.
- [46] I. Jutooru *et al.*, "Arsenic trioxide downregulates specificity protein (Sp) transcription factors and inhibits bladder cancer cell and tumor growth," *Experimental cell research*, vol. 316, no. 13, pp. 2174-2188, 2010.
 - [47] R. L. Siegel, K. D. Miller, and A. Jemal, "Cancer statistics, 2018," *CA: a cancer journal for clinicians*, vol. 68, no. 1, pp. 7-30, 2018.
 - [48] J. Colon *et al.*, "Tolfenamic acid decreases c-Met expression through Sp proteins degradation and inhibits lung cancer cells growth and tumor formation in orthotopic mice," *Investigational new drugs*, vol. 29, pp. 41-51, 2011.
 - [49] K. Deacon, D. Onion, R. Kumari, S. A. Watson, and A. J. Knox, "Elevated SP-1 transcription factor expression and activity drives basal and hypoxia-induced vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in non-small cell lung cancer," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 287, no. 47, pp. 39967-39981, 2012.
 - [50] T.-I. Hsu *et al.*, "Sp1 expression regulates lung tumor progression," *Oncogene*, vol. 31, no. 35, pp. 3973-3988, 2012.
 - [51] C. Wright *et al.*, "Prognostic factors in breast cancer: immunohistochemical staining for SP1 and NCRC 11 related to survival, tumour epidermal growth factor receptor and oestrogen receptor status," *The Journal of pathology*, vol. 153, no. 4, pp. 325-331, 1987.
 - [52] X.-B. Wang, W.-Q. Peng, Z.-J. Yi, S.-L. Zhu, and Q.-H. Gan, "Expression and prognostic value of transcriptional factor sp1 in breast cancer," *Ai zheng= Aizheng= Chinese journal of cancer*, vol. 26, no. 9, pp. 996-1000, 2007.
 - [53] B. T. Hennessey, R. L. Coleman, and M. Markman, "Ovarian cancer," *The lancet*, vol. 374, no. 9698, pp. 1371-1382, 2009.
 - [54] H. Honda, M. J. Pazin, H. Ji, R. P. Wernyj, and P. J. Morin, "Crucial roles of Sp1 and epigenetic modifications in the regulation of the CLDN4 promoter in ovarian cancer cells," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 281, no. 30, pp. 21433-21444, 2006.
 - [55] S. A. Turkoglu and F. Kockar, "SP1 and USF differentially regulate ADAMTS1 gene expression under normoxic and hypoxic conditions in hepatoma cells," *Gene*, vol. 575, no. 1, pp. 48-57, Jan 1 2016, doi: 10.1016/j.gene.2015.08.035.
 - [56] A. T. Aydemir, M. Alper, and F. Kockar, "SP1-mediated downregulation of ADAMTS3 gene expression in osteosarcoma models," *Gene*, vol. 659, pp. 1-10, Jun 15 2018, doi: 10.1016/j.gene.2018.03.009.

- [57] B. L. Tang, "ADAMTS: a novel family of extracellular matrix proteases," *Int J Biochem Cell Biol*, vol. 33, no. 1, pp. 33-44, Jan 2001, doi: 10.1016/s1357-2725(00)00061-3.
- [58] H. E. Van Wart and H. Birkedal-Hansen, "The cysteine switch: a principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 87, no. 14, pp. 5578-82, Jul 1990, doi: 10.1073/pnas.87.14.5578.
- [59] E. M. Majerus, X. Zheng, E. A. Tuley, and J. E. Sadler, "Cleavage of the ADAMTS13 propeptide is not required for protease activity," *J Biol Chem*, vol. 278, no. 47, pp. 46643-8, Nov 21 2003, doi: 10.1074/jbc.M309872200.
- [60] C. R. Flannery *et al.*, "Autocatalytic cleavage of ADAMTS-4 (Aggrecanase-1) reveals multiple glycosaminoglycan-binding sites," *J Biol Chem*, vol. 277, no. 45, pp. 42775-80, Nov 8 2002, doi: 10.1074/jbc.M205309200.
- [61] R. A. Black, "Tumor necrosis factor-alpha converting enzyme," *Int J Biochem Cell Biol*, vol. 34, no. 1, pp. 1-5, Jan 2002, doi: 10.1016/s1357-2725(01)00097-8.
- [62] M. Tortorella *et al.*, "The thrombospondin motif of aggrecanase-1 (ADAMTS-4) is critical for aggrecan substrate recognition and cleavage," *J Biol Chem*, vol. 275, no. 33, pp. 25791-7, Aug 18 2000, doi: 10.1074/jbc.M001065200.
- [63] M. Kashiwagi *et al.*, "Altered proteolytic activities of ADAMTS-4 expressed by C-terminal processing," *J Biol Chem*, vol. 279, no. 11, pp. 10109-19, Mar 12 2004, doi: 10.1074/jbc.M312123200.
- [64] A. Zhou, G. Webb, X. Zhu, and D. F. Steiner, "Proteolytic processing in the secretory pathway," *J Biol Chem*, vol. 274, no. 30, pp. 20745-8, Jul 23 1999, doi: 10.1074/jbc.274.30.20745.
- [65] R. Blelloch and J. Kimble, "Control of organ shape by a secreted metalloprotease in the nematode *Caenorhabditis elegans*," *Nature*, vol. 399, no. 6736, pp. 586-90, Jun 10 1999, doi: 10.1038/21196.
- [66] J. L. Moake, "von Willebrand factor, ADAMTS-13, and thrombotic thrombocytopenic purpura," *Semin Hematol*, vol. 41, no. 1, pp. 4-14, Jan 2004, doi: 10.1053/j.seminhematol.2003.10.003.
- [67] H. Yang and R. A. Khalil, "Chapter Eight - ADAM and ADAMTS disintegrin and metalloproteinases as major factors and molecular targets in vascular malfunction and disease," in *Advances in Pharmacology*, vol. 94, W. B. Campbell and J. D. Imig Eds.: Academic Press, 2022, pp. 255-363.

- [68] M. D. Howell and P. E. Gottschall, "Lectican proteoglycans, their cleaving metalloproteinases, and plasticity in the central nervous system extracellular microenvironment," *Neuroscience*, vol. 217, pp. 6-18, Aug 16 2012, doi: 10.1016/j.neuroscience.2012.05.034.
- [69] Y. Yamaguchi, "Lecticans: organizers of the brain extracellular matrix," *Cell Mol Life Sci*, vol. 57, no. 2, pp. 276-89, Feb 2000, doi: 10.1007/pl00000690.
- [70] J. D. Sandy, C. R. Flannery, P. J. Neame, and L. S. Lohmander, "The structure of aggrecan fragments in human synovial fluid. Evidence for the involvement in osteoarthritis of a novel proteinase which cleaves the Glu 373-Ala 374 bond of the interglobular domain," *The Journal of clinical investigation*, vol. 89, no. 5, pp. 1512-1516, 1992.
- [71] G. Suna *et al.*, "Extracellular matrix proteomics reveals interplay of aggrecan and aggrecanases in vascular remodeling of stented coronary arteries," *Circulation*, vol. 137, no. 2, pp. 166-183, 2018.
- [72] T. Fontanil, Y. Mohamedi, J. Espina-Casado, J. Obaya Á, T. Cobo, and S. Cal, "Hyalactanase Activities by the ADAMTS Metalloproteases," *Int J Mol Sci*, vol. 22, no. 6, Mar 15 2021, doi: 10.3390/ijms22062988.
- [73] S. Islam and H. Watanabe, "Versican: a dynamic regulator of the extracellular matrix," *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, vol. 68, no. 11, pp. 763-775, 2020.
- [74] S. Nandadasa, S. Foulcer, and S. S. Apte, "The multiple, complex roles of versican and its proteolytic turnover by ADAMTS proteases during embryogenesis," *Matrix Biology*, vol. 35, pp. 34-41, 2014/04/01/ 2014, doi: <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2014.01.005>.
- [75] S. Santamaria and R. de Groot, "ADAMTS proteases in cardiovascular physiology and disease," *Open Biol*, vol. 10, no. 12, p. 200333, Dec 2020, doi: 10.1098/rsob.200333.
- [76] A. C. Jönsson-Rylander *et al.*, "Role of ADAMTS-1 in atherosclerosis: remodeling of carotid artery, immunohistochemistry, and proteolysis of versican," *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, vol. 25, no. 1, pp. 180-5, Jan 2005, doi: 10.1161/01.Atv.0000150045.27127.37.
- [77] S. Kumar *et al.*, "Loss of ADAMTS4 reduces high fat diet-induced atherosclerosis and enhances plaque stability in ApoE(-/-) mice," *Sci Rep*, vol. 6, p. 31130, Aug 5 2016, doi: 10.1038/srep31130.

- [78] C. C. Hong *et al.*, "Cerebral cavernous malformations are driven by ADAMTS5 proteolysis of versican," *J Exp Med*, vol. 217, no. 10, Oct 5 2020, doi: 10.1084/jem.20200140.
- [79] H. Yamada, K. Watanabe, M. Shimonaka, and Y. Yamaguchi, "Molecular cloning of brevican, a novel brain proteoglycan of the aggrecan/versican family," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 269, no. 13, pp. 10119-10126, 1994.
- [80] R. Frischknecht and C. I. Seidenbecher, "Brevican: a key proteoglycan in the perisynaptic extracellular matrix of the brain," *The international journal of biochemistry & cell biology*, vol. 44, no. 7, pp. 1051-1054, 2012.
- [81] N. John *et al.*, "Brevican-containing perineuronal nets of extracellular matrix in dissociated hippocampal primary cultures," *Molecular and Cellular Neuroscience*, vol. 31, no. 4, pp. 774-784, 2006.
- [82] J. D. Sandy *et al.*, "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," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 276, no. 16, pp. 13372-13378, 2001.
- [83] M. J. Binder, S. McCoombe, E. D. Williams, D. R. McCulloch, and A. C. Ward, "The extracellular matrix in cancer progression: Role of hyaluronan proteoglycans and ADAMTS enzymes," *Cancer letters*, vol. 385, pp. 55-64, 2017.
- [84] Y. Yamaguchi, "Lecticans: organizers of the brain extracellular matrix," *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, vol. 57, pp. 276-289, 2000.
- [85] M. S. Viapiano, S. Hockfield, and R. T. Matthews, "BEHAB/brevican requires ADAMTS-mediated proteolytic cleavage to promote glioma invasion," *Journal of neuro-oncology*, vol. 88, pp. 261-272, 2008.
- [86] J. Held-Feindt *et al.*, "Matrix-degrading proteases ADAMTS4 and ADAMTS5 (disintegrins and metalloproteinases with thrombospondin motifs 4 and 5) are expressed in human glioblastomas," *International journal of cancer*, vol. 118, no. 1, pp. 55-61, 2006.
- [87] M. Nakada *et al.*, "Human glioblastomas overexpress ADAMTS-5 that degrades brevican," *Acta neuropathologica*, vol. 110, pp. 239-246, 2005.
- [88] J. Mayer, M. G. Hamel, and P. E. Gottschall, "Evidence for proteolytic cleavage of brevican by the ADAMTSs in the dentate gyrus after excitotoxic lesion of the mouse entorhinal cortex," *BMC neuroscience*, vol. 6, no. 1, pp. 1-12, 2005.

- [89] D. S. Jonesco, M. A. Karsdal, and K. Henriksen, "The CNS-specific proteoglycan, brevican, and its ADAMTS4-cleaved fragment show differential serological levels in Alzheimer's disease, other types of dementia and non-demented controls: A cross-sectional study," *PLoS One*, vol. 15, no. 6, p. e0234632, 2020.
- [90] R. Tauchi *et al.*, "The endogenous proteoglycan-degrading enzyme ADAMTS-4 promotes functional recovery after spinal cord injury," *Journal of neuroinflammation*, vol. 9, pp. 1-10, 2012.
- [91] J. Mitlöhner *et al.*, "Dopamine receptor activation modulates the integrity of the perisynaptic extracellular matrix at excitatory synapses," *Cells*, vol. 9, no. 2, p. 260, 2020.
- [92] K. Demircan *et al.*, "ADAMTS4 and ADAMTS5 knockout mice are protected from versican but not aggrecan or brevican proteolysis during spinal cord injury," *BioMed Research International*, vol. 2014, 2014.
- [93] W. M. Wang *et al.*, "Transforming growth factor-beta induces secretion of activated ADAMTS-2. A procollagen III N-proteinase", *J Biol Chem*, vol. 278, no. 21, pp. 19549-57, May 23 2003, doi: 10.1074/jbc.M300767200.
- [94] A. Colige *et al.*, "Characterization and partial amino acid sequencing of a 107-kDa procollagen I N-proteinase purified by affinity chromatography on immobilized type XIV collagen", *J Biol Chem*, vol. 270, no. 28, pp. 16724-30, Jul 14 1995, doi: 10.1074/jbc.270.28.16724.
- [95] A. Colige, S. W. Li, A. L. Sieron, B. V. Nusgens, D. J. Prockop, and C. M. Lapière, "cDNA cloning and expression of bovine procollagen I N-proteinase: a new member of the superfamily of zinc-metalloproteinases with binding sites for cells and other matrix components", *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 94, no. 6, pp. 2374-9, Mar 18 1997, doi: 10.1073/pnas.94.6.2374.
- [96] R. J. Fernandes *et al.*, "Procollagen II amino propeptide processing by ADAMTS-3. Insights on dermatosparaxis", *J Biol Chem*, vol. 276, no. 34, pp. 31502-9, Aug 24 2001, doi: 10.1074/jbc.M103466200.
- [97] A. Colige *et al.*, "Human Ehlers-Danlos syndrome type VII C and bovine dermatosparaxis are caused by mutations in the procollagen I N-proteinase gene", *Am J Hum Genet*, vol. 65, no. 2, pp. 308-17, Aug 1999, doi: 10.1086/302504.
- [98] V. A. McKusick, "Mendelian Inheritance in Man and its online version, OMIM", *Am J Hum Genet*, vol. 80, no. 4, pp. 588-604, Apr 2007, doi: 10.1086/514346.

- [99] C. J. Liu *et al.*, "ADAMTS-7: a metalloproteinase that directly binds to and degrades cartilage oligomeric matrix protein," *Faseb j*, vol. 20, no. 7, pp. 988-90, May 2006, doi: 10.1096/fj.05-3877fje.
- [100] C. J. Liu *et al.*, "ADAMTS-12 associates with and degrades cartilage oligomeric matrix protein," *J Biol Chem*, vol. 281, no. 23, pp. 15800-8, Jun 9 2006, doi: 10.1074/jbc.M513433200.
- [101] Y. Luan *et al.*, "Inhibition of ADAMTS-7 and ADAMTS-12 degradation of cartilage oligomeric matrix protein by alpha-2-macroglobulin," *Osteoarthritis Cartilage*, vol. 16, no. 11, pp. 1413-20, Nov 2008, doi: 10.1016/j.joca.2008.03.017.
- [102] Z. M. Ruggeri, "Von Willebrand factor, platelets and endothelial cell interactions," *J Thromb Haemost*, vol. 1, no. 7, pp. 1335-42, Jul 2003, doi: 10.1046/j.1538-7836.2003.00260.x.
- [103] H. M. Tsai, "Thrombotic thrombocytopenic purpura: a thrombotic disorder caused by ADAMTS13 deficiency," *Hematol Oncol Clin North Am*, vol. 21, no. 4, pp. 609-32, v, Aug 2007, doi: 10.1016/j.hoc.2007.06.003.
- [104] K. Fujikawa, H. Suzuki, B. McMullen, and D. Chung, "Purification of human von Willebrand factor-cleaving protease and its identification as a new member of the metalloproteinase family," *Blood*, vol. 98, no. 6, pp. 1662-6, Sep 15 2001, doi: 10.1182/blood.v98.6.1662.
- [105] K. Soejima *et al.*, "A novel human metalloprotease synthesized in the liver and secreted into the blood: possibly, the von Willebrand factor-cleaving protease?," *J Biochem*, vol. 130, no. 4, pp. 475-80, Oct 2001, doi: 10.1093/oxfordjournals.jbchem.a003009.
- [106] M. Furlan *et al.*, "von Willebrand factor-cleaving protease in thrombotic thrombocytopenic purpura and the hemolytic-uremic syndrome," *N Engl J Med*, vol. 339, no. 22, pp. 1578-84, Nov 26 1998, doi: 10.1056/nejm199811263392202.
- [107] F. Vázquez *et al.*, "METH-1, a human ortholog of ADAMTS-1, and METH-2 are members of a new family of proteins with angio-inhibitory activity," *J Biol Chem*, vol. 274, no. 33, pp. 23349-57, Aug 13 1999, doi: 10.1074/jbc.274.33.23349.
- [108] F. de Fraipont, A. C. Nicholson, J. J. Feige, and E. G. Van Meir, "Thrombospondins and tumor angiogenesis," *Trends Mol Med*, vol. 7, no. 9, pp. 401-7, Sep 2001, doi: 10.1016/s1471-4914(01)02102-5.
- [109] M. L. Iruela-Arispe, M. Lombardo, H. C. Krutzsch, J. Lawler, and D. D. Roberts, "Inhibition of angiogenesis by thrombospondin-1 is mediated by 2 independent

- regions within the type 1 repeats," *Circulation*, vol. 100, no. 13, pp. 1423-31, Sep 28 1999, doi: 10.1161/01.cir.100.13.1423.
- [110] J. Lawler, "The functions of thrombospondin-1 and-2," *Curr Opin Cell Biol*, vol. 12, no. 5, pp. 634-40, Oct 2000, doi: 10.1016/s0955-0674(00)00143-5.
- [111] A. Luque, D. R. Carpizo, and M. L. Iruela-Arispe, "ADAMTS1/METH1 inhibits endothelial cell proliferation by direct binding and sequestration of VEGF165," *J Biol Chem*, vol. 278, no. 26, pp. 23656-65, Jun 27 2003, doi: 10.1074/jbc.M212964200.
- [112] A.-M. Malfait, R.-Q. Liu, K. Ijiri, S. Komiya, and M. D. Tortorella, "Inhibition of ADAM-TS4 and ADAM-TS5 prevents aggrecan degradation in osteoarthritic cartilage," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 277, no. 25, pp. 22201-22208, 2002.
- [113] S. S. Glasson *et al.*, "Deletion of active ADAMTS5 prevents cartilage degradation in a murine model of osteoarthritis," *Nature*, vol. 434, no. 7033, pp. 644-648, 2005.
- [114] J. Bondeson, S. Wainwright, C. Hughes, and B. Caterson, "The regulation of the ADAMTS4 and ADAMTS5 aggrecanases in osteoarthritis: a review," *Clinical and experimental rheumatology*, vol. 26, no. 1, p. 139, 2008.
- [115] M. Kapoor, J. Martel-Pelletier, D. Lajeunesse, J.-P. Pelletier, and H. Fahmi, "Role of proinflammatory cytokines in the pathophysiology of osteoarthritis," *Nature Reviews Rheumatology*, vol. 7, no. 1, pp. 33-42, 2011.
- [116] M. El Mabrouk, J. Sylvester, and M. Zafarullah, "Signaling pathways implicated in oncostatin M-induced aggrecanase-1 and matrix metalloproteinase-13 expression in human articular chondrocytes," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, vol. 1773, no. 3, pp. 309-320, 2007.
- [117] Y. Mimata *et al.*, "Interleukin-6 upregulates expression of ADAMTS-4 in fibroblast-like synoviocytes from patients with rheumatoid arthritis," *International journal of rheumatic diseases*, vol. 15, no. 1, pp. 36-44, 2012.
- [118] K. Uchida *et al.*, "Transforming growth factor activating kinase 1 regulates extracellular matrix degrading enzymes and pain-related molecule expression following tumor necrosis factor- α stimulation of synovial cells: an in vitro study," *BMC Musculoskeletal Disorders*, vol. 18, no. 1, pp. 1-9, 2017.
- [119] M. Vistnes, J. M. Aronsen, I. G. Lunde, I. Sjaastad, C. R. Carlson, and G. Christensen, "Pentosan polysulfate decreases myocardial expression of the extracellular matrix enzyme ADAMTS4 and improves cardiac function in vivo in rats subjected to pressure overload by aortic banding," *PLoS One*, vol. 9, no. 3, p. e89621, 2014.

- [120] K. M. Doyle, D. L. Russell, V. Sriraman, and J. S. Richards, "Coordinate transcription of the ADAMTS-1 gene by luteinizing hormone and progesterone receptor," *Molecular Endocrinology*, vol. 18, no. 10, pp. 2463-2478, 2004.
- [121] T. Shindo *et al.*, "ADAMTS-1: a metalloproteinase-disintegrin essential for normal growth, fertility, and organ morphology and function," *The Journal of clinical investigation*, vol. 105, no. 10, pp. 1345-1352, 2000.
- [122] C. L. Jacobi, L. J. Rudigier, H. Scholz, and K. M. Kirschner, "Transcriptional regulation by the Wilms tumor protein, Wt1, suggests a role of the metalloproteinase Adamts16 in murine genitourinary development," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 288, no. 26, pp. 18811-18824, 2013.
- [123] R. Schnellmann *et al.*, "A selective extracellular matrix proteomics approach identifies fibronectin proteolysis by a disintegrin-like and metalloprotease domain with thrombospondin type 1 motifs (ADAMTS16) and its impact on spheroid morphogenesis," *Molecular & Cellular Proteomics*, vol. 17, no. 7, pp. 1410-1425, 2018.
- [124] A. K. Surridge *et al.*, "Characterization and regulation of ADAMTS-16," *Matrix Biology*, vol. 28, no. 7, pp. 416-424, 2009.
- [125] M. Alper and F. Kockar, "IL-6 upregulates a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 2 (ADAMTS-2) in human osteosarcoma cells mediated by JNK pathway," *Molecular and cellular biochemistry*, vol. 393, pp. 165-175, 2014.
- [126] X.-H. Bai *et al.*, "ADAMTS-7, a direct target of PTHrP, adversely regulates endochondral bone growth by associating with and inactivating GEP growth factor," *Molecular and cellular biology*, vol. 29, no. 15, pp. 4201-4219, 2009.
- [127] A. Colige, C. Monseur, J. T. Crawley, S. Santamaria, and R. de Groot, "Proteomic discovery of substrates of the cardiovascular protease ADAMTS7," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 294, no. 20, pp. 8037-8045, 2019.
- [128] D. J. Bevitt, Z. Li, J. L. Lindrop, M. D. Barker, M. P. Clarke, and N. McKie, "Analysis of full length ADAMTS6 transcript reveals alternative splicing and a role for the 5' untranslated region in translational control," *Gene*, vol. 359, pp. 99-110, 2005.
- [129] S. D. Wainwright, J. Bondeson, and C. E. Hughes, "An alternative spliced transcript of ADAMTS4 is present in human synovium from OA patients," *Matrix biology*, vol. 25, no. 5, pp. 317-320, 2006.

- [130] G. Hashimoto, M. Shimoda, and Y. Okada, "ADAMTS4 (aggrecanase-1) interaction with the C-terminal domain of fibronectin inhibits proteolysis of aggrecan," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 279, no. 31, pp. 32483-32491, 2004.
- [131] M. Kashiwagi *et al.*, "Altered proteolytic activities of ADAMTS-4 expressed by C-terminal processing," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 279, no. 11, pp. 10109-10119, 2004.
- [132] K. Fushimi, L. Troeberg, H. Nakamura, N. H. Lim, and H. Nagase, "Functional differences of the catalytic and non-catalytic domains in human ADAMTS-4 and ADAMTS-5 in aggrecanolytic activity," *Journal of biological chemistry*, vol. 283, no. 11, pp. 6706-6716, 2008.
- [133] S. Santamaria *et al.*, "Exosites in hypervariable loops of ADAMTS spacer domains control substrate recognition and proteolysis," *Scientific Reports*, vol. 9, no. 1, p. 10914, 2019.
- [134] Z. Balic, S. Misra, B. Willard, D. P. Reinhardt, S. S. Apte, and D. Hubmacher, "Alternative splicing of the metalloprotease ADAMTS17 spacer regulates secretion and modulates autoproteolytic activity," *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, vol. 35, no. 2, p. e21310, 2021.
- [135] A. M. Leufkens *et al.*, "Educational level and risk of colorectal cancer in EPIC with specific reference to tumor location," *Int J Cancer*, vol. 130, no. 3, pp. 622-30, Feb 1 2012, doi: 10.1002/ijc.26030.
- [136] D. M. Parkin, F. Bray, J. Ferlay, and P. Pisani, "Global cancer statistics, 2002," *CA Cancer J Clin*, vol. 55, no. 2, pp. 74-108, Mar-Apr 2005, doi: 10.3322/canjclin.55.2.74.
- [137] T. Ahlquist *et al.*, "Gene methylation profiles of normal mucosa, and benign and malignant colorectal tumors identify early onset markers," *Mol Cancer*, vol. 7, p. 94, Dec 31 2008, doi: 10.1186/1476-4598-7-94.
- [138] G. E. Lind *et al.*, "ADAMTS1, CRABP1, and NR3C1 identified as epigenetically deregulated genes in colorectal tumorigenesis," *Cell Oncol*, vol. 28, no. 5-6, pp. 259-72, 2006, doi: 10.1155/2006/949506.
- [139] A. S. Sameer and S. Nissar, "Epigenetics in diagnosis of colorectal cancer," *Mol Biol Res Commun*, vol. 5, no. 1, pp. 49-57, Mar 2016.

- [140] B. Yu *et al.*, "High-resolution melting analysis of PCDH10 methylation levels in gastric, colorectal and pancreatic cancers," *Neoplasma*, vol. 57, no. 3, pp. 247-52, 2010, doi: 10.4149/neo_2010_03_247.
- [141] A. Moncada-Pazos *et al.*, "ADAMTS-12 metalloprotease is necessary for normal inflammatory response," *J Biol Chem*, vol. 287, no. 47, pp. 39554-63, Nov 16 2012, doi: 10.1074/jbc.M112.408625.
- [142] C. G. Vilorio *et al.*, "Genetic inactivation of ADAMTS15 metalloprotease in human colorectal cancer," *Cancer Res*, vol. 69, no. 11, pp. 4926-34, Jun 1 2009, doi: 10.1158/0008-5472.Can-08-4155.
- [143] Z. Li *et al.*, "C-terminal ADAMTS-18 fragment induces oxidative platelet fragmentation, dissolves platelet aggregates, and protects against carotid artery occlusion and cerebral stroke," *Blood*, vol. 113, no. 24, pp. 6051-60, Jun 11 2009, doi: 10.1182/blood-2008-07-170571.
- [144] T. Sjöblom *et al.*, "The consensus coding sequences of human breast and colorectal cancers," *Science*, vol. 314, no. 5797, pp. 268-74, Oct 13 2006, doi: 10.1126/science.1133427.
- [145] S. Porter, I. M. Clark, L. Kevorkian, and D. R. Edwards, "The ADAMTS metalloproteinases," *Biochem J*, vol. 386, no. Pt 1, pp. 15-27, Feb 15 2005, doi: 10.1042/bj20040424.
- [146] K. E. Georgiadis, S. Hirohata, M. F. Seldin, and S. S. Apte, "ADAM-TS8, a novel metalloprotease of the ADAM-TS family located on mouse chromosome 9 and human chromosome 11," *Genomics*, vol. 62, no. 2, pp. 312-5, Dec 1 1999, doi: 10.1006/geno.1999.6014.
- [147] S. Wang *et al.*, "A de novo mutation of ADAMTS8 in a patient with Wiedemann-Steiner syndrome," *Mol Cytogenet*, vol. 16, no. 1, p. 21, Aug 30 2023, doi: 10.1186/s13039-023-00654-0.
- [148] J. Omura *et al.*, "ADAMTS8 Promotes the Development of Pulmonary Arterial Hypertension and Right Ventricular Failure: A Possible Novel Therapeutic Target," *Circ Res*, vol. 125, no. 10, pp. 884-906, Oct 25 2019, doi: 10.1161/circresaha.119.315398.
- [149] Badshah, II *et al.*, "Differential expression of secreted factors SOSTDC1 and ADAMTS8 cause profibrotic changes in linear morphoea fibroblasts," *Br J Dermatol*, vol. 180, no. 5, pp. 1135-1149, May 2019, doi: 10.1111/bjd.17352.

- [150] H. Kufaishi, M. Alarab, H. Drutz, S. Lye, and O. Shynlova, "Static Mechanical Loading Influences the Expression of Extracellular Matrix and Cell Adhesion Proteins in Vaginal Cells Derived From Premenopausal Women With Severe Pelvic Organ Prolapse," *Reprod Sci*, vol. 23, no. 8, pp. 978-92, Aug 2016, doi: 10.1177/1933719115625844.
- [151] J. Rossier *et al.*, "Cortical fast-spiking parvalbumin interneurons enwrapped in the perineuronal net express the metallopeptidases Adamts8, Adamts15 and Neprilysin," *Mol Psychiatry*, vol. 20, no. 2, pp. 154-61, Feb 2015, doi: 10.1038/mp.2014.162.
- [152] G. C. Choi *et al.*, "The metalloprotease ADAMTS8 displays antitumor properties through antagonizing EGFR-MEK-ERK signaling and is silenced in carcinomas by CpG methylation," *Mol Cancer Res*, vol. 12, no. 2, pp. 228-38, Feb 2014, doi: 10.1158/1541-7786.Mcr-13-0195.
- [153] J. R. Dunn *et al.*, "METH-2 silencing and promoter hypermethylation in NSCLC," *Br J Cancer*, vol. 91, no. 6, pp. 1149-54, Sep 13 2004, doi: 10.1038/sj.bjc.6602107.
- [154] Z. Wu, Y. Shi, S. Ren, Y. Ju, Y. Hu, and J. Wu, "ADAMTS8 Inhibits Progression of Esophageal Squamous Cell Carcinoma," *DNA Cell Biol*, Oct 15 2020, doi: 10.1089/dna.2020.6053.
- [155] L. Li, S. Yuan, X. Zhao, and T. Luo, "ADAMTS8 is frequently down-regulated in colorectal cancer and functions as a tumor suppressor," *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 524, no. 3, pp. 663-671, Apr 9 2020, doi: 10.1016/j.bbrc.2020.01.020.
- [156] J. R. Dunn *et al.*, "Expression of ADAMTS-8, a secreted protease with antiangiogenic properties, is downregulated in brain tumours," *Br J Cancer*, vol. 94, no. 8, pp. 1186-93, Apr 24 2006, doi: 10.1038/sj.bjc.6603006.
- [157] S. Porter *et al.*, "ADAMTS8 and ADAMTS15 expression predicts survival in human breast carcinoma," *Int J Cancer*, vol. 118, no. 5, pp. 1241-7, Mar 1 2006, doi: 10.1002/ijc.21476.
- [158] J. Chen *et al.*, "Downregulation of ADAMTS8 by DNA Hypermethylation in Gastric Cancer and Its Clinical Significance," *Biomed Res Int*, vol. 2016, p. 5083841, 2016, doi: 10.1155/2016/5083841.
- [159] X. Zhao, C. Yang, J. Wu, and Y. Nan, "ADAMTS8 targets ERK to suppress cell proliferation, invasion, and metastasis of hepatocellular carcinoma," *Onco Targets Ther*, vol. 11, pp. 7569-7578, 2018, doi: 10.2147/ott.S173360.

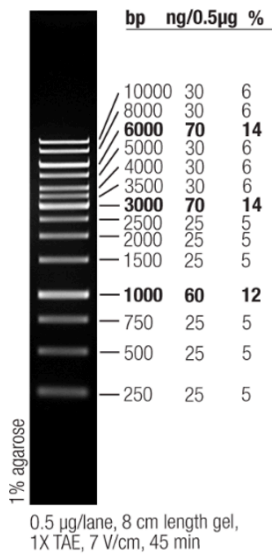
- [160] X. Guo, J. Li, H. Zhang, H. Liu, Z. Liu, and X. Wei, "Relationship Between ADAMTS8, ADAMTS18, and ADAMTS20 (A Disintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin Motifs) Expressions and Tumor Molecular Classification, Clinical Pathological Parameters, and Prognosis in Breast Invasive Ductal Carcinoma," *Med Sci Monit*, vol. 24, pp. 3726-3735, Jun 3 2018, doi: 10.12659/msm.907310.
- [161] K. Zhang *et al.*, "ADAMTS8 Inhibits Cell Proliferation and Invasion, and Induces Apoptosis in Breast Cancer," *Onco Targets Ther*, vol. 13, pp. 8373-8382, 2020, doi: 10.2147/ott.S248085.
- [162] E. Yilmaz, R. Melekoglu, C. Taskapan, F. Olmez Budak, and S. Toprak, "The investigation of serum levels of ADAMTS 5 and 8 (the A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs) in the etiology of endometrial cancer," *J Obstet Gynaecol*, vol. 40, no. 6, pp. 856-859, Aug 2020, doi: 10.1080/01443615.2019.1674265.
- [163] Y. Zhang, K. Hu, Z. Qu, Z. Xie, and F. Tian, "ADAMTS8 inhibited lung cancer progression through suppressing VEGFA," *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 598, pp. 1-8, Apr 2 2022, doi: 10.1016/j.bbrc.2022.01.110.
- [164] X. Li, X. Li, and L. Ding, "Comprehensive Analysis to Identify Enhancer-Regulated Inflammation-Associated Genes in Lung Adenocarcinoma," *Cancer Manag Res*, vol. 13, pp. 7115-7129, 2021, doi: 10.2147/cmar.S317922.
- [165] X. Zhang, D. Li, C. Jia, H. Cai, Z. Lv, and B. Wu, "METTL14 promotes tumorigenesis by regulating lncRNA OIP5-AS1/miR-98/ADAMTS8 signaling in papillary thyroid cancer," *Cell Death Dis*, vol. 12, no. 6, p. 617, Jun 15 2021, doi: 10.1038/s41419-021-03891-6.
- [166] Q. Zhang *et al.*, "The Prognostic Value of ADAMTS8 and Its Role as a Tumor Suppressor in Breast Cancer," *Cancer Invest*, vol. 41, no. 2, pp. 119-132, Feb 2023, doi: 10.1080/07357907.2022.2128367.
- [167] H. C. Lee *et al.*, "The Therapeutic Potential of ADAMTS8 in Lung Adenocarcinoma without Targetable Therapy," *J Pers Med*, vol. 12, no. 6, May 30 2022, doi: 10.3390/jpm12060902.
- [168] A. Ishihama, "Prokaryotic genome regulation: a revolutionary paradigm," *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci*, vol. 88, no. 9, pp. 485-508, 2012, doi: 10.2183/pjab.88.485.
- [169] D. S. Latchman, "Transcriptional gene regulation in eukaryotes," *eLS*, 2001.

- [170] T. Mitsis, A. Efthimiadou, F. Bacopoulou, D. Vlachakis, G. P. Chrousos, and E. Eliopoulos, "Transcription factors and evolution: An integral part of gene expression," *World Academy of Sciences Journal*, vol. 2, no. 1, pp. 3-8, 2020.
- [171] S. Philipsen and G. Suske, "A tale of three fingers: the family of mammalian Sp/XKLF transcription factors," *Nucleic acids research*, vol. 27, no. 15, pp. 2991-3000, 1999.
- [172] K. Kuno, N. Kanada, E. Nakashima, F. Fujiki, F. Ichimura, and K. Matsushima, "Molecular cloning of a gene encoding a new type of metalloproteinase-disintegrin family protein with thrombospondin motifs as an inflammation associated gene," *J Biol Chem*, vol. 272, no. 1, pp. 556-62, Jan 3 1997, doi: 10.1074/jbc.272.1.556.
- [173] S. S. Apte, "A disintegrin-like and metalloprotease (reprolysin-type) with thrombospondin type 1 motif (ADAMTS) superfamily: functions and mechanisms," *J Biol Chem*, vol. 284, no. 46, pp. 31493-7, Nov 13 2009, doi: 10.1074/jbc.R109.052340.
- [174] S. Santamaria, D. R. Martin, X. Dong, K. Yamamoto, S. S. Apte, and J. Ahnström, "Post-translational regulation and proteolytic activity of the metalloproteinase ADAMTS8," *J Biol Chem*, vol. 297, no. 5, p. 101323, Nov 2021, doi: 10.1016/j.jbc.2021.101323.
- [175] K. M. Doyle, D. L. Russell, V. Sriraman, and J. S. Richards, "Coordinate transcription of the ADAMTS-1 gene by luteinizing hormone and progesterone receptor," *Mol Endocrinol*, vol. 18, no. 10, pp. 2463-78, Oct 2004, doi: 10.1210/me.2003-0380.
- [176] A. K. Surridge *et al.*, "Characterization and regulation of ADAMTS-16," *Matrix Biol*, vol. 28, no. 7, pp. 416-24, Sep 2009, doi: 10.1016/j.matbio.2009.07.001.

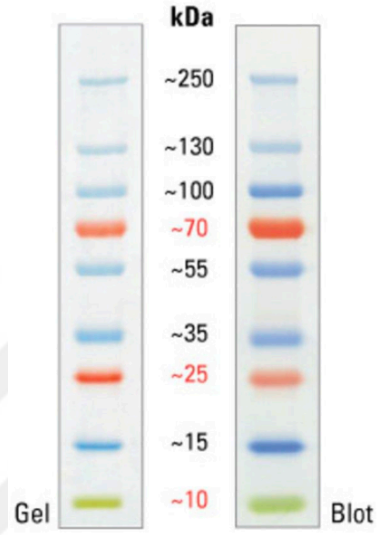
EKLER

EKLER

EK A: Tez Çalışmasında Kullanılan Büyüklük Belirteçleri



▲ 1 kb DNA Ladder
(GeneRuler™)



▲ Protein Ladder
(PageRuler™)

EK B: "ADAMTS-8 Promotör Bölgesine Potansiyel Bağlanan Transkripsiyon Faktörleri ve Lokasyonları"

- Factors predicted by PROMO in this sequence -----

NAME; MATRIX_WIDTH;
STAT4 [T01577]; 6
USF-1 [T00875]; 7
C/EBPbeta [T00017]; 8
C/EBPgamma [T00216]; 8
C/EBPalph [T00107]; 3
C/EBP [T01386]; 6
FOXO3a [T02938]; 8
Hlf [T01071]; 9
Elk-1 [T00250]; 5
Sp3 [T02419]; 11
E2F [T01547]; 8
STAT1beta [T01573]; 10
E2F2 [T05976]; 13
STAT5A [T04683]; 4
C/EBPdelta [T00109]; 3
NF-kappaB1 [T00593]; 12
AP-3 (2) [T00039]; 7
p53 [T00671]; 7
Sp3 [T02338]; 9
AP-2alpha [T00033]; 9
AP-2 [T00034]; 10
AP-2alphaA [T00035]; 6
Elk-1 [T05013]; 9
USF2b [T02377]; 8
c-Jun [T00131]; 6
JunB [T00436]; 6
c-Fos [T00124]; 7
c-Jun [T00132]; 7
c-Jun [T00133]; 7
JunD [T00437]; 7
c-Fos [T00122]; 8
ATF3 [T01095]; 8
C/EBPbeta(p20) [T01420]; 8
E2F-1 [T01542]; 7
USF2 [T02115]; 6
c-Fos [T00123]; 8
USF2 [T00878]; 9
Sp1 [T00759]; 9
Sp1 [T00755]; 9
C/EBPalph [T00104]; 6
C/EBPalph [T00105]; 6
C/EBPalph [T00108]; 6
C/EBPbeta [T00459]; 6
C/EBPbeta [T00581]; 7
NF-kappaB [T00588]; 10
STAT6 [T01581]; 9
E2F-1:DP-1 [T05204]; 9
Sp1 [T01228]; 11
E2F-1 [T01543]; 9
Egr-1 [T01200]; 13
E2 [T00205]; 6
Sp1 [T00753]; 6
Sp1 [T00752]; 10
Sp1 [T00754]; 10
Sp3 [T02453]; 13
AP-4 [T00036]; 11
USF1 [T00874]; 9
c-Ets-1 54 [T00114]; 6
AP-3 [T01150]; 9

--	PROMO	predictions	detail	-----
Sequence name; Factor name; Start position; End position; Dissimilarity; String; RE equally; RE query				
EMBOSS_001;	STAT4	[T01577]; 1; 6;	2.941176; TGTTC;	1.72412; 1.54950;
EMBOSS_001;	STAT4	[T01577]; 109; 114;	1.470588; GTTTC;	1.14941; 0.84246;
EMBOSS_001;	STAT4	[T01577]; 122; 127;	0.000000; GGAAAT;	0.28735; 0.16641;
EMBOSS_001;	STAT4	[T01577]; 132; 137;	2.941176; ACTTC;	1.72412; 1.54950;
EMBOSS_001;	STAT4	[T01577]; 254; 259;	1.470588; TTTTC;	1.14941; 0.84246;
EMBOSS_001;	STAT4	[T01577]; 286; 291;	5.882353; GGAAG;	0.28735; 0.37525;
EMBOSS_001;	STAT4	[T01577]; 335; 340;	1.470588; TTTTC;	1.14941; 0.84246;
EMBOSS_001;	STAT4	[T01577]; 375; 380;	2.941176; GGAAC;	1.72412; 1.54950;
EMBOSS_001;	STAT4	[T01577]; 501; 506;	4.411765; GGAAG;	1.14941; 1.24529;
EMBOSS_001;	STAT4	[T01577]; 617; 622;	2.941176; GGAAAG;	1.72412; 1.54950;
EMBOSS_001;	STAT4	[T01577]; 622; 627;	2.941176; GGAAAG;	1.72412; 1.54950;
EMBOSS_001;	STAT4	[T01577]; 763; 768;	1.470588; GGAAAC;	1.14941; 0.84246;
EMBOSS_001;	STAT4	[T01577]; 770; 775;	2.941176; GGAATA;	1.72412; 1.54950;
EMBOSS_001;	STAT4	[T01577]; 812; 817;	5.882353; GGAAG;	0.28735; 0.37525;
EMBOSS_001;	STAT4	[T01577]; 816; 821;	2.941176; GGAAGT;	1.72412; 1.54950;
EMBOSS_001;	STAT4	[T01577]; 854; 859;	4.411765; GCTTC;	1.14941; 1.24529;
EMBOSS_001;	STAT4	[T01577]; 1064; 1069;	2.941176; GATTTC;	1.72412; 1.54950;
EMBOSS_001;	STAT4	[T01577]; 1072; 1077;	1.470588; TTTTC;	1.14941; 0.84246;
EMBOSS_001;	STAT4	[T01577]; 1136; 1141;	4.411765; TCTTC;	1.14941; 1.24529;
EMBOSS_001;	USF-1	[T00875]; 11; 17;	9.731297; GCTGTGG;	0.28735; 0.49125;
EMBOSS_001;	USF-1	[T00875]; 38; 44;	6.006507; CCACCTT;	0.28735; 0.25143;
EMBOSS_001;	USF-1	[T00875]; 159; 165;	10.616595; CCACTGT;	0.86206; 1.42923;
EMBOSS_001;	USF-1	[T00875]; 179; 185;	0.031764; CCACCTG;	0.28735; 0.37706;
EMBOSS_001;	USF-1	[T00875]; 225; 231;	0.031764; CAGGTGG;	0.28735; 0.37706;
EMBOSS_001;	USF-1	[T00875]; 387; 393;	10.653315; CCACACA;	0.86206; 1.42923;
EMBOSS_001;	USF-1	[T00875]; 596; 602;	5.974743; AACGTGG;	0.28735; 0.25143;
EMBOSS_001;	USF-1	[T00875]; 605; 611;	5.532106; CCACGCG;	0.28735; 0.58937;
EMBOSS_001;	USF-1	[T00875]; 654; 660;	5.563870; CGGGTGG;	0.28735; 0.58937;
EMBOSS_001;	USF-1	[T00875]; 715; 721;	11.538613; CCACTCT;	0.86206; 1.10089;
EMBOSS_001;	USF-1	[T00875]; 845; 851;	5.563870; CCACTCG;	0.28735; 0.58937;
EMBOSS_001;	USF-1	[T00875]; 861; 867;	10.685079; GGGGTGG;	0.86206; 1.42923;
EMBOSS_001;	USF-1	[T00875]; 1157; 1163;	9.763061; CCACCGC;	0.28735; 0.49433;
EMBOSS_001;	C/EBPbeta	[T00017]; 13; 20;	7.429460; TGTGGCAA;	0.10776; 0.08690;
EMBOSS_001;	C/EBPbeta	[T00017]; 55; 62;	14.517899; CCGGGCAA;	0.17960; 0.25642;
EMBOSS_001;	C/EBPbeta	[T00017]; 688; 695;	8.968054; TTGCATTT;	0.28735; 0.23429;
EMBOSS_001;	C/EBPbeta	[T00017]; 1052; 1059;	10.378629; TTGCACCC;	0.14368; 0.13910;
EMBOSS_001;	C/EBPgamma	[T00216]; 13; 20;	3.747937; TGTGGCAA;	0.14368; 0.12423;
EMBOSS_001;	C/EBPalpha	[T00107]; 0; 2;	0.000000; TTG;	18.39062; 14.52991;
EMBOSS_001;	C/EBPalpha	[T00107]; 18; 20;	0.000000; CAA;	18.39062; 14.52991;
EMBOSS_001;	C/EBPalpha	[T00107]; 47; 49;	0.000000; TTG;	18.39062; 14.52991;
EMBOSS_001;	C/EBPalpha	[T00107]; 60; 62;	0.000000; CAA;	18.39062; 14.52991;
EMBOSS_001;	C/EBPalpha	[T00107]; 118; 120;	0.000000; TTG;	18.39062; 14.52991;
EMBOSS_001;	C/EBPalpha	[T00107]; 137; 139;	0.000000; CAA;	18.39062; 14.52991;
EMBOSS_001;	C/EBPalpha	[T00107]; 233; 235;	0.000000; TTG;	18.39062; 14.52991;
EMBOSS_001;	C/EBPalpha	[T00107]; 240; 242;	0.000000; TTG;	18.39062; 14.52991;
EMBOSS_001;	C/EBPalpha	[T00107]; 245; 247;	0.000000; TTG;	18.39062; 14.52991;
EMBOSS_001;	C/EBPalpha	[T00107]; 251; 253;	0.000000; TTG;	18.39062; 14.52991;
EMBOSS_001;	C/EBPalpha	[T00107]; 271; 273;	0.000000; TTG;	18.39062; 14.52991;
EMBOSS_001;	C/EBPalpha	[T00107]; 361; 363;	0.000000; CAA;	18.39062; 14.52991;
EMBOSS_001;	C/EBPalpha	[T00107]; 425; 427;	0.000000; CAA;	18.39062; 14.52991;
EMBOSS_001;	C/EBPalpha	[T00107]; 521; 523;	0.000000; TTG;	18.39062; 14.52991;
EMBOSS_001;	C/EBPalpha	[T00107]; 543; 545;	0.000000; TTG;	18.39062; 14.52991;
EMBOSS_001;	C/EBPalpha	[T00107]; 631; 633;	0.000000; TTG;	18.39062; 14.52991;
EMBOSS_001;	C/EBPalpha	[T00107]; 637; 639;	0.000000; TTG;	18.39062; 14.52991;
EMBOSS_001;	C/EBPalpha	[T00107]; 682; 684;	0.000000; TTG;	18.39062; 14.52991;
EMBOSS_001;	C/EBPalpha	[T00107]; 688; 690;	0.000000; TTG;	18.39062; 14.52991;

EMBOSS_001;	C/EBPalpha	[T00107];	701;	703;	0.000000;	CAA;	18.39062;	14.52991;
EMBOSS_001;	C/EBPalpha	[T00107];	785;	787;	0.000000;	CAA;	18.39062;	14.52991;
EMBOSS_001;	C/EBPalpha	[T00107];	805;	807;	0.000000;	CAA;	18.39062;	14.52991;
EMBOSS_001;	C/EBPalpha	[T00107];	1052;	1054;	0.000000;	TTG;	18.39062;	14.52991;
EMBOSS_001;	C/EBPalpha	[T00107];	1062;	1064;	0.000000;	TTG;	18.39062;	14.52991;
EMBOSS_001;	C/EBP	[T01386];	14;	19;	9.789909;	GTGGCA;	1.14941;	1.04423;
EMBOSS_001;	C/EBP	[T01386];	19;	24;	12.067266;	AACGCA;	1.72412;	2.54368;
EMBOSS_001;	C/EBP	[T01386];	36;	41;	9.789909;	TGCCAC;	1.14941;	1.04423;
EMBOSS_001;	C/EBP	[T01386];	63;	68;	11.373637;	CTAGCA;	1.14941;	1.04405;
EMBOSS_001;	C/EBP	[T01386];	127;	132;	11.373637;	TGCTAA;	1.14941;	1.04405;
EMBOSS_001;	C/EBP	[T01386];	293;	298;	8.756040;	TGTGCA;	1.72412;	1.66995;
EMBOSS_001;	C/EBP	[T01386];	295;	300;	7.172312;	TGCAGT;	1.72412;	1.66918;
EMBOSS_001;	C/EBP	[T01386];	324;	329;	11.373637;	TTAGCA;	1.14941;	1.04405;
EMBOSS_001;	C/EBP	[T01386];	412;	417;	8.756040;	TCTGCA;	1.72412;	1.66995;
EMBOSS_001;	C/EBP	[T01386];	414;	419;	8.756040;	TGCAGG;	1.72412;	1.66995;
EMBOSS_001;	C/EBP	[T01386];	439;	444;	8.756040;	TCTGCA;	1.72412;	1.66995;
EMBOSS_001;	C/EBP	[T01386];	441;	446;	7.172312;	TGCAGT;	1.72412;	1.66918;
EMBOSS_001;	C/EBP	[T01386];	452;	457;	8.756040;	TCTGCA;	1.72412;	1.66995;
EMBOSS_001;	C/EBP	[T01386];	454;	459;	8.756040;	TGCAGG;	1.72412;	1.66995;
EMBOSS_001;	C/EBP	[T01386];	484;	489;	7.172312;	AGTGCA;	1.72412;	1.66918;
EMBOSS_001;	C/EBP	[T01386];	486;	491;	8.756040;	TGCACG;	1.72412;	1.66995;
EMBOSS_001;	C/EBP	[T01386];	505;	510;	7.172312;	GATGCA;	1.72412;	1.66918;
EMBOSS_001;	C/EBP	[T01386];	507;	512;	7.172312;	TGCATC;	1.72412;	1.66918;
EMBOSS_001;	C/EBP	[T01386];	524;	529;	12.067266;	GCCGCA;	1.72412;	2.54368;
EMBOSS_001;	C/EBP	[T01386];	687;	692;	1.583727;	TTTGCA;	0.57471;	0.41834;
EMBOSS_001;	C/EBP	[T01386];	689;	694;	7.172312;	TGCATT;	1.72412;	1.66918;
EMBOSS_001;	C/EBP	[T01386];	887;	892;	13.650994;	TGCGCG;	1.72412;	2.55323;
EMBOSS_001;	C/EBP	[T01386];	921;	926;	12.067266;	GGCGCA;	1.72412;	2.54368;
EMBOSS_001;	C/EBP	[T01386];	987;	992;	12.067266;	TGCGCC;	1.72412;	2.54368;
EMBOSS_001;	C/EBP	[T01386];	1051;	1056;	1.583727;	CTTGCA;	0.57471;	0.41834;
EMBOSS_001;	C/EBP	[T01386];	1053;	1058;	7.172312;	TGCACC;	1.72412;	1.66918;
EMBOSS_001;	C/EBP	[T01386];	1148;	1153;	13.650994;	TGCGCG;	1.72412;	2.55323;
EMBOSS_001;	C/EBP	[T01386];	1150;	1155;	13.650994;	CGCGCA;	1.72412;	2.55323;
EMBOSS_001;	C/EBP	[T01386];	1162;	1167;	12.067266;	GCCGCA;	1.72412;	2.54368;
EMBOSS_001;	Elk-1	[T00250];	2;	6;	2.314032;	GTTCC;	1.14941;	1.25493;
EMBOSS_001;	Elk-1	[T00250];	51;	55;	6.853012;	AGTCC;	3.44824;	3.36075;
EMBOSS_001;	Elk-1	[T00250];	70;	74;	6.081668;	TATCC;	2.29883;	2.09011;
EMBOSS_001;	Elk-1	[T00250];	96;	100;	6.853012;	GGACT;	3.44824;	3.36075;
EMBOSS_001;	Elk-1	[T00250];	101;	105;	5.092035;	GGAGG;	1.14941;	1.91296;
EMBOSS_001;	Elk-1	[T00250];	110;	114;	2.121196;	TTTCC;	1.14941;	0.84065;
EMBOSS_001;	Elk-1	[T00250];	122;	126;	2.121196;	GGAAA;	1.14941;	0.84065;
EMBOSS_001;	Elk-1	[T00250];	133;	137;	0.000000;	CTTCC;	1.14941;	1.24816;
EMBOSS_001;	Elk-1	[T00250];	196;	200;	6.081668;	GGACA;	2.29883;	2.09011;
EMBOSS_001;	Elk-1	[T00250];	206;	210;	6.853012;	AGTCC;	3.44824;	3.36075;
EMBOSS_001;	Elk-1	[T00250];	255;	259;	2.121196;	TTTCC;	1.14941;	0.84065;
EMBOSS_001;	Elk-1	[T00250];	273;	277;	7.984576;	GGAGT;	1.14941;	1.28376;
EMBOSS_001;	Elk-1	[T00250];	286;	290;	0.000000;	GGAAG;	1.14941;	1.24816;
EMBOSS_001;	Elk-1	[T00250];	311;	315;	5.092035;	GGAGG;	1.14941;	1.91296;
EMBOSS_001;	Elk-1	[T00250];	336;	340;	2.121196;	TTTCC;	1.14941;	0.84065;
EMBOSS_001;	Elk-1	[T00250];	339;	343;	5.092035;	CCTCC;	1.14941;	1.91296;
EMBOSS_001;	Elk-1	[T00250];	344;	348;	7.213232;	TCTCC;	3.44824;	3.36075;
EMBOSS_001;	Elk-1	[T00250];	375;	379;	2.314032;	GGAAC;	1.14941;	1.25493;
EMBOSS_001;	Elk-1	[T00250];	382;	386;	7.213232;	TCTCC;	3.44824;	3.36075;
EMBOSS_001;	Elk-1	[T00250];	397;	401;	6.274504;	GGATC;	2.29883;	3.12474;
EMBOSS_001;	Elk-1	[T00250];	400;	404;	7.213232;	TCTCC;	3.44824;	3.36075;
EMBOSS_001;	Elk-1	[T00250];	405;	409;	5.092035;	GGAGG;	1.14941;	1.91296;
EMBOSS_001;	Elk-1	[T00250];	419;	423;	6.274504;	GGATC;	2.29883;	3.12474;
EMBOSS_001;	Elk-1	[T00250];	420;	424;	6.274504;	GATCC;	2.29883;	3.12474;
EMBOSS_001;	Elk-1	[T00250];	448;	452;	6.853012;	GGACT;	3.44824;	3.36075;
EMBOSS_001;	Elk-1	[T00250];	459;	463;	6.274504;	GGATC;	2.29883;	3.12474;

EMBOSS_001;	Elk-1	[T00250];	460;	464;	6.274504;	GATCC;	2.29883;	3.12474;
EMBOSS_001;	Elk-1	[T00250];	501;	505;	0.000000;	GGAAG;	1.14941;	1.24816;
EMBOSS_001;	Elk-1	[T00250];	509;	513;	3.960472;	CATCC;	2.29883;	3.15260;
EMBOSS_001;	Elk-1	[T00250];	515;	519;	6.853012;	GGACT;	3.44824;	3.36075;
EMBOSS_001;	Elk-1	[T00250];	532;	536;	7.213232;	GGAGA;	3.44824;	3.36075;
EMBOSS_001;	Elk-1	[T00250];	549;	553;	7.213232;	TCTCC;	3.44824;	3.36075;
EMBOSS_001;	Elk-1	[T00250];	557;	561;	6.853012;	GGACT;	3.44824;	3.36075;
EMBOSS_001;	Elk-1	[T00250];	576;	580;	6.853012;	AGTCC;	3.44824;	3.36075;
EMBOSS_001;	Elk-1	[T00250];	602;	606;	6.274504;	GGTCC;	2.29883;	3.12474;
EMBOSS_001;	Elk-1	[T00250];	617;	621;	2.121196;	GGAAA;	1.14941;	0.84065;
EMBOSS_001;	Elk-1	[T00250];	622;	626;	2.121196;	GGAAA;	1.14941;	0.84065;
EMBOSS_001;	Elk-1	[T00250];	662;	666;	3.960472;	GGACG;	2.29883;	3.15260;
EMBOSS_001;	Elk-1	[T00250];	696;	700;	3.960472;	CATCC;	2.29883;	3.15260;
EMBOSS_001;	Elk-1	[T00250];	712;	716;	7.213232;	TCTCC;	3.44824;	3.36075;
EMBOSS_001;	Elk-1	[T00250];	723;	727;	7.213232;	TCTCC;	3.44824;	3.36075;
EMBOSS_001;	Elk-1	[T00250];	749;	753;	6.274504;	GATCC;	2.29883;	3.12474;
EMBOSS_001;	Elk-1	[T00250];	758;	762;	5.092035;	GGAGG;	1.14941;	1.91296;
EMBOSS_001;	Elk-1	[T00250];	763;	767;	2.121196;	GGAAA;	1.14941;	0.84065;
EMBOSS_001;	Elk-1	[T00250];	770;	774;	2.892540;	GGAAT;	1.14941;	0.83518;
EMBOSS_001;	Elk-1	[T00250];	812;	816;	0.000000;	GGAAG;	1.14941;	1.24816;
EMBOSS_001;	Elk-1	[T00250];	816;	820;	0.000000;	GGAAG;	1.14941;	1.24816;
EMBOSS_001;	Elk-1	[T00250];	855;	859;	0.000000;	CTTCC;	1.14941;	1.24816;
EMBOSS_001;	Elk-1	[T00250];	868;	872;	5.092035;	GGAGG;	1.14941;	1.91296;
EMBOSS_001;	Elk-1	[T00250];	871;	875;	5.092035;	GGAGG;	1.14941;	1.91296;
EMBOSS_001;	Elk-1	[T00250];	878;	882;	5.092035;	GGAGG;	1.14941;	1.91296;
EMBOSS_001;	Elk-1	[T00250];	913;	917;	5.092035;	GGAGG;	1.14941;	1.91296;
EMBOSS_001;	Elk-1	[T00250];	916;	920;	3.960472;	GGACG;	2.29883;	3.15260;
EMBOSS_001;	Elk-1	[T00250];	975;	979;	5.092035;	GGAGG;	1.14941;	1.91296;
EMBOSS_001;	Elk-1	[T00250];	978;	982;	7.406067;	GGAGC;	1.14941;	1.86883;
EMBOSS_001;	Elk-1	[T00250];	1012;	1016;	7.406067;	GGAGC;	1.14941;	1.86883;
EMBOSS_001;	Elk-1	[T00250];	1017;	1021;	7.406067;	GCTCC;	1.14941;	1.86883;
EMBOSS_001;	Elk-1	[T00250];	1065;	1069;	2.892540;	ATTCC;	1.14941;	0.83518;
EMBOSS_001;	Elk-1	[T00250];	1073;	1077;	2.121196;	TTTCC;	1.14941;	0.84065;
EMBOSS_001;	Elk-1	[T00250];	1079;	1083;	7.213232;	GGAGA;	3.44824;	3.36075;
EMBOSS_001;	Elk-1	[T00250];	1137;	1141;	0.000000;	CTTCC;	1.14941;	1.24816;
EMBOSS_001;	Elk-1	[T00250];	1143;	1147;	7.213232;	TCTCC;	3.44824;	3.36075;
EMBOSS_001;	Sp3	[T02419];	93;	103;	6.239006;	CAGGGACTGGA;	0.02357;	0.04553;
EMBOSS_001;	Sp3	[T02419];	456;	466;	9.740823;	CAGGGATCCGA;	0.02638;	0.04625;
EMBOSS_001;	Sp3	[T02419];	646;	656;	8.563386;	CAGGGGGGCGG;	0.00673;	0.01929;
EMBOSS_001;	Sp3	[T02419];	754;	764;	7.592353;	CAGGGGAGGGG;	0.01010;	0.02848;
EMBOSS_001;	E2F	[T01547];	110;	117;	14.145926;	TTTCCCTC;	1.13145;	1.54612;
EMBOSS_001;	E2F	[T01547];	614;	621;	14.145926;	GAGGGAAA;	1.13145;	1.54612;
EMBOSS_001;	E2F	[T01547];	767;	774;	14.145926;	ACGGGAAT;	1.13145;	1.54612;
EMBOSS_001;	E2F	[T01547];	1017;	1024;	14.145926;	GCTCCCGC;	1.13145;	1.54612;
EMBOSS_001;	STAT1beta	[T01573];	109;	118;	12.705831;	GTTTCCCTCT;	0.12123;	0.09215;
EMBOSS_001;	STAT1beta	[T01573];	118;	127;	5.796867;	TTGGGGAAAT;	0.09092;	0.06055;
EMBOSS_001;	STAT1beta	[T01573];	254;	263;	14.492168;	TTTTCCCCAT;	0.12123;	0.09431;
EMBOSS_001;	STAT1beta	[T01573];	335;	344;	11.593735;	TTTTCTCCT;	0.18184;	0.13396;
EMBOSS_001;	STAT1beta	[T01573];	613;	622;	9.807397;	AGAGGGAAAG;	0.08755;	0.06644;
EMBOSS_001;	STAT1beta	[T01573];	1072;	1081;	5.796867;	TTTTCTTGGA;	0.09092;	0.06055;
EMBOSS_001;	E2F2	[T05976];	107;	119;	14.779356;	CTGTTTCCCTCTT;	0.02115;	0.01874;
EMBOSS_001;	STAT5A	[T04683];	3;	6;	0.000000;	TTCC;	4.59766;	4.17891;
EMBOSS_001;	STAT5A	[T04683];	111;	114;	0.000000;	TTCC;	4.59766;	4.17891;
EMBOSS_001;	STAT5A	[T04683];	122;	125;	0.000000;	GGAA;	4.59766;	4.17891;
EMBOSS_001;	STAT5A	[T04683];	134;	137;	0.000000;	TTCC;	4.59766;	4.17891;
EMBOSS_001;	STAT5A	[T04683];	256;	259;	0.000000;	TTCC;	4.59766;	4.17891;
EMBOSS_001;	STAT5A	[T04683];	286;	289;	0.000000;	GGAA;	4.59766;	4.17891;
EMBOSS_001;	STAT5A	[T04683];	337;	340;	0.000000;	TTCC;	4.59766;	4.17891;
EMBOSS_001;	STAT5A	[T04683];	375;	378;	0.000000;	GGAA;	4.59766;	4.17891;
EMBOSS_001;	STAT5A	[T04683];	501;	504;	0.000000;	GGAA;	4.59766;	4.17891;

EMBOSS_001;	STAT5A	[T04683];	617;	620;	0.000000;	GGAA;	4.59766;	4.17891;
EMBOSS_001;	STAT5A	[T04683];	622;	625;	0.000000;	GGAA;	4.59766;	4.17891;
EMBOSS_001;	STAT5A	[T04683];	763;	766;	0.000000;	GGAA;	4.59766;	4.17891;
EMBOSS_001;	STAT5A	[T04683];	770;	773;	0.000000;	GGAA;	4.59766;	4.17891;
EMBOSS_001;	STAT5A	[T04683];	812;	815;	0.000000;	GGAA;	4.59766;	4.17891;
EMBOSS_001;	STAT5A	[T04683];	816;	819;	0.000000;	GGAA;	4.59766;	4.17891;
EMBOSS_001;	STAT5A	[T04683];	856;	859;	0.000000;	TTCC;	4.59766;	4.17891;
EMBOSS_001;	STAT5A	[T04683];	1066;	1069;	0.000000;	TTCC;	4.59766;	4.17891;
EMBOSS_001;	STAT5A	[T04683];	1074;	1077;	0.000000;	TTCC;	4.59766;	4.17891;
EMBOSS_001;	STAT5A	[T04683];	1138;	1141;	0.000000;	TTCC;	4.59766;	4.17891;
EMBOSS_001;	C/EBPdelta	[T00109];	125;	127;	0.000000;	AAT;	18.39062;	9.39807;
EMBOSS_001;	C/EBPdelta	[T00109];	321;	323;	0.000000;	ATT;	18.39062;	9.39807;
EMBOSS_001;	C/EBPdelta	[T00109];	362;	364;	0.000000;	AAT;	18.39062;	9.39807;
EMBOSS_001;	C/EBPdelta	[T00109];	681;	683;	0.000000;	ATT;	18.39062;	9.39807;
EMBOSS_001;	C/EBPdelta	[T00109];	692;	694;	0.000000;	ATT;	18.39062;	9.39807;
EMBOSS_001;	C/EBPdelta	[T00109];	702;	704;	0.000000;	AAT;	18.39062;	9.39807;
EMBOSS_001;	C/EBPdelta	[T00109];	703;	705;	0.000000;	ATT;	18.39062;	9.39807;
EMBOSS_001;	C/EBPdelta	[T00109];	772;	774;	0.000000;	AAT;	18.39062;	9.39807;
EMBOSS_001;	C/EBPdelta	[T00109];	789;	791;	0.000000;	AAT;	18.39062;	9.39807;
EMBOSS_001;	C/EBPdelta	[T00109];	825;	827;	0.000000;	AAT;	18.39062;	9.39807;
EMBOSS_001;	C/EBPdelta	[T00109];	1061;	1063;	0.000000;	ATT;	18.39062;	9.39807;
EMBOSS_001;	C/EBPdelta	[T00109];	1065;	1067;	0.000000;	ATT;	18.39062;	9.39807;
EMBOSS_001;	NF-kappaB1	[T00593];	120;	131;	14.113256;	GGGGAAATGCTA;	0.02876;	0.05159;
EMBOSS_001;	AP-3 (2)	[T00039];	129;	135;	7.527031;	CTAACTT;	1.07758;	0.63930;
EMBOSS_001;	AP-3 (2)	[T00039];	190;	196;	11.290546;	CTAACAG;	0.86206;	0.53815;
EMBOSS_001;	AP-3 (2)	[T00039];	211;	217;	12.734565;	CTCTTAG;	0.28735;	0.22577;
EMBOSS_001;	AP-3 (2)	[T00039];	280;	286;	7.527031;	AAGTTAG;	1.07758;	0.63930;
EMBOSS_001;	AP-3 (2)	[T00039];	566;	572;	11.290546;	CTAAAGG;	0.86206;	0.53815;
EMBOSS_001;	Sp3	[T02338];	8;	16;	5.221563;	GGGGCTGTG;	0.05388;	0.18532;
EMBOSS_001;	Sp3	[T02338];	172;	180;	6.173662;	CTCTGCCCC;	0.10776;	0.29456;
EMBOSS_001;	Sp3	[T02338];	650;	658;	1.010444;	GGGGCGGGT;	0.03143;	0.12964;
EMBOSS_001;	Sp3	[T02338];	892;	900;	1.234677;	GGGGCTGGC;	0.03143;	0.12964;
EMBOSS_001;	Sp3	[T02338];	908;	916;	4.946079;	GGGGCGGAG;	0.05388;	0.18532;
EMBOSS_001;	Sp3	[T02338];	935;	943;	6.887339;	GGGGCCAGC;	0.08980;	0.21034;
EMBOSS_001;	Sp3	[T02338];	961;	969;	5.652662;	GGGGCGGCG;	0.04490;	0.15459;
EMBOSS_001;	Sp3	[T02338];	1000;	1008;	6.887339;	GGGGCCGCC;	0.08980;	0.21034;
EMBOSS_001;	Sp3	[T02338];	1027;	1035;	5.221563;	CCGGGCCCC;	0.05388;	0.18532;
EMBOSS_001;	Sp3	[T02338];	1164;	1172;	6.634728;	CGCAGCCCC;	0.06286;	0.17126;
EMBOSS_001;	AP-2alpha	[T00033];	7;	15;	5.364288;	TGGGGCTGT;	0.10776;	0.22345;
EMBOSS_001;	AP-2alpha	[T00033];	119;	127;	3.161178;	TGGGGAAAT;	0.03592;	0.05070;
EMBOSS_001;	AP-2alpha	[T00033];	173;	181;	5.364288;	TCTGCCCCA;	0.10776;	0.22345;
EMBOSS_001;	AP-2alpha	[T00033];	254;	262;	2.107452;	TTTTCCCCA;	0.10776;	0.14850;
EMBOSS_001;	AP-2alpha	[T00033];	381;	389;	2.107452;	TTCTCCCCA;	0.10776;	0.14850;
EMBOSS_001;	AP-2alpha	[T00033];	544;	552;	6.513673;	TGGGGTCTC;	0.10776;	0.20155;
EMBOSS_001;	AP-2alpha	[T00033];	865;	873;	2.107452;	TGGGGAGGA;	0.10776;	0.14850;
EMBOSS_001;	AP-2alpha	[T00033];	1166;	1174;	7.567399;	CAGCCCCCA;	0.21552;	0.38778;
EMBOSS_001;	AP-2	[T00034];	115;	124;	10.676661;	CTCTTGGGGA;	0.04939;	0.09381;
EMBOSS_001;	AP-2	[T00034];	257;	266;	13.225137;	TCCCCATCTT;	0.06286;	0.09987;
EMBOSS_001;	AP-2	[T00034];	384;	393;	14.248084;	TCCCCACACA;	0.05725;	0.07676;
EMBOSS_001;	AP-2	[T00034];	751;	760;	8.023205;	TCCCAGGGGA;	0.05276;	0.10314;
EMBOSS_001;	AP-2	[T00034];	756;	765;	10.770370;	GGGGAGGGGA;	0.04041;	0.07069;
EMBOSS_001;	AP-2	[T00034];	861;	870;	7.726527;	GGGGTGGGGA;	0.01010;	0.01677;
EMBOSS_001;	AP-2	[T00034];	1005;	1014;	5.231211;	CGCCGGGGGA;	0.02245;	0.05175;
EMBOSS_001;	AP-2alphaA	[T00035];	33;	38;	0.000000;	GCCTGC;	0.57471;	1.12243;
EMBOSS_001;	AP-2alphaA	[T00035];	170;	175;	3.440418;	GCCTCT;	0.86206;	1.12161;
EMBOSS_001;	AP-2alphaA	[T00035];	287;	292;	3.004803;	GAAGGC;	0.86206;	1.12874;
EMBOSS_001;	AP-2alphaA	[T00035];	405;	410;	2.003202;	GGAGGC;	0.57471;	1.11939;
EMBOSS_001;	AP-2alphaA	[T00035];	493;	498;	3.440418;	GCCTCT;	0.86206;	1.12161;
EMBOSS_001;	AP-2alphaA	[T00035];	676;	681;	0.798453;	GCCTGA;	0.28735;	0.37217;
EMBOSS_001;	AP-2alphaA	[T00035];	871;	876;	2.003202;	GGAGGC;	0.57471;	1.11939;

EMBOSS_001;	AP-2alphaA	[T00035];	878;	883;	2.003202;	GGAGGC;	0.57471;	1.11939;
EMBOSS_001;	AP-2alphaA	[T00035];	1049;	1054;	3.164494;	GCCTTG;	0.86206;	1.12874;
EMBOSS_001;	AP-2alphaA	[T00035];	1124;	1129;	0.159691;	GCCTGG;	0.57471;	1.12243;
EMBOSS_001;	Elk-1	[T05013];	285;	293;	2.458781;	AGGAAGGCT;	0.05388;	0.04395;
EMBOSS_001;	Elk-1	[T05013];	815;	823;	1.510524;	AGGAAGTAT;	0.10776;	0.08747;
EMBOSS_001;	USF2b	[T02377];	326;	333;	12.629773;	AGCATGAC;	1.29309;	1.12466;
EMBOSS_001;	USF2b	[T02377];	573;	580;	12.629773;	GTCAGTCC;	1.29309;	1.12466;
EMBOSS_001;	USF2b	[T02377];	634;	641;	6.942764;	TAGTTGAC;	0.86206;	0.76035;
EMBOSS_001;	USF2b	[T02377];	803;	810;	12.629773;	GTCAAGCC;	1.29309;	1.12466;
EMBOSS_001;	c-Jun	[T00131];	330;	335;	3.054077;	TGACCT;	1.14941;	0.83744;
EMBOSS_001;	c-Jun	[T00131];	571;	576;	2.545064;	GGGTCA;	1.14941;	1.13146;
EMBOSS_001;	c-Jun	[T00131];	638;	643;	2.545064;	TGACAC;	1.14941;	1.13146;
EMBOSS_001;	c-Jun	[T00131];	801;	806;	3.054077;	ATGTCA;	1.14941;	0.83744;
EMBOSS_001;	JunB	[T00436];	330;	335;	2.941176;	TGACCT;	1.72412;	1.54490;
EMBOSS_001;	JunB	[T00436];	571;	576;	4.411765;	GGGTCA;	1.14941;	1.25574;
EMBOSS_001;	JunB	[T00436];	638;	643;	2.941176;	TGACAC;	1.72412;	1.54490;
EMBOSS_001;	JunB	[T00436];	801;	806;	1.470588;	ATGTCA;	1.14941;	0.83425;
EMBOSS_001;	c-Fos	[T00124];	330;	336;	8.219878;	TGACCTT;	0.35919;	0.26148;
EMBOSS_001;	c-Fos	[T00124];	570;	576;	6.733315;	AGGGTCA;	0.43103;	0.41148;
EMBOSS_001;	c-Fos	[T00124];	638;	644;	6.733315;	TGACACT;	0.43103;	0.41148;
EMBOSS_001;	c-Fos	[T00124];	800;	806;	3.671664;	TATGTCA;	0.35919;	0.29441;
EMBOSS_001;	c-Jun	[T00132];	330;	336;	5.994283;	TGACCTT;	0.28735;	0.21167;
EMBOSS_001;	c-Jun	[T00132];	570;	576;	3.963688;	AGGGTCA;	0.35919;	0.34366;
EMBOSS_001;	c-Jun	[T00132];	638;	644;	4.166787;	TGACACT;	0.35919;	0.34366;
EMBOSS_001;	c-Jun	[T00132];	800;	806;	2.842993;	TATGTCA;	0.21552;	0.22453;
EMBOSS_001;	c-Jun	[T00133];	330;	336;	8.319990;	TGACCTT;	0.43103;	0.44161;
EMBOSS_001;	c-Jun	[T00133];	570;	576;	6.491349;	AGGGTCA;	0.43103;	0.46131;
EMBOSS_001;	c-Jun	[T00133];	638;	644;	5.956821;	TGACACT;	0.43103;	0.35020;
EMBOSS_001;	c-Jun	[T00133];	800;	806;	3.966753;	TATGTCA;	0.28735;	0.18295;
EMBOSS_001;	JunD	[T00437];	330;	336;	7.034347;	TGACCTT;	0.86206;	0.83250;
EMBOSS_001;	JunD	[T00437];	570;	576;	7.034347;	AGGGTCA;	0.86206;	0.83250;
EMBOSS_001;	JunD	[T00437];	638;	644;	7.034347;	TGACACT;	0.86206;	0.83250;
EMBOSS_001;	JunD	[T00437];	800;	806;	0.506964;	TATGTCA;	0.43103;	0.33594;
EMBOSS_001;	c-Fos	[T00122];	330;	337;	13.129597;	TGACCTTT;	0.28735;	0.20935;
EMBOSS_001;	c-Fos	[T00122];	569;	576;	8.871459;	AAGGGTCA;	0.07184;	0.06216;
EMBOSS_001;	c-Fos	[T00122];	638;	645;	8.871459;	TGACACTT;	0.07184;	0.06216;
EMBOSS_001;	c-Fos	[T00122];	799;	806;	12.203871;	TTATGTCA;	0.28735;	0.25906;
EMBOSS_001;	ATF3	[T01095];	330;	337;	8.658854;	TGACCTTT;	0.71838;	0.64438;
EMBOSS_001;	ATF3	[T01095];	569;	576;	12.385428;	AAGGGTCA;	0.57471;	0.52500;
EMBOSS_001;	ATF3	[T01095];	638;	645;	12.385428;	TGACACTT;	0.57471;	0.52500;
EMBOSS_001;	ATF3	[T01095];	799;	806;	7.453148;	TTATGTCA;	0.35919;	0.25750;
EMBOSS_001;	C/EBPbeta(p20)	[T01420];	356;	363;	7.000129;	CTTTACAA;	0.48491;	0.24261;
EMBOSS_001;	C/EBPbeta(p20)	[T01420];	688;	695;	10.500194;	TTGCATTT;	0.70042;	0.37415;
EMBOSS_001;	C/EBPbeta(p20)	[T01420];	1052;	1059;	14.000258;	TTGCACCC;	0.96982;	0.56555;
EMBOSS_001;	E2F-1	[T01542];	523;	529;	9.608274;	GGCCGCA;	0.57471;	0.93528;
EMBOSS_001;	E2F-1	[T01542];	538;	544;	10.575502;	AGCGGTT;	0.28735;	0.38572;
EMBOSS_001;	E2F-1	[T01542];	652;	658;	5.944817;	GGCGGGT;	0.28735;	0.85840;
EMBOSS_001;	E2F-1	[T01542];	659;	665;	7.879274;	GGCGGAC;	0.71838;	1.63333;
EMBOSS_001;	E2F-1	[T01542];	881;	887;	7.879274;	GGCGGCT;	0.71838;	1.63333;
EMBOSS_001;	E2F-1	[T01542];	889;	895;	3.397038;	CGCGGGG;	0.43103;	0.89786;
EMBOSS_001;	E2F-1	[T01542];	900;	906;	5.944817;	CGCGGGC;	0.28735;	0.85840;
EMBOSS_001;	E2F-1	[T01542];	910;	916;	5.331496;	GGCGGAG;	0.28735;	0.84237;
EMBOSS_001;	E2F-1	[T01542];	927;	933;	5.944817;	CGCGGGC;	0.28735;	0.85840;
EMBOSS_001;	E2F-1	[T01542];	963;	969;	5.331496;	GGCGGCG;	0.28735;	0.84237;
EMBOSS_001;	E2F-1	[T01542];	966;	972;	5.331496;	GGCGGCG;	0.28735;	0.84237;
EMBOSS_001;	E2F-1	[T01542];	971;	977;	0.000000;	CGCGGGA;	0.14368;	0.33699;
EMBOSS_001;	E2F-1	[T01542];	980;	986;	7.673817;	AGCGGGC;	0.28735;	0.57470;
EMBOSS_001;	E2F-1	[T01542];	1002;	1008;	7.879274;	GGCCGCC;	0.71838;	1.63333;
EMBOSS_001;	E2F-1	[T01542];	1019;	1025;	0.000000;	TCCCGCC;	0.14368;	0.33699;
EMBOSS_001;	E2F-1	[T01542];	1022;	1028;	5.331496;	CGCCGCC;	0.28735;	0.84237;

EMBOSS_001;	E2F-1	[T01542];	1032;	1038;	3.397038;	CCCCGCG;	0.43103;	0.89786;
EMBOSS_001;	E2F-1	[T01542];	1035;	1041;	5.944817;	CGCGGGC;	0.28735;	0.85840;
EMBOSS_001;	E2F-1	[T01542];	1066;	1072;	3.663457;	TTCCGCT;	0.43103;	0.89786;
EMBOSS_001;	E2F-1	[T01542];	1085;	1091;	9.608274;	AGCGGCC;	0.57471;	0.93528;
EMBOSS_001;	E2F-1	[T01542];	1093;	1099;	7.879274;	GGCCGCG;	0.71838;	1.63333;
EMBOSS_001;	E2F-1	[T01542];	1104;	1110;	7.879274;	GGCCGCG;	0.71838;	1.63333;
EMBOSS_001;	E2F-1	[T01542];	1118;	1124;	5.944817;	GCCCGCG;	0.28735;	0.85840;
EMBOSS_001;	E2F-1	[T01542];	1128;	1134;	5.944817;	GGCGGGC;	0.28735;	0.85840;
EMBOSS_001;	E2F-1	[T01542];	1158;	1164;	6.298724;	CACCGCC;	0.14368;	0.35302;
EMBOSS_001;	E2F-1	[T01542];	1161;	1167;	7.060495;	CGCCGCA;	0.28735;	0.56397;
EMBOSS_001;	USF2	[T02115];	330;	335;	1.796148;	TGACCT;	0.28735;	0.24883;
EMBOSS_001;	USF2	[T02115];	571;	576;	0.000000;	GGGTCA;	0.28735;	0.37706;
EMBOSS_001;	USF2	[T02115];	638;	643;	0.537759;	TGACAC;	1.14941;	1.24594;
EMBOSS_001;	USF2	[T02115];	801;	806;	2.333908;	ATGTCA;	0.86206;	0.58861;
EMBOSS_001;	c-Fos	[T00123];	329;	336;	12.992464;	ATGACCTT;	0.35919;	0.33726;
EMBOSS_001;	c-Fos	[T00123];	570;	577;	9.277619;	AGGGTCAG;	0.19756;	0.22205;
EMBOSS_001;	c-Fos	[T00123];	637;	644;	9.905753;	TTGACACT;	0.34123;	0.30095;
EMBOSS_001;	c-Fos	[T00123];	800;	807;	9.815513;	TATGTCAA;	0.34123;	0.30095;
EMBOSS_001;	USF2	[T00878];	634;	642;	13.273289;	TAGTTGACA;	0.13470;	0.11966;
EMBOSS_001;	Sp1	[T00759];	649;	657;	0.000000;	GGGGGCGGG;	0.01796;	0.08315;
EMBOSS_001;	Sp1	[T00759];	656;	664;	10.523575;	GGTGGCGGA;	0.09429;	0.17898;
EMBOSS_001;	Sp1	[T00759];	878;	886;	9.713277;	GGAGGCGGC;	0.12123;	0.32918;
EMBOSS_001;	Sp1	[T00759];	907;	915;	2.416885;	AGGGGCGGA;	0.04939;	0.17018;
EMBOSS_001;	Sp1	[T00759];	960;	968;	2.426534;	GGGGGCGGC;	0.04939;	0.17018;
EMBOSS_001;	Sp1	[T00759];	963;	971;	10.820862;	GGCGGCGGC;	0.17511;	0.39768;
EMBOSS_001;	Sp1	[T00759];	1003;	1011;	12.008710;	GCCGCCGGG;	0.22449;	0.50402;
EMBOSS_001;	Sp1	[T00759];	1020;	1028;	8.394328;	CCCGCCGCC;	0.08082;	0.23180;
EMBOSS_001;	Sp1	[T00759];	1023;	1031;	12.008710;	GCCGCCGGG;	0.22449;	0.50402;
EMBOSS_001;	Sp1	[T00759];	1105;	1113;	11.716571;	GCCGCCAGC;	0.09878;	0.18890;
EMBOSS_001;	Sp1	[T00759];	1125;	1133;	9.465589;	CCTGGCGGG;	0.12123;	0.32918;
EMBOSS_001;	Sp1	[T00759];	1159;	1167;	11.116482;	ACCGCCGCA;	0.17511;	0.39768;
EMBOSS_001;	Sp1	[T00755];	650;	658;	0.839384;	GGGGCGGGT;	0.03592;	0.12671;
EMBOSS_001;	Sp1	[T00755];	908;	916;	0.355580;	GGGGCGGAG;	0.00898;	0.03993;
EMBOSS_001;	Sp1	[T00755];	919;	927;	9.474771;	CGGGCGCAC;	0.13470;	0.29209;
EMBOSS_001;	Sp1	[T00755];	961;	969;	1.066740;	GGGGCGGCG;	0.03592;	0.12671;
EMBOSS_001;	C/EBPalpha	[T00104];	17;	22;	0.359839;	GCAACG;	0.86206;	1.02830;
EMBOSS_001;	C/EBPalpha	[T00104];	59;	64;	0.359839;	GCAACT;	0.86206;	1.02830;
EMBOSS_001;	C/EBPalpha	[T00104];	686;	691;	2.166790;	TTTTGC;	0.28735;	0.17920;
EMBOSS_001;	C/EBPalpha	[T00104];	1050;	1055;	3.610025;	CCTTGC;	1.14941;	1.25493;
EMBOSS_001;	C/EBPalpha	[T00105];	15;	20;	1.717627;	TGGCAA;	1.72412;	1.35830;
EMBOSS_001;	C/EBPalpha	[T00105];	57;	62;	0.858813;	GGGCAA;	1.14941;	1.18762;
EMBOSS_001;	C/EBPalpha	[T00105];	688;	693;	1.288220;	TTGCAT;	1.72412;	1.35830;
EMBOSS_001;	C/EBPalpha	[T00105];	1052;	1057;	0.644110;	TTGCAC;	0.57471;	0.42803;
EMBOSS_001;	C/EBPalpha	[T00108];	15;	20;	3.200469;	TGGCAA;	1.72412;	1.79106;
EMBOSS_001;	C/EBPalpha	[T00108];	57;	62;	2.794677;	GGGCAA;	1.72412;	1.79106;
EMBOSS_001;	C/EBPalpha	[T00108];	688;	693;	0.162317;	TTGCAT;	0.57471;	0.41834;
EMBOSS_001;	C/EBPalpha	[T00108];	1052;	1057;	0.000000;	TTGCAC;	0.57471;	0.41834;
EMBOSS_001;	C/EBPbeta	[T00459];	15;	20;	2.241783;	TGGCAA;	1.14941;	0.93755;
EMBOSS_001;	C/EBPbeta	[T00459];	57;	62;	0.837896;	GGGCAA;	0.86206;	0.72109;
EMBOSS_001;	C/EBPbeta	[T00459];	688;	693;	0.755939;	TTGCAT;	0.86206;	0.72109;
EMBOSS_001;	C/EBPbeta	[T00459];	1052;	1057;	0.000000;	TTGCAC;	0.28735;	0.24883;
EMBOSS_001;	C/EBPbeta	[T00581];	14;	20;	4.807336;	GTGGCAA;	0.57471;	0.48488;
EMBOSS_001;	C/EBPbeta	[T00581];	56;	62;	3.924278;	CGGGCAA;	0.35919;	0.37663;
EMBOSS_001;	C/EBPbeta	[T00581];	688;	694;	3.546773;	TTGCATT;	0.43103;	0.25364;
EMBOSS_001;	C/EBPbeta	[T00581];	1052;	1058;	0.805985;	TTGCACC;	0.21552;	0.17437;
EMBOSS_001;	PBF	[T02693];	379;	386;	6.570033;	CCTTCTCC;	0.21552;	0.20163;
EMBOSS_001;	PBF	[T02693];	827;	834;	7.632876;	TAAGAAGG;	0.21552;	0.20222;
EMBOSS_001;	PEND	[T05977];	792;	802;	13.253194;	AAACCTCTTAT;	0.01768;	0.00491;
EMBOSS_001;	PEND	[T05977];	826;	836;	4.603069;	ATAAGAAGGGC;	0.00561;	0.00219;
EMBOSS_001;	NF-kappaB	[T00588];	121;	130;	9.122788;	GGGAAATGCT;	0.03816;	0.04248;

EMBOSS_001; NF-kappaB [T00588]; 851; 860; 4.125075; GGTGCTTCCC; 0.00898; 0.01480;
 EMBOSS_001; NF-kappaB [T00588]; 1133; 1142; 13.179658; GCTTCTTCCC; 0.02245; 0.02586;
 EMBOSS_001; STAT6 [T01581]; 117; 125; 11.888081; CTTGGGGAA; 0.02694; 0.02036;
 EMBOSS_001; STAT6 [T01581]; 612; 620; 8.819774; TAGAGGGAA; 0.05837; 0.04828;
 EMBOSS_001; STAT6 [T01581]; 765; 773; 14.835612; AAACGGGAA; 0.09429; 0.13186;
 EMBOSS_001; STAT6 [T01581]; 807; 815; 12.945688; AGCCGGGAA; 0.01347; 0.02655;
 EMBOSS_001; STAT6 [T01581]; 856; 864; 13.630951; TTCCCGGGG; 0.02694; 0.04537;
 EMBOSS_001; E2F-1:DP-1 [T05204]; 651; 659; 11.967645; GGGCGGGTG; 0.12123; 0.27364;
 EMBOSS_001; E2F-1:DP-1 [T05204]; 658; 666; 14.802692; TGGCGGACG; 0.07184; 0.16484;
 EMBOSS_001; E2F-1:DP-1 [T05204]; 897; 905; 10.127795; TGGCGCGGG; 0.10327; 0.23651;
 EMBOSS_001; E2F-1:DP-1 [T05204]; 968; 976; 14.647653; CGGCGCGGG; 0.10776; 0.29311;
 EMBOSS_001; E2F-1:DP-1 [T05204]; 1018; 1026; 7.233658; CTCCCGCCG; 0.04490; 0.09327;
 EMBOSS_001; E2F-1:DP-1 [T05204]; 1103; 1111; 14.226209; GGGCCGCCA; 0.16613; 0.33122;
 EMBOSS_001; E2F-1:DP-1 [T05204]; 1119; 1127; 12.011069; CCCGCGCCT; 0.12123; 0.27364;
 EMBOSS_001; E2F-1:DP-1 [T05204]; 1127; 1135; 6.106834; TGGCGGGCT; 0.01796; 0.03737;
 EMBOSS_001; Sp1 [T01228]; 649; 659; 8.660229; GGGGGCGGGTG; 0.01852; 0.06031;
 EMBOSS_001; Sp1 [T01228]; 966; 976; 11.373466; GGGCGCGCGGG; 0.01515; 0.05198;
 EMBOSS_001; Sp1 [T01228]; 1018; 1028; 11.373466; CTCCCGCCGCC; 0.01515; 0.05198;
 EMBOSS_001; Sp1 [T01228]; 1119; 1129; 13.898109; CCCGCGCCTGG; 0.07829; 0.18694;
 EMBOSS_001; E2F-1 [T01543]; 649; 657; 6.363515; GGGGGCGGG; 0.12123; 0.43862;
 EMBOSS_001; E2F-1 [T01543]; 886; 894; 4.354054; CTGCGCGGG; 0.16164; 0.32622;
 EMBOSS_001; E2F-1 [T01543]; 897; 905; 7.017115; TGGCGCGGG; 0.08082; 0.27033;
 EMBOSS_001; E2F-1 [T01543]; 924; 932; 7.224594; GCACGCGGG; 0.08082; 0.27033;
 EMBOSS_001; E2F-1 [T01543]; 968; 976; 7.432073; CGGCGCGGG; 0.24245; 0.63526;
 EMBOSS_001; E2F-1 [T01543]; 977; 985; 7.862612; AGGAGCGGG; 0.16164; 0.35798;
 EMBOSS_001; E2F-1 [T01543]; 1020; 1028; 6.363515; CCCGCCGCC; 0.12123; 0.43862;
 EMBOSS_001; E2F-1 [T01543]; 1032; 1040; 7.432073; CCCCGCGGG; 0.24245; 0.63526;
 EMBOSS_001; E2F-1 [T01543]; 1033; 1041; 7.224594; CCCGCGGGC; 0.08082; 0.27033;
 EMBOSS_001; E2F-1 [T01543]; 1119; 1127; 7.432073; CCCGCGCCT; 0.24245; 0.63526;
 EMBOSS_001; E2F-1 [T01543]; 1125; 1133; 3.492976; CCTGGCGGG; 0.08082; 0.22726;
 EMBOSS_001; Sp1 [T00753]; 651; 656; 0.000000; GGGCGG; 0.28735; 0.87690;
 EMBOSS_001; Sp1 [T00753]; 909; 914; 0.000000; GGGCGG; 0.28735; 0.87690;
 EMBOSS_001; Sp1 [T00753]; 962; 967; 0.000000; GGGCGG; 0.28735; 0.87690;
 EMBOSS_001; Sp1 [T00752]; 650; 659; 2.866783; GGGGCGGGTG; 0.03143; 0.09412;
 EMBOSS_001; Sp1 [T00752]; 908; 917; 0.380930; GGGGCGGAGG; 0.00449; 0.01594;
 EMBOSS_001; Sp1 [T00752]; 961; 970; 1.029779; GGGGCGGCGG; 0.00898; 0.04140;
 EMBOSS_001; Sp1 [T00754]; 650; 659; 1.600535; GGGGCGGGTG; 0.01796; 0.07126;
 EMBOSS_001; Sp1 [T00754]; 908; 917; 1.448144; GGGGCGGAGG; 0.01796; 0.07126;
 EMBOSS_001; Sp1 [T00754]; 961; 970; 2.055715; GGGGCGGCGG; 0.02133; 0.07547;
 EMBOSS_001; Sp3 [T02453]; 905; 917; 9.952027; GCAGGGGCGGAGG; 0.01105; 0.03707;
 EMBOSS_001; Sp3 [T02453]; 958; 970; 12.222268; TCGGGGGCGGCGG; 0.01694; 0.05214;
 EMBOSS_001; AP-4 [T00036]; 939; 949; 14.778930; CCAGCTGCTCG; 0.08839; 0.14770;
 EMBOSS_001; USF1 [T00874]; 487; 495; 9.123035; GCACGAGCC; 0.17062; 0.29414;
 EMBOSS_001; USF1 [T00874]; 605; 613; 8.880673; CCACGCGTA; 0.17062; 0.29414;
 EMBOSS_001; USF1 [T00874]; 924; 932; 9.000791; GCACGCGGG; 0.17062; 0.29414;

-- END -----

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı : Yasemin KELEŞ
Doğum tarihi ve yeri :
e-posta :

Öğrenim Bilgileri

Derece	Okul/Program	Yıl
Y. Lisans	Balıkesir Üniversitesi/Moleküler Biyoloji ve Genetik	2023
Lisans	Balıkesir Üniversitesi/ Moleküler Biyoloji ve Genetik	2020
Lise	Tire Öğretmen Melehat Aksoy Anadolu Öğretmen Lisesi	2016