



T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

**ADAMTS AGREKAZLARIN KONDROSİTLERDEKİ
BİYOLOJİK ROLLERİ VE KLİNİK UYGULAMA
POTANSİYELLERİ**

Dilek GÜN BİLGİÇ

TIPTA UZMANLIK TEZİ
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

Danışman

Prof. Dr. Tülin ÇORA

Konya-2015



T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

**ADAMTS AGREKAZLARIN KONDROSİTLERDEKİ
BİYOLOJİK ROLLERİ VE KLİNİK UYGULAMA
POTANSİYELLERİ**

Dilek GÜN BİLGİÇ

TIPTA UZMANLIK TEZİ
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

Danışman

Prof. Dr. Tülin ÇORA

Bu araştırma Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu tarafından 112S611
proje numarası ile desteklenmiştir.

Konya-2015

ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR

Bu tez çalışması, 112S611 numaralı TÜBİTAK projesi desteği ile gerçekleştirilmiştir. Maddi katkılarından dolayı TÜBİTAK'a teşekkür ederim. Uzmanlık eğitimim boyunca bilgi ve tecrübelerini aktaran, bu tez için desteklerini esirgemeyen Prof. Dr. Tülin ÇORA'ya teşekkürlerimi sunarım. Hayatımın her noktasında desteğiyle ve sevgisiyle, hayatımı güzelleştiren sevgili eşime ve ailesine, beni hayata kazandıran anneme ve babama, biricik kardeşime teşekkür ederim.



İÇİNDEKİLER	Sayfa no
SİMGELER ve KISALTMALAR	vi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Osteoartrit Epidemiyolojisi	2
2.2. OA Patogenez	3
2.3. Agrekan	4
2.4. ADAMTS Gen Ailesi	5
2.5. ADAMTS 4 ve 5	6
2.6. ADAMTS5 Gen Regülasyonu	7
2.7. TNF α – NF κ B Sinyal Yolağı	9
2.8. Projenin Amacı	15
3. GEREÇ ve YÖNTEM	16
3.1. Hücre Kültürü ve Stoklama	16
3.2. Hücre Sayımı	17
3.3. Hücrelere TNF α Uygulanması	18
3.4. Gen Ekspresyon Analizi	18
3.4.1. Real Time qPZR Analizi	18
3.4.1.1. Gradyent PZR ve Primerlerin Hazırlanışı	18
3.4.1.2. RNA İzolasyonu	21
3.4.1.3. cDNA Analizi	22
3.4.1.4. Agaroz Jel Elektroforezi	23
3.4.1.5. Kantitatif Real Time PZR (RT-PZR) Optimizasyonu ve Hedef Genlerin Analizi	23
3.4.2. Western Blot Yöntemiyle Protein Analizi	24

3.4.2.1. %10'luk SDS-PAGE Jelin Hazırlanması	25
3.4.2.2. Proteinlerin Jele Yüklenmesi , Membrana Transferi ve Blotlama	27
3.4.2.3. Membranın Antikorlarla Muamelesi	28
3.4.2.4. Western Blot Sonuçlarının Görüntülenmesi	29
3.5. ADAMTS5 Geni Promoter DNA Dizisinin Klonlaması	29
3.5.1. ADAMTS5 Gen Promoter DNA Dizisinin PZR ile Çoğaltılması	31
3.5.2. PZR Ürünlerinin Pürifikasyonu	31
3.5.3. PZR Ürünlerinin Restriksiyon Enzimleri ile Kesimi ve Defosforilizasyon	32
3.5.4. PZR Ürünlerinin Plazmide Ligasyonu ve Plazmid Konstraktının Bakteriye Transformasyonu	33
3.5.5. Koloni PZR	34
3.5.6. Mini Prep ve Maksi Prep Plazmid İzolasyonu	35
3.5.7. Plazmid İzolasyonu	36
3.5.8. Enzim Kesimi ile plazmidlerde İnsert Varlığının Kontrolü	36
3.5.9. ADAMS5 Geni Promotor DNA Dizisi İçeren Plazmid Konstraktlarının OUMS27 ve HEK-293T Hücrelerine Transfeksiyonu	38
3.6. ADAMS5 Geni Promotor Dizisinin Lusiferaz Assay ile İncelenmesi	38
3.7. İstatistiksel Analizler	39
4. BULGULAR	40
4.1 Hücre Kültürü	40
4.2. Gen Ekspresyon Sonuçları	41
4.2.1. Real time qPZR Sonuçları	41

4.2.1.1. OUMS-27 ve HEK-293T Hücrelerinde TNF α Uygulaması ve β aktin Geni Ekspresyonu	41
4.2.1.2. HEK-293T Hücrelerinde TNF α Uygulaması ve I κ B α Geni Ekspresyonu	42
4.2.1.3. HEK-293T Hücrelerinde TNF α Uygulaması ve ADAMTS5 Gen Ekspresyonu	42
4.2.1.4. HEK-293T Hücrelerinde TNF α Uygulaması ve ADAMTS5, I κ B α ve TNF α Gen Ekspresyonu	43
4.2.1.5. OUMS-27 Hücrelerinde TNF α Uygulaması ve ADAMTS5, I κ B α Gen Ekspresyonu	44
4.2.1.6. OUMS-27 Hücrelerinde TNF α Uygulaması ve ADAMTS4 Gen Ekspresyonu	46
4.2.2. Western Blot Sonuçları	47
4.2.2.1. OUMS-27 Hücrelerinde TNF α Uygulaması ve β Aktin Proteini Ekspresyon Analizi	47
4.2.2.2. OUMS-27 Hücrelerinde TNF α Uygulaması ve ADAMTS5 Proteini Ekspresyon Analizi	48
4.2.2.3. OUMS-27 Hücrelerinde TNF α Uygulaması ve ADAMTS4 Proteini Ekspresyon Analizi	49
4.2.2.4. ADAMTS5 Geni Promoter Bölgesi Plazmid Ekspresyon Konstraktlarının Lusiferaz Aktivitesi Sonuçları	50
4.3. HEK-293T ve OUMS-27 Hücrelerinde Lusiferaz Deney Sonuçları	51
5. TARTIŞMA	54
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	58

7. KAYNAKLAR	59
8. ÖZET	63
9. SUMMARY	65
Ek-1	66
Ek-2	66
ÖZGEÇMİŞ	68



SİMGELER ve KISALTMALAR

OA:	Osteoartrit
ADAMTS:	A disintegrin-like and metalloprotease thrombospondin tip 1 motif
TNF α :	Tümör nekroz faktör α
NF κ B:	Nükleer faktör κ B
IL:	İnterlökin 1
MMP:	Matriks metalloproteazlar
NO:	Nitrik oksit
TSR :	Trombospondin tekrar bölgesi
Glu:	Glutamik asit
mRNA:	Messenger ribonükleik asit
RUNX2:	Runt-related transcription factor
C/EBP β :	CCAAT/enhancer binding protein
HIF1A:	Hypoxia inducible factor1 A
STAT:	Signal transducer and activator of transcription
RelA:	V-rel avian reticuloendotheliosis viral oncogene homolog A
IKK:	Inhibitor κ B kinase
MAPK:	Mitogen-activated protein kinase
AP1:	Activator protein
TNF-R:	TNF receptor
SV40:	Simian virus 40
PBS:	Phosphate buffered saline
FBS:	Fetal bovine serum
DMSO:	Dimethyl sulfoxide

qPZR:	Kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu
cDNA:	Complementary deoksiribonükleik asit
DEPC:	Diethylpyrocarbonate
APS:	Ammonium persulfate
SDS:	Sodium dodecyl sulfate
CMV:	Cytomegalovirus
GFP:	Green fluorescent protein
LB:	Luria-Bertani
HEK:	Human embryonic kidney

1. GİRİŞ

Osteoartrit (OA), artrit grubu hastalıklardan bir tanesidir. Bazen, dejeneratif artrit ya da “wear and tear” yani, zamanla aşınma aritri olarak da adlandırılır. Bir ya da daha fazla eklemden kırıkdağın kaybı sonucu ortaya çıkar. Kırıkdağ, eklemi oluşturan kemiklerin arasında bir çeşit yastık görevi üstlenen bir proteindir. Kırıkdağ kaybı ile kemik uçları, birbirine sürterek aşınır ve uçlarda yeni kemik oluşumuna bağlı çıkıntılar meydana gelir. Bu da ağrı, eklemden sertlik ve şekil bozukluklarına yol açar. OA, sıklıkla yaşlanmayla birlikte ortaya çıkar. 55 yaştan sonra kadın cinsiyette daha siktir. Hastalığın sebepleri arasında birçok faktör sayılmaktadır. Bunlar, kilo fazlalığı, yaşlanma, eklem travması ve genetik nedenlerdir. Doktorlar, OA tedavisinde hastanın ihtiyaçlarını, yaşam biçimini ve sağlığına yönelik tedavileri kombine etmektedir. Bunun için dört hedef vardır: eklem fonksiyonunu ilerletmek, normal bir kiloya sahip olmak, ağrıyı kontrol etmek ve sağlıklı bir yaşam biçimine kavuşmak. Diğer yandan, hastalığın genetik yönleri ve bununla ilgili detaylar da bilim adamları tarafından araştırılmaktadır. A disintegrin-like and metalloprotease trombospondin tip 1 motif 5 (*ADAMTS5*) geni bu bağlamda incelenmekte olan önemli bir gendir. Bu genin düzenlenmesinde rolü olan proteinler de araştırılmaktadır. Bunlar arasında, tümör nekroz faktör α (TNF α) ve nükleer faktör κ B (NF κ B) proteinleri bulunmaktadır. Bu çalışmada da *ADAMTS5* geni üzerinde, TNF α ve NF κ B nin etkileri araştırılmıştır.

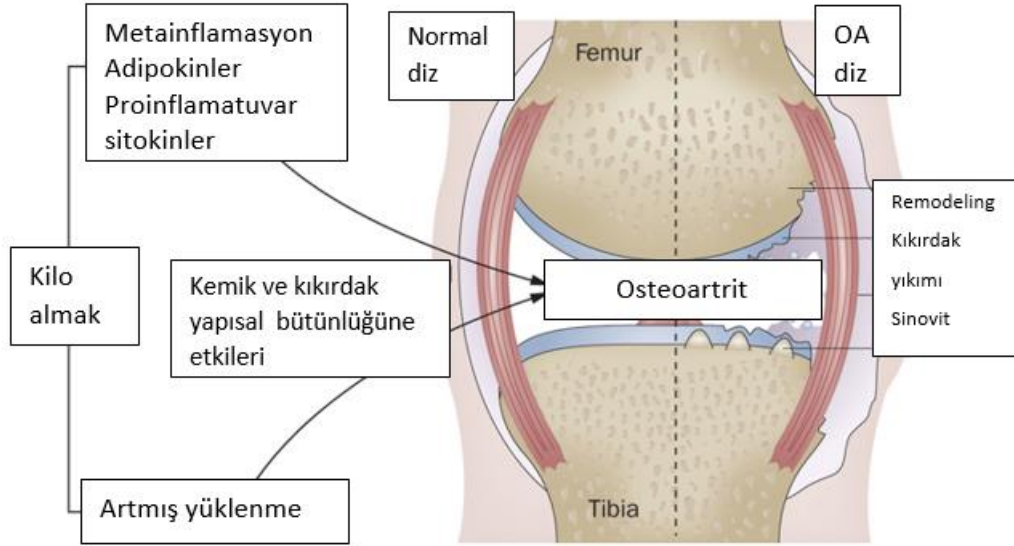
2. GENEL BİLGİLER

Osteoartrit patolojisi, eklem kıkırdağının yük binen kısımlarında hasarlanma, eklem çevresinde yeni kemik oluşumu ve sinovitis ile karakterize dejeneratif bir eklem hastalığıdır. OA, en yaygın eklem hastalığı olup, ortopedi kliniğine en sık başvuru nedenidir. Dünya Sağlık Örgütü'nün tahminlerine göre 65 yaş üstü erişkinlerin yaklaşık %25' inde bu hastalığa bağlı ağrı ve fonksiyon kaybı bulunmaktadır. (Bodur H 2011).

2. 1. Osteoartrit Epidemiyolojisi

OA, vücuttaki herhangi bir eklemi etkileyebilmekle birlikte en sık diz, kalça, el ve ayaktaki eklemleri tutar. Tutulan eklemdede, ağrı, şişlik, sertlik, fonksiyon değişikliği ve deformite bulgularına yol açmaktadır (Bodur H 2011). OA için, yaş, obezite, mekanik travma gibi birçok risk faktörü vardır (Kristjánsson ve Honsawek 2014). Ancak, tam olarak nedeni bilinmemektedir.

OA tedavisinde hastalığın semptomlarını gidermeye ve fonksiyonelliği korumaya yönelik modaliteler olmakla birlikte henüz hastalığı durdurmak veya süreci yavaşlatmak gibi bir küratif tedavi bulunmamaktadır (Walker 2010). Medikal tedavide ağrıyı gidermeye yönelik asetaminofen, non-steroid antiinflamatuvar ilaçlar ve opiyad analjezikler kullanılmaktadır (Li 2014). Hastalığın son evresine gelmiş ve medikal tedaviye dirençli hastalarda ise cerrahi tedavi uygulanmaktadır. Cerrahi tedavi içerisinde artroskopi, kıkırdak tamiri, mikrokırık oluşturarak kemik iliğinden kök hücre stimülasyonu, total eklem artroplastisi ve osteokondral graft tedavi seçenekleri bulunmaktadır (Makris 2014).



Şekil 2.1. Osteoartrit patogenezi ile ilgili şema. Eklem travması ile inflamasyonu başlatan sinovyum ve kondrosit kaynaklı sitokinler ve bunların tetiklediği proteolitik enzimlerce gerçekleşen kıkırdak yıkımı şematize edilmiştir (Anita EW 2013).

2.2. OA Patogenez

OA patolojisi, eklem kıkırdağının basınca maruz kalan kısımlarında hasarlanma, eklem çevresinde yeni kemik oluşumu ve sinovitis ile karakterizedir (Şekil 2.1). OA sinovitinde proinflamatuvar sitokinler yer almaktadır. Romatoid artritteki kadar yüksek düzeylere ulaşmasa da $TNF\alpha$ ve interlökin 1 (IL1), OA patogenezinde anahtar role sahip olup hem sinoviyal inflamasyona, hem de kondrosit ve sinoviyal fibroblastların aktivasyonuna yol açmaktadır (Bondeson ve ark 2010). Bu sitokinler, hem kendi üretimlerini stimüle etmektedir ve hem de kondrositleri, inflamatuvar sitokinlerin ve proteazların üretimi için uyarmaktadır (MARY ve ark 2007, Bondeson ve ark 2010). Lokal olarak üretilen sitokinler, eklemden inflamasyona ve kıkırdağı parçalayan enzimlerin üretiminin uyarılmasına yol açmaktadır. Bu enzimler, MMP1, MMP2, MMP3, MMP9 ve MMP13 gibi matriks metalloproteazlar (MMP) ve ADAMTS ailesinden ADAMTS4 ve ADAMTS5 gibi enzimlerdir. Normal eklem kıkırdağı homeostazisinde, metalloproteinazlar ve inhibitörleri arasında bir denge bulunmaktadır. Artritte, katabolizma lehine bir dengesizlik meydana gelir ve proteaz aktivitesi, inhibitörlerin kontrolünden çıkar (Dancevic ve McCulloch 2014).

ADAMTS4 ve ADAMTS5'in, in vitro ortamda insan kıkırdak dokusunda, agrekan yıkımını gerçekleştirdiği bilinmektedir. ADAMTS5, in vivo ortamda insan artrit sinovyumunda ve kıkırdağında yaygın olarak bulunur ve agrekanı parçalar (Song ve ark 2007, Dancevic ve McCulloch 2014). Tortorella ve ark (2001) yaptığı çalışmada, TNF α ve IL-1 ile stimüle edilmiş sığır kıkırdak dokusunda, agrekanın ADAMTS4 ve 5 enzimleri tarafından tanınan bölgelerinden kesilmiş yıkım ürünlerinin açığa çıktığını ve bu enzimleri inhibe eden spesifik inhibitörlerin uygulanmasının ardından yıkım ürünlerinin %90 oranında azaldığını göstermiştir.

TNF α ve IL1 in, osteoartrit patogenezinin merkezinde görülmesi, OA ile ilgili yapılan çalışmalarda bu sitokinlere karşı antisitokin terapisi geliştirmeyi gündeme getirmiştir (Ovist ve ark 2008, Bondeson ve ark 2010). Osteoartritli hastaların sinovyal sıvılarında ve eklem dokularında artmış katabolik enzim düzeyleriyle prostoglandinler, NO, IL1 β ve TNF α gibi inflamatuvar sitokinler arasındaki ilişki iyi bilinmektedir (MARY ve ark 2007). Kıkırdak yıkımından sorumlu enzimleri stimüle eden bu sitokinlerin üretim yeri ise sinovyal makrofajlar ve kondrositlerdir (Tetlow ve ark 1995). Anormal mekanik yüklenme, kondrositlerin, kıkırdak ekstraselüler matriksi remodelingi üzerine anabolik ve katabolik etkilerinin arasındaki dengenin bozulmasına yol açmaktadır (MARY ve ark 2007). Katabolik etkiye maruz kalan kıkırdakta, agrekanın ekstraselüler matriksten kaybı anahtar noktadır.

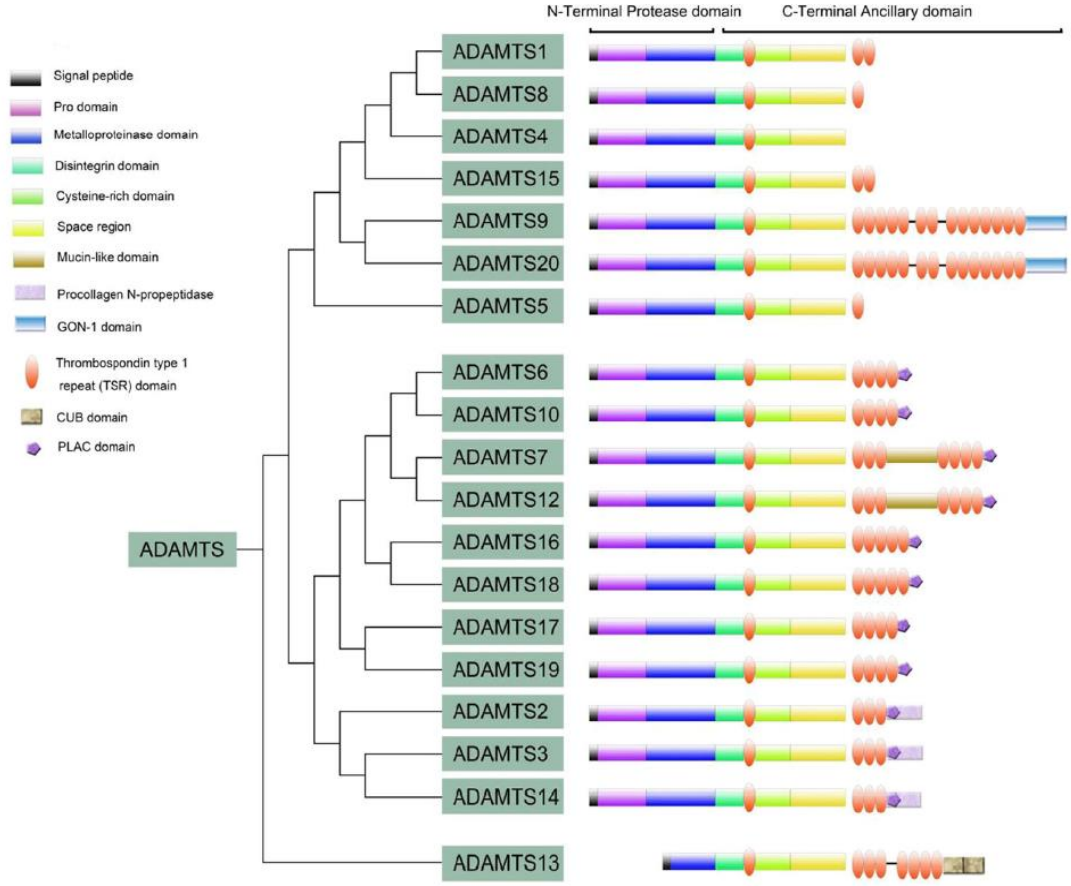
2.3. Agrekan

Kıkırdak ekstraselüler matriksinin en önemli bileşenleri, tipII kollajen ve agrekandır. Agrekan monomerleri, yaklaşık 2.5 milyon dalton olup, ortada 250-kD kor protein ve buna yan zincirler halinde bağlanmış kondroidin sülfat ve keratan sülfat glikozaminoglikanlarından oluşur. Agrekan monomerlerinin 10 ila 100 tanesi, hiyaluronik asit omurgası üzerine bağlanarak büyük agregatlar meydana getirir. Negatif yüklü bir molekül olması nedeniyle su moleküllerini çekerek kollajen ağını şişirir ve elastik, basınca dayanıklı bir dokuya dönüştürür. Osteoartritte, en erken

değişikliklerden biri, agrekanın, kıkırdak matriksinden ADAMTS agrekanazlarca parçalanmasına bağlı olarak kaybıdır (Mankin ve ark 1970).

2.4. ADAMTS Gen Ailesi

ADAMTS ismi, 19 üyeden oluşan bir proteolitik enzim ailesine verilmiştir. İlk keşfedilen, farelerde inflamasyon ve kanser tarafından indüklenen kaşeksi ile ilişkisi tespit edilen ADAMTS1 dir (Kuno ve ark 1997, Sun ve ark 2015). Bu süper aile, ekstraselüler matriks döngüsü ve degradasyonunda önemli role sahiptir. Ayrıca, bağ doku yapılanması, anjiogenez ve hücre migrasyonu gibi birçok biyolojik süreçte rol oynarlar (Sun ve ark 2015). Ailenin tümü, benzer özelliklere sahip bir protein yapısını paylaşır (Hurskainen ve ark 1999). Bu benzer yapıda, N-terminal uç, substrat spesifitesini belirleyen bölüm, endoplazmik retikulumdan salgılanmasını sağlayan sinyal peptidi ve proteaz domainini içerirken, C-terminal uçta, enzim lokalizasyonunu belirleyen “ancillary domain”, disintegrin domain, trombospandin tekrar bölgesi (TSR), sistein domain gibi yardımcı bölümler yer almaktadır (Apte 2009, Sun ve ark 2015). Ailenin yapısal olarak baz modeli ADAMTS4 enzimi olup, diğer üyeler, bu bazal yapının üzerine C-terminal uca farklı domainlerin eklenmesi ile oluşur (Clark ve ark 2000, Sun ve ark 2015). Ailede bulunan 19 üye, dört gruba ayrılmaktadır. Agrekanaz/hiyalektanaz grubu, ADAMTS1, 4, 5, 8, 9, 15 ve 20’yi içerir. “Orphan”/bilinmeyen grubu, ADAMTS6, 7, 10, 12, 16, 18, 17 ve 19’u içerir. Prokollajen N-propeptidaz grubu, ADAMTS2, 3 ve 14 ü içerir. Son olarak, “von Willebrand faktör” grubu, ADAMTS13 ü içerir. Agrekanaz alt grubundaki tüm enzimlerin, kıkırdak majör proteoglikanı olan agrekanı parçalayabildiği gösterilmiştir. Bu nedenle, bu enzimlere hiyalektanaz terimi getirilmiştir (Şekil 2.1) (Gao ve ark 2002 ,Sun ve ark 2015).



Şekil 2.2. ADAMTS ailesinin şematik görünümü. ADAMTS4 enzimi baz model olarak en basit yapıya sahiptir. Diğer enzimlerde bunun üzerine eklenmiş farklı domainler bulunmaktadır (Sun Y 2015).

2.5. ADAMTS 4 ve 5

ADAMTS4 (agrekaz-1) ve ADAMTS5 (agrekaz-2), agrekanı daha yüksek spesifik aktivite ile parçalamaktadır. Osteoartritli hastaların kıkırdaklarında, özellikle de agrekan kaybının gerçekleştiği sahalarda eksprese oldukları gösterilmiştir. Bu nedenle de OA patogenezinde en iddialı adaylar olmuşlardır (Tortorella ve ark 2002, Song ve ark 2007). ADAMTS4 ve 5, agrekanı benzer spesifik aktivite ile glutamik asit aminoasidinin farklı pozisyonlarından (Glu³⁷³, Glu¹⁵⁴⁵, Glu¹⁷¹⁴, Glu¹⁸¹⁹, Glu¹⁹¹⁹) parçalarlar ve sinovyal sıvı ve kıkırdakta saptanan yıkım ürünlerini ortaya çıkarırlar (Tortorella ve ark 2000, Song ve ark 2007). Son yıllarda yapılan çalışmalar göstermiştir ki, *ADAMTS5* geninin katalitik domainini içermeyen fare dokusunda, katabolik sitokinler ile indüklenen kıkırdak, yıkıma karşı korunmuştur (Glasson ve ark 2005). Ayrıca, farelerde yapılan in situ OA ve inflamatuvar artrit modellerinde,

agrekan ve kıkırdak korunmuştur. Buna karşılık, *ADAMTS4* katalitik domaini içermeyen fareler, sitokinlerce indüklenen agrekan yıkımına normal duyarlılık göstermiştir (Glasson ve ark 2004, Song ve ark 2007). *ADAMTS* ailesinin diğer bir üyesi olan ve kıkırdakta eksprese olan, zayıf agrekanaz aktivitesi gösteren *ADAMTS1* geninin ortadan kaldırıldığı, in vivo ve in vitro deneylerde agrekanın korunmadığı görülmüştür. Bu sonuçlar göstermektedir ki, *ADAMTS5*, kıkırdak yıkımında primer agrekanazdır (Little ve ark 2005, Song ve ark 2007). Song ve ark (2007) nın yaptıkları çalışmada, *ADAMTS4* ve/veya *ADAMTS5* siRNA sı verilen OA dokusu ile kontrol grubu arasında her bir genin inhibisyonu, agrekan kaybında %60 lık bir azalma sağlamıştır. Birlikte inhibisyonları ise daha güçlü bir koruma sağlamıştır. Chiusaroli ve ark (2013) nın yaptığı çalışmada, deneysel fare OA modelinde eklem içine enjekte edilen anti-*ADAMTS5* antikoru ile kıkırdak dokusunda yapılan histopatolojik skorlamada kontrol grubuna göre iyileşme görülmüştür.

2.6. *ADAMTS5* Gen Regülasyonu

Chen ve ark (2014) yaptıkları çalışmada, intervertebral disk ameliyatı geçiren hastalardan elde edilen kıkırdak uç plağı dokularını, dejeneratif değişiklikler olan ve olmayanlar şeklinde iki gruba ayırmış ve dejeneratif değişiklik olan grupta, histopatolojik düzeydeki ve moleküler düzeydeki değişiklikleri analiz etmiştir. Anlamlı fark bulunan iki grup arasında *ADAMTS5* ve *TNF α* genlerinin ekspresyonlarını, messenger ribonükleik asit (mRNA) ve protein düzeyinde incelemiştir. Sonuçta, hem *ADAMTS5*, hem de *TNF α* genlerinin ekspresyonlarının dejeneratif değişiklikler olan grupta, kontrole göre arttığını, ve iki gen arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişkinin olduğunu ortaya koymuşlardır. Aynı çalışmada araştırmacılar, sığır kıkırdak uç plağı kondrositlerinden hücre kültürü yaparak hücrelere *TNF α* uygulamış ve *TNF α* uygulanmayan kontrol grubuna göre *ADAMTS4*, *ADAMTS5* genleri ve *NF κ B* yolağı proteinlerini mRNA ve protein düzeyinde analiz etmişlerdir. Sonuçta, *ADAMTS5* ile *NF κ B* yolağı genlerinin *TNF α* uyarısına yanıt olarak arttığını, *ADAMTS4* ün ise değişmediğini göstermiştir. Bu sonuca göre de kıkırdak uç plağında *TNF α* tarafından aktive edilen *NF κ B* nin *ADAMTS5* geni regülasyonunda olası bir mekanizma olabileceği yorumunu yapmıştır.

ADAMTS5 geninin TNF α tarafından stimüle edildiğine dair çalışmaların yanında bazı çalışmalarda, *ADAMTS4* ün inflamatuvar sitokinlerle stimüle edildiği fakat *ADAMTS5* in konstitüsyonel olarak eksprese olduğu ve sitokin uyarısından etkilenmediği bildirilmiştir (Koshy ve ark 2002, Verma P ve Dalal K 2011).

Tetsunaga ve ark (2011) yaptıkları çalışmada, kondrosarkom hücre hattında mekanik stres uygulaması sonrası *ADAMTS4*, *5*, *9*, *MMP13* ve *Runt-related transcription factor 2 (RUNX2)* genlerinin ekspresyonunun arttığını göstermiştir. Daha sonra, *RUNX2* geninin overekspresyonu sonrası, *ADAMTS5* ve *MMP13* genlerinde upregülasyon olduğunu, *RUNX2*'nin siRNA ile inhibe edilmesinin bu genlerde mekanik stres sonucu ortaya çıkan artışı önlediğini göstermiştir.

Tsushima ve ark (2011) yaptıkları çalışmada, CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP β) transkripsiyon faktörünün (TF) *ADAMTS5* ve *MMP3* genleri üzerine regülatör etkisini araştıran bir deney sistemi hazırlamıştır. Sinoviyosit hücrelerine, IL1 β uygulanması sonucu *ADAMTS5* ve *MMP13* genlerinin aktive olduğunu göstermiştir. Sinoviyosit hücre hattında bu transkripsiyon faktörünü (TF) overeksprese ederek ilgili genlerin ekspresyonlarının arttığını göstermiştir. Kromatin immunopresipitasyon yöntemiyle de C/EBP β nın her iki genin promoterine bağlandığını göstermiştir.

Kobayashi ve ark (2013) yaptıkları çalışmada, *ADAMTS5* geni promoter bölgesinin TF'leri tarafından regülasyonu ile ilgili deneyler yapmıştır. TF bağlanma motiflerini ortaya koyan bilgisayar temelli programla yaptıkları analizde, promoter üzerinde Hypoxia inducible factor1 A (HIF1A), CEBPA, RUNX, NF κ B, Signal transducer and activator of transcription (STAT) gibi TF'lerinin bağlanma bölgesi olabileceğini görmüş ve bu faktörlerin ekspresyon vektörleriyle yaptığı lusiferaz deneylerinde promoter aktivitesini en fazla NF κ B ailesinden v-rel avian reticuloendotheliosis viral oncogene homolog A (RelA) proteininin artırdığını ortaya koymuştur. Daha sonra, NF κ B bağlanma bölgelerinin DNA'sı üzerinde sırayla bir, iki

ve üçünü de içeren delesyon oluşturup bunlardan plazmid konstraktları ile yaptıkları lusiferaz deneylerinde, en çok bağlanma bölgesi içeren promoter konstraktının en yüksek aktivite gösterdiğini ve NFκB bağlanma bölgesi sayısı ile aktivite arasında doğru orantı olduğunu göstermiştir.

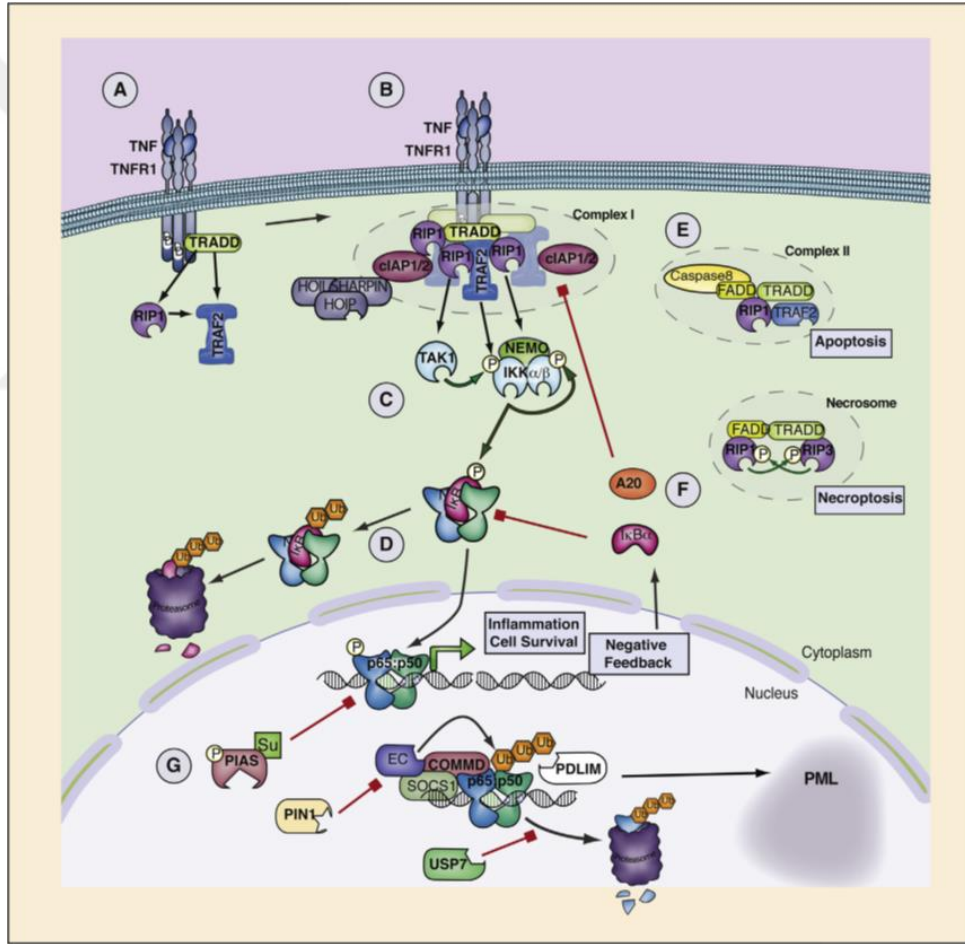
2.7. TNFα – NFκB Sinyal Yolağı

TNFα, 40 yıl önce, endotoksinlerce indüklenen ve tümör hücrelerinin ölümüne neden olan bir serum faktörü olarak keşfedilmiştir ve bu nedenle “tümör nekroz faktör” adı verilmiştir (Carswell ve ark 1975, Verhelst ve ark 2011). Keşfinden bir dekad sonra, endotoksinle muamele edilmiş makrofajlardan salgılanan bu molekülün kaşeksiye neden olduğu görülmüş ve kaşektin adı verilmiştir (Beutler ve ark 1985). Sepsisin başrolündeki medyatör olduğu anlaşılan bu sitokin, anti-TNF monoklonal antikolarıyla septik şokun tedavisinde hedef molekül olarak ele alınmıştır (Trajey ve ark 1987, Verhelst ve ark 2011). Buna paralel olarak, romatoid artrit hastalığının patofizyolojisinde anahtar role sahip olduğu belirlenmiş ve anti-TNF monoklonal antikoların, romatoid artrit fare modellerinde (Williams ve ark 1990) ve insanlarda (Elliott ve ark 1994) hastalık semptomlarından koruyucu özellik sergilediği bulunmuştur.

TNF, birçok fizyolojik ve patolojik olayda rol oynamaktadır. Tümör hücre nekrozu, apoptoz, embriyo gelişimi, uyku-uyanıklık döngüsü, lenf nodlarında germinal merkez formasyonu, bakteriyel ve viral enfeksiyonlarda konak savunması gibi biyolojik olaylar bunlardan bazılarıdır. Bunlardan başka TNF, akut ve kronik sistemik inflamatuvar reaksiyonlarda anahtar medyatördür. TNF, chron ve ülseratif kolit gibi inflamatuvar bağırsak hastalıkları, romatoid artrit, multiple skleroz, sistemik lupus eritamatozus ve sistemik skleroz gibi otoimmün hastalıklarda santral role sahiptir (Chu W 2013).

TNF, aktivitesini reseptörleri üzerinden göstermektedir. TNF reseptörleri, TNF receptor 1 (TNF-RI) ve TNF receptor 2 (TNF-RII) olarak iki çeşittir. Bu reseptörler,

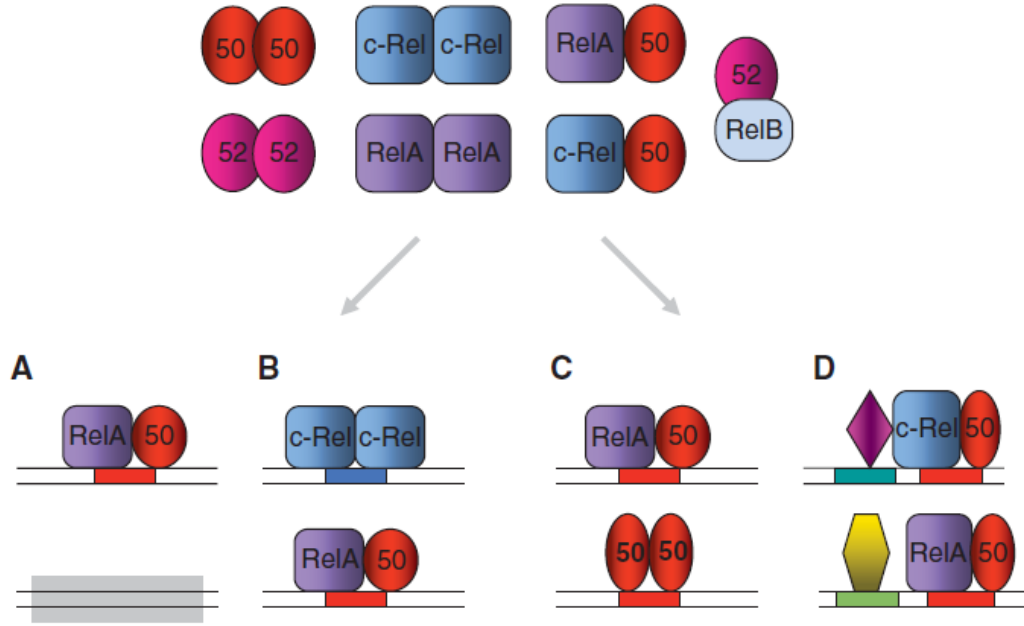
uyarılmamış lenfosit hücresi ve eritrositler dışında neredeyse tüm hücre çeşitlerinde bulunmaktadır (Vandenabeele ve ark 1995, Verhelst ve ark 2011). Her iki reseptör de benzer şekilde inhibitor kB kinase (IKK) ları ve mitogen-activated protein kinase (MAPK) ları aktive eder ve bu kinazlar da sitokinler, kemokinler ve inflamatuvar enzimler gibi efektör moleküllerin üretimini kontrol eden NFκB ve activator protein (AP1) gibi TF lerini aktive eder. Ayrıca etkisinin devam ettirilmesi için kendi ekspresyonunu da uyarır. TNFα'nın inflamatuvar etkilerinin çoğuna aracılık eden molekül, TNF-RI tarafından indüklenen NFκB sinyal yolağıdır (Şekil 2.3) (Verhelst ve ark 2011).



Şekil 2.3. TNFα ve NFκB sinyal yolağının şematik gösterimi. TNFα'nın reseptörüne (TNFR1) bağlanması sonrası IKK kompleksi aktive olur ve NFκB ile bağlı bulunan IκB moleküllerini degrade eder. Serbest kalan NFκB dimerleri, nükleusa geçerek DNA ya bağlanır (Haydena MS 2014).

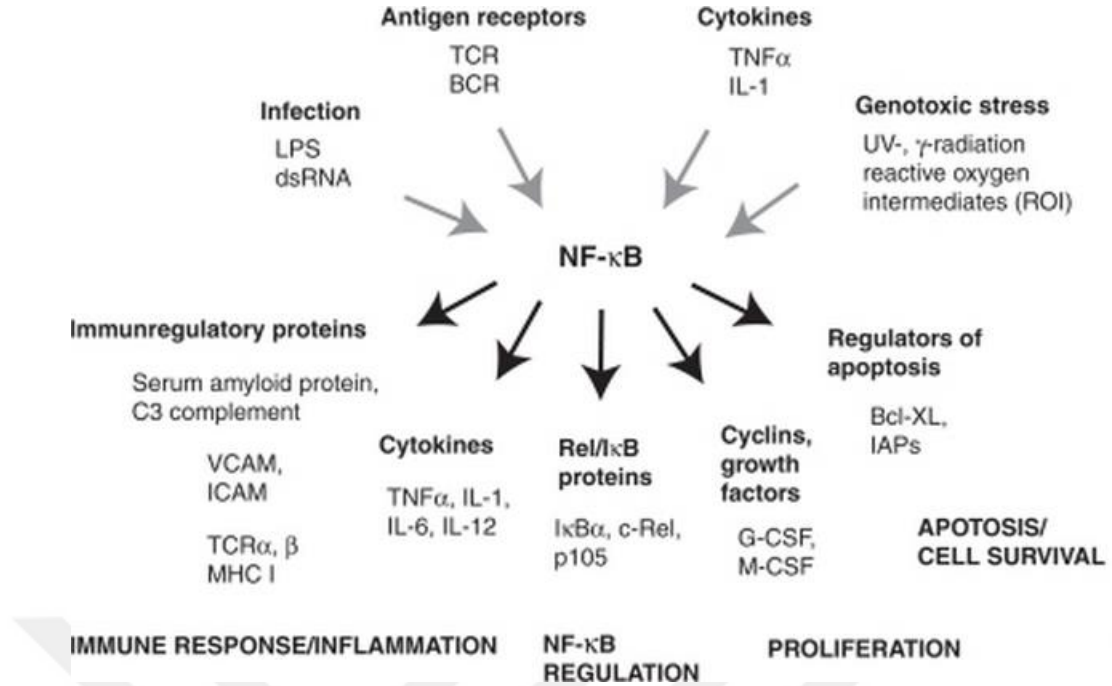
NFκB, immüoglobulin κ hafif zincir geninin intronik enhanceri içinde DNA'yı, sekans-spesifik tarzda tanıyan bir motif olarak ilk kez 1986'da tanımlanmıştır

(Sen ve Baltimore 1986, Sen ve ark 2010). Pre- B hücre hattının stimülasyonu sonrasında NFκB'nin DNA'ya bağlandığı ve hücre stimülasyonuna cevap olarak DNA'nın transkripsiyonunu etkilediği görülmüş ve ilk TF örneğini teşkil etmiştir. Daha sonraki çalışmalar gösterdi ki NFκB aktivitesi, birçok hücre tipinde indüklenmektedir ve çeşitli uyaranlar sonucu, hücre canlılığı, farklılaşması, aktivasyonu gibi birçok farklı süreçte baş rolü oynamaktadır (Hayden ve Ghosh 2004, Sen ve ark 2010). Bu nedenle, artrit, immun yetmezlik, otoimmünite ve kanser gibi birçok hastalık patogeneğinde yer alması şaşırtıcı değildir (Courtois ve Gilmore 2006, Oeckinghaus 2009). NFκB, uyarılmamış ya da istirahatte olan hücrelerde, stoplazmada, inhibitör molekülü olan IκB proteinleriyle kompleks halinde bulunmaktadır. Hücrenin uyarılmasına yanıt olarak, IκB molekülleri, fosforlanır, ubiquitinizasyona uğrar ve yıkılır. Serbest kalan NFκB molekülleri, nukleusa geçer ve promoter ve enhancer üzerindeki tanıma bölgelerine bağlanarak gen transkripsiyonunu düzenler. NFκB ailesi içerisinde beş farklı üye bulunmaktadır. Bunlar, RelA (P65), c-Rel, RelB, p50 (NFκB) ve p52 (NFκB) dir. Bu proteinler, DNA'ya farklı heterodimerler halinde bağlanabilirken sadece RelB, homodimerler halinde bağlanabilir. Bu şekilde heterodimerler yaparak, değişik tanıma bölgeleri ve transaktivasyon mekanizmaları meydana getirirler ve çok çeşitli olan hedef genlerini regüle etme yetisine sahip olurlar (Sen ve ark 2010). Ancak, transaktivasyon domaini sadece p65, c-Rel ve RelB proteinlerinde bulunduğu için bu proteinleri içermeyen heterodimerler ya da homodimerler transkripsiyonel olarak aktif değildir (Şekil 2.4). Örneğin p50-p50 ya da p50-p52 gibi dimerler NFκB bağımlı transkripsiyonu baskırlar. Bunun nedeninin, κB bağlanma bölgelerine bu dimerlerin bağlanarak, yarışmalı olarak aktif dimerlerin etkisini azaltması olduğu düşünülmektedir (Oeckinghaus 2009). Yine, inhibitör molekülü olan IκB ailesinin de farklı alt üyeleri bulunur ki bu da çok sayıdaki hedef genin düzenlenmesinde gen selektivitesine katkı sağlar (Hayden ve Ghosh 2004, Sen ve ark 2010). P105 ve p100 proteinleri p50 ve p52 proteinlerinin prekürsörüdür ve proteolitik işlem sonrası sırasıyla p50 ve p52 ye dönüşürler. Transkripsiyonel olarak aktif olan NFκB moleküllerinin nukleer translokasyonunu engellerler. Bu nedenle IκB molekülleri ile özdeş kabul edilmektedirler.



Şekil 2.4. NFκB homo ve heterodimerleri ve beraberinde DNA ya bağlanan ko-regülatör proteinler (Sen R, 2010).

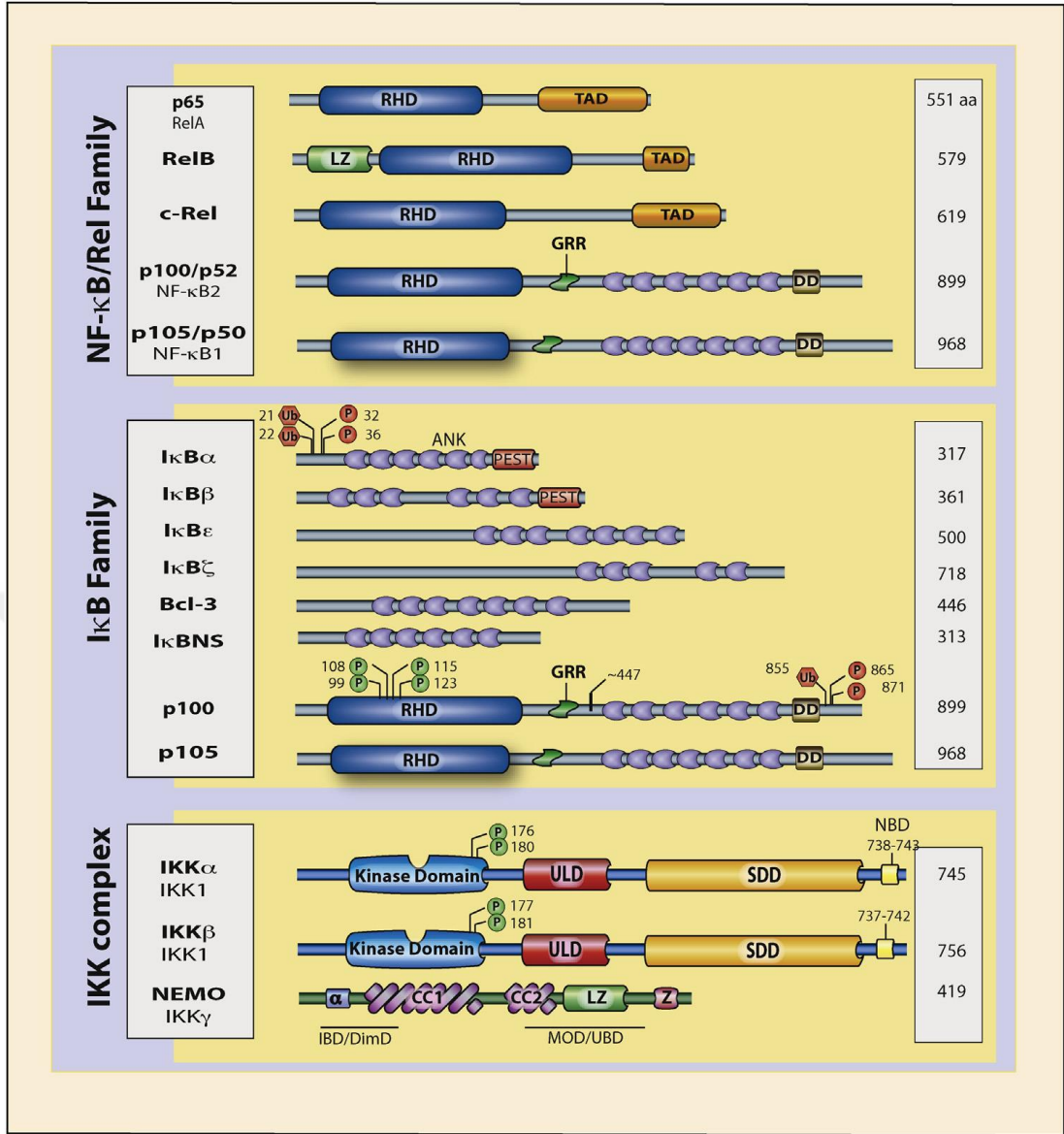
Bir hücrenin gelişim aşamaları da daha sonra hangi genlerin aktivasyona aday olacağını belirlemektedir. Bu seçim, kromatin yapısının farklı organizasyonu ve dolayısıyla diğer TF'lerinin ve NFκB ile birlikte çalışan düzenleyici moleküllerin ekspresyonu ile ilgilidir. Yardımcı protein (ko-regülatör) olmadan NFκB molekülleri DNA üzerinde etki gösterememektedir. Bu proteinleri kodlayan genlerin aktif olarak eksprese olmadığı hücre tiplerinde NFκB'ye yanıt alınmamaktadır (Sen ve ark 2010). Çok çeşitli uyaranlar NFκB aktivasyonuna yol açabilir. Bakteriyel ve viral enfeksiyonlar, inflamatuvar sitokinler, antijen-reseptör birleşmesi, fiziksel uyarı (UV ya da radyasyon), fizyolojik (iskemi ve hiperozmotik şok) ya da oksidatif stres bunlardan bazılarıdır (Şekil 2.5 ve Şekil 2.6) (Hayden ve ark 2006, Oeckinghaus ve ark 2009).



Şekil 2.5. NFκB regülasyonu ile ilgili şema. TNFα gibi sitokinler, fiziksel travma, enfeksiyon gibi çeşitli etkenler NFκB ekspresyonunu uyarır. Artan NFκB, çok çeşitli hedef genlerinin regülasyonunu sağlar. Ayrıca kendini uyarıcı moleküllerin de (TNFα, IL-1 gibi) regülasyonunu sağlar. Yine, kendi regülatör proteinleri olan IκB ailesini de uyararak negatif feed back ile kendi regülasyonunu sağlar (Oeckinghaus 2009).

NFκB aktivasyonunun uygun biçimde sonlandırılması son derece önemlidir, çünkü artmış NFκB yanıtı, inflamasyon ve onkogeneze ilişkilidir (Baker ve ark 2011, Hayden ve ark 2014). NFκB, kendi regülatörlerini uyararak oto-regülasyonunu sağlar. NFκB'nin düzenlenmesindeki primer negatif feed-back mekanizması, IκB transkripsiyonunun indüklenmesidir. NFκB'nin uyarılmasının ardından IκBα, hızla uyarılır ve NFκB etkisinin ortadan kaldırılmasında önemlidir (Brown ve ark 1993, Oeckinghaus ve ark 2009, Hayden ve ark 2014).

TNFα ve *IL1β* promotorleri üzerinde NFκB bağlanma bölgeleri olduğu bilinmektedir (Bondeson ve ark 2010). Bondeson ve ark (1999) yaptıkları çalışmada IκBα transkripsiyonu yapılan makrofajlarda, spontan TNFα üretiminin %75 baskılandığını bulmuştur. Yine, Shakhov ve ark (1990) nın yaptıkları çalışmada lipopolisakkarid tarafından uyarılan makrofaj hücrelerinde *TNFα*'nın transkripsiyonel aktivasyonunda, NFκB'nin santral role sahip olduğunu göstermiştir.



Şekil 2.6. NFκB, IκB ve IKK proteinlerinin şematik sunumu. Tüm NFκB moleküllerinde ortak olarak Rel homoloji domaini bulunmaktadır. Transaktivasyon domaini ise yalnızca cRel, p65 ve RelB proteinlerinde bulunmaktadır. P100 ve p105, fonksiyon olarak inhibitör özellik sergilediği için IκB ailesine dahil edilmektedir. CC, coiled-coiled domain; GRR, glisin rich domain; IBD/DimD, IKK binding domain/dimerizasyon domain; LZ, lösün zipper domain; MOD/UBD, minimal oligomerizasyon domain/ ubikitin binding domain; NBD, NEMO binding domain; RHD, rel homoloji domain; SDD, scaffolding ve dimerizasyon domain; TAD, transaktivasyon domain; ULD, ubikitin like domain; Z, zinc finger domain (Haydena MS).

2.8. Projenin Amacı

Son yıllarda yapılan çalışmalarda, *ADAMTS5* geninin osteoartrit hastalığı patogenezindeki rolü ortaya konmuştur. Artmış ekspresyonunun hastalık oluşum mekanizmasında sorumlu olduğu ve tedavide bu genin regülasyonuna odaklanması gerektiği literatürde belirtilmiştir. Bu nedenle, mevcut çalışmada *ADAMTS5* geninin regülasyonunu araştırılması planlandı. Daha önceki çalışmalarda, TNF α ve NF κ B'nin, *ADAMTS5* ekspresyonu üzerine etkilerini araştıran çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmalardan çıkan sonuçlar arasında çelişkiler mevcut olup henüz net bir şekilde *ADAMTS5* regülasyonu aydınlatılamamıştır. Ayrıca, literatürde, OUMS-27 hücrelerinde, TNF α ve NF κ B ekseninde promoter bölgesinin regülasyonunu araştıran bir çalışma mevcut değildir. Chen ve ark (2014) nın yaptığı çalışmada, benzer şekilde, hücrelere TNF α uygulamasına yanıt olarak *ADAMTS5* ve *NF κ B* gen artışı gösterilmiş olmakla birlikte bu çalışmada kullanılan hücrelerin insan kondrositleri değil, sığır kondrositleri olması çalışmanın insan OA modeli olmasında kısıtlılığa neden olmuştur. Bu nedenle bizim çalışmamızda, insan kökenli kondrosit hücreleri kullanılarak daha iyi bir OA modeli seçilmiştir.

Mevcut çalışmamızda, OUMS-27 kondrosarkom hücre hattında, TNF α 'nın *ADAMTS5* geninin regülasyonuna katkısı ve NF κ B'nin bu regülasyondaki rolü incelendi. Bunun için, öncelikle OUMS-27 hücre hattına farklı dozlarda rekombinant TNF α uygulandı. Uygulama sonrası hücrelerden RNA ve protein izolasyonu yapıldı. *ADAMTS4*, *ADAMTS5* ve *I κ B α* genlerinin mRNA ve protein analizi yapıldı. Etkili bulunan doz kullanılarak *ADAMTS5* mRNA'sı ve proteininin farklı sürelerdeki değişimi araştırıldı. Çalışmamızın ikinci kısmında, *ADAMTS5* geni promoter bölgesi, TF bağlanma bölgeleri açısından analiz edildi. NF κ B için tahmini bağlanma bölgesi içeren farklı uzunluklarda konstraktlar oluşturuldu. Bu konstraktlar, pHRE-Luc plazmidine klonlandı. Ekspresyon plazmid konstraktları kullanılarak *ADAMTS5* geni promoter fonksiyon analizi gerçekleştirildi.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

Tezdeki kimyasallar ve cihazlar ile ilgili kaynak bilgisi ek-1 ve 2’de verilmiştir.

3.1. Hücre Kültürü ve Stoklama

Çalışmada OUMS-27 hücre hattı kullanıldı. Kontrol hücre hattı olarak HEK-293T kullanıldı. Her iki hücre ATCC den (http://www.lgcstandards-atcc.org/?geo_country=tr) temin edildi. OUMS-27 hücre hattının özellikleri; insan kemik dokusu kökenli, sol humerus proksimal yerleşimli grade III kondrosarkoma dokusundan elde edilmiştir. İmmortalize edilmiş ve *p53* geni mutant bir hücre popülasyonudur. Hücre morfolojisi, elonge poligonal şekillidir. Yaşam ortamı, %5 CO₂’li, 37°C olup tutunarak çoğalır.

HEK-293-T hücre hattının özellikleri ise; insan fetüsü böbrek dokusundan elde edilmiştir. Epitel kökenli, simian virus 40 (SV40) large T antijen ekprese eden immortalize edilmiş bir hücre popülasyonudur. Yaşam ortamı, %5 CO₂’li, 37°C olup tutunarak çoğalır.

Hücre kültürü çalışmalarında her çalışma öncesi, laminar flow kabini, 30dk süreyle UV ışığı altında sterilize edildi. Kabin ve pipetler, çalışma öncesi, %70 lik etanolle temizlendi. Hücre hattı olarak insan kondrosit kökenli OUMS-27 hücre hattı seçildi. Kontrol hücre hattı olarak insan embriyonik böbrek dokusu kökenli HEK-293T hücre hattı seçildi. Bu hücre hattı, hem transfeksiyonu kolay ve iyi optimize olması hem de hedef genimiz olan ADAMTS5 geni ekspresyonu için literatürde daha önce araştırılmamış bir hücre hattı olması nedeniyle tercih edildi. Sıvı azot tankında bulunan OUMS-27 ve HEK-293T hücre hattı stoktan çıkarılarak hızla 37°C lik su banyosunda eritildi. On dört ml’lik falkon tüpüne 10 ml medyum ilave edildi. Üzerine, erimiş olan hücre stok solüsyonu ilave edilerek 1200 RPM hızda 3’ santrifüj edildi. Süpernatant kısmı aspiratörle uzaklaştırıldı. Hücre pelleti, 3 ml medyum ile resüspanse edildi. Önceden 10 ml medyum ilave edilmiş 75 cm²’lik flaska medium+hücre süspansiyonu pipet yardımıyla ekildi. Mikroskopta bakılarak 37 °C’ lik etüve kaldırıldı. % 80 doluluk oranına ulaşan hücreler, pasajlanarak alt kültüre devam ettirildi. 75 cm²’lik

flastaki medyum, aspiratörle aspire edildi. On ml Phosphate buffered saline (1XPBS) ile yıkandı. Beş ml 1X Tripsin-EDTA damla damla eklendi. İki ila beş dakika arasında hücreler kalkıncaya kadar 37°C' lik etüvde inkübe edildi. Üç ml medyum eklenerek tripsin aktivitesi durduruldu. Pipetaj yapılarak tüm sıvı alındı ve falkon tüpe aktarıldı ve 1200 rpm'de 3 dk 37 °C'de santrifüj yapıldı. Süpernatant atıldı. Pellet üzerine 150 µl medyum eklendi ve tüpün tabanı yere sürtülerek hücre pelletinin dağılması sağlandı. Hücrelerin üzerine 3 ml medyum eklendi ve hücreler homojen hale gelene kadar pastör pipeti ile yavaşça çözdürüldü. 175 cm²'lik flaska 20 ml medium eklendi. Üzerine hücre süspansiyonu eklendi ve hafifçe sallanarak karıştırıldı. 37°C' de %5 CO₂'lik etüve konuldu. Hücre stok solüsyonu hazırlanışı: Fetal bovin serum (FBS) içerisine %10 u kadar dimethyl sulfoxide (DMSO) solüsyonu ilave edildi. Daha önce anlatıldığı gibi 75cm² flastan, tripsinle kaldırılan hücreler, santrifüj edilerek çöktürüldü. Üzerine 4ml hücre stok solüsyonu ilave edildi. Pipetaj yapıldıktan sonra kriyotüplere 1'er ml bölündü. Önce -20°C de 30' bekletildi. Sonra da -80°C ye kaldırıldı.

Hücre kültürü medyum bileşenleri şu şekildedir:

50 ml FBS (Wisent- 080110 veya HY- CH30160.02)

5 ml penisilin /streptomysin (HY-SV30010)

4 ml L-Glutamin (Wisent-609-065-ZL)

0,05 ml Plasmocin (ant-mpt (Invivogen) olacak şekilde medyum hazırlandı.

Medyum +4 °C derecede muhafaza edildi.

3.2. Hücre Sayımı

Yukarıda belirtildiği gibi flastan kaldırılan hücreler medyumda çözdürülüp, homojenize edildi. On µl Tripan Blue, 10 µl hücre örneği ile karıştırıldı. Bio-Rad's New TC10™ Automated Cell Counter cihazının slaytına bu karışımdan 10 µl aktarılarak ölçüm yapıldı. Konsantrasyon (hücre/ml)=canlı hücre sayısı ve hücrelerin canlılık oranı belirlendi. Ekim yapılacak pleyte uygun hesap yapıp, ekim gerçekleştirildi. Örnek: Hücre sayısı 3x10⁶/ml çıkan bir hücre süspansiyonundan 12 lik well e 2x10⁵ hücre/well ekim yapılacaksa; ölü hacim de hesaba katılarak,

- gerekli hücre miktarı=12.5 x (2x10⁵)= 2.5x10⁶ 1 ml de 3x10⁶/ml

konsantrasyonda hücre bulunduğuna göre almamız gereken hücre miktarı=

1ml de

3x10⁶/ml

X ml de

2.5x10⁶

X = 0.8 ml olur.

Hücre-medyum süspansiyonundan 0.8 ml alındı. Her bir well'e 1 ml medium eklenmesi gerektiği için, ölü hacimle birlikte, $12.5 \times 1\text{ml} = 12.5\text{ ml}$ medyum gerekli. Hücre süspansiyonundan 0.8 ml alacağımız için bunu total hacimden çıkarıp kalan miktar kadar ($12.5 - 0.8 = 11.7\text{ ml}$) medyum alınarak 14' ml lik falkona koyuldu. Üzerine hücre süspansiyonundan 0.8 ml ilave edildi. Pipetajla ve alt üst edilerek homojenize edildikten sonra well lere 1'er ml dağıtıldı.

3.3. Hücrelere TNF α Uygulanması

Well'lere uygun sayıda ekilen hücreler tutunduktan sonra (24 saat) medyum aspire edildi. Uygun konsantrasyonda TNF α eklenerek hazırlanan yeni medyumdan well lere eklendi.

3.4. Gen Ekspresyon Analizi

Hedef genlerin ekspresyonu mRNA seviyesinde kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu (qPZR) ile, elde edilen bulguların confirmasyonu için de protein seviyesinde western blot tekniği ile analiz edildi.

3.4.1. Real Time qPZR Analizi

3.4.1.1. Gradyent PZR ve Primerlerin Hazırlanışı

Real time analizi için primerler, NCBI'nın online primer dizayn programı kullanılarak tasarlandı (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Dizayn esnasında, mRNA'ya spesifik primer elde edebilmek için exon-exon bileşkelerine denk gelecek şekilde dizayn yapıldı. Primerlerin hazırlanmasında, liyofilize durumdaki primerlere kullanma talimatında belirtilen miktarda 1XTE (Tris-EDTA) eklenerek 100 pmol/ml'lik stok çözeltiler hazırlandı. PZR işleminde kullanılmak üzere stoktan 10 μl ye dilüe edildi.

Kullanılan primer sekansları ve PZR ürünlerinin uzunlukları tablo 3.1 ve 3.2'de tanımlanmaktadır:

Tablo 3. 1. Hedef genlerin ekspresyon analizi için yapılan real time PZR’de kullanılan primer listesi

Primer Adı	Forward Primer Dizisi (5'→3)	Reverse Primer Dizisi (5'→3)	PCR ürün uzunluğu (bp)	Tm °C
Beta aktin	TTCCTGGGCAT GGAGTCCT	AGGAGGAGCAATGA TCTTGATC	204	56- 60
ADAMTS5	ACTTTCCTTTG GCACACCCA	ACGTCACTGACCACT GTTGG	230	56
ADAMTS4	AGGCACTGGG CTACTACTAT	GGGATAGTGACCAC ATTGTT	241	58.7
NFKBIA	AAGTGATCCG CCAGGTGAAG	CTCACAGGCAAGGT GTAGGG	185	56
TNF α	GCTGCACTTTG GAGTGATCG	GGGTTTGCTACAACA TGGGC	138	56

Tablo 3.2. ADAMTS5 geni promoter konstraktlarının oluşturulması için kullanılan primer listesi

Primer Adı	Forward Primer Dizisi (5'→3)	Tm °C
Xho1 NFkb 1 fwd	ggcgctcga GGGCATGGAGGGAGCTCTTAC	60
Xho1 NFkb 2 fwd	ggcgctcgag AGGCCTATGGCGATAAGTGG	60
Xho1 NFkb 3 fwd	ggcgctcga GGCCGGGAGAAGTTAGTCACC	60
Xho1 NFkb 4 fwd	ggcgctcgag GTCCTAAGGCCCCAGTG	60
Spe 1 NFkb 1 rev	ggcgactagt CCACTTATCGCCATAGGCCT	60
Spe 1 NFkb 2 rev	ggcgactagt GGTGACTAACTTCTCCCGGC	60
Spe 1 NFkb 3 rev	ggcgactagt CCTCATCTCCTGAACGGGTG	60
Spe 1 NFkb 4 rev	ggcgactagt AGCGGCATGCCATCCTGC	60

Koyu renkle yazılan nükleotidler restriksiyon enzim tanıma bölgeleridir.

Kantitatif Real Time PZR çalışmasına başlamadan önce ekspresyon çalışması yapılacak tüm genlere ait primerler için Gradyent PZR çalışması yapıldı. Gradyent PZR çalışması için OUMS-27 hücre hatlarından elde edilmiş complementary deoksiribonükleik asit (cDNA) kullanıldı. PZR işlemi Tablo 3.3’de gösterildiği şekilde gerçekleştirildi.

Tablo 3.3. Gradyent PZR çalışması için gerekli reaktifler ve miktarları

Reaktif	Miktar
(NH ₄)SO ₂ buffer	2.5 µl
MgCl ₂	2.5 µl
dNTP	0.5 µl
10 pmol Forward Primer	0.5 µl
10 pmol Reverse Primer	0.5 µl
Taq DNA Polimeraz	0.2 µl
dH ₂ O	16.3 µl
cDNA	2 µl

Yukarıdaki bileşenler son hacim 25 µl olacak şekilde karıştırıldı. Her bir gen için 57-62°C arasındaki sıcaklıklarda gradient PCR çalışması kuruldu. BIO-RAD T100 model PZR cihazında Tablo 3.4’de belirtilen koşullarda amplifikasyon gerçekleştirildi.

Tablo 3.4. Gradient PZR çalışması uygulanan amplifikasyon koşulları

Reaksiyon	Sıcaklık	Süre	Döngü
Denatürasyon	95 °C	5 dakika	
Denatürasyon	95°C	30 saniye	40 döngü
Primer bağlanma	57-63°C	30 saniye	
Uzama	72°C	1 dakika	
Son uzama	72°C	5 dakika	

3.4.1.2. RNA İzolasyonu

Hücreler, RNA izolasyonu için 6 well plate'lere OUMS-27 hücreleri için 4.0×10^5 , HEK-293T hücreleri için 6×10^5 hücre/well olacak şekilde 1.5 ml medyum içinde ekildi. 24 saat sonra TNF α uygulandı. Belirlenen sürenin sonunda aşağıdaki TriPure Isolation Reagent (Roche Diagnostic) protokolü takip edilerek RNA izolasyonu yapıldı.

Altılık well'lerdeki hücreler buz üzerine alındı ve medyumdan uzaklaştırıldı. PBS (1X) ile 2 kez (1ml) yıkama yapıldı. Her bir kuyucuktaki hücrelerin üzerine TRİZOL (2000 μ l) (içerisine %10 u kadar β merkaptotanol eklendi) kimyasalı (Invitrogen, Cat. No.15596-026) ilave edildi ve pipet ucu ile hücreler kazındı. Her kuyucuktaki hücreler 1'er ml olacak şekilde 2 ayrı 1,5 ml'lik ependorf tüplere alındı. Oda ısısında 5 dk. inkübe edildi. Ependorflar içine alınan hücre solüsyonu üzerine 200 μ L kloroform (Merck, Cat.No.102431) eklendi ve renk değişene kadar 2-3 dk sallandı (30sn. vorteks yapıldı). Organik ve sulu fazın ayrışması için 15.000 x rpm'de 10 dk +4 °C'de santrifüj yapıldı (oda ısısındaki santrifüj +4 °C ye ayarlandı ve hemen başlatıldı). RNA'ları içeren orta faz, (450-500 μ l) çepere yapışmış olan şeffaf renkli protein faza değmeden pipetle yeni 1,5 ml'lik ependorf tüpe alındı. sekiz yüz μ l (süpernatant x 2) %100 etanol eklenip, sallanarak karıştırıldı ve buz üzerinde 10 dk. inkübe edildi. 15.000 x rpm'de 15 dk +4 °C'de santrifüj yapıldı. Süpernatant RNA'ya zarar vermeden dikkatlice atıldı. % 70'lik etanolden (Merck, Cat. No.100993) 160 μ l eklendi ve hafifçe sallandı ve 15.000 x rpm'de 5 dk +4 °C'de santrifüj yapıldı. Alkol fazı RNA'nın olduğu çepere değmeden pipetle tamamen uzaklaştırıldı. Çöktürülen RNA pelleti etanolün uzaklaşması için kurumaya bırakıldı. Kuruyan RNA pelleti 30 μ l PCR-grade diethylpyrocarbonate (DEPC) (Invitrogen, Cat.No.46-2224) su içerisinde çözüldü. RNA'lar nanodropta ölçüldü, konsantrasyonları ve OD değerleri belirlendi. RNA, diğer deneylerde kullanılmak üzere -80 °C'de saklandı. (onikilik well için trizol 1 ml, kloroform 200 μ L). Zamana bağlı yapılan deneylerde, 0. saat ortanca zamanla birlikte alındı (örneğin 0, 2, 3, 4.5, 6 ve 9 saat lik deneyde 0.saat 4. Saatte birlikte alındı). Her bir well'den zamanı geldiğinde medyum aspire edildi. Bir ml 1X PBS ile yıkandı. Yeniden 500 μ l PBS eklendikten sonra, well'deki hücreler, scraber ile nazikçe kazındı (Tek bir scraber'la tüm well'ler kazındı. Bir well den diğerine geçerken scraber, otoklavlanmış su içeren 50 ml lik falkon içinde iyice temizlendi. Scraber içine yapışan

hücreler, well'i kazıma işinin ardından well içindeki medyuma batırılarak tabana vurmak suretiyle well içine boşaltıldı). Üzerine 500 µl daha PBS eklenip pipetajla karıştırıldı ve ilk 500 µl'si (RNA, cDNA ya dönüştürülürken örnekler sabit bir sayıya eşitlendiği için örnekler arası olası ölü hacim kaynaklı farklılıkları önlemek için ilk 500 µl protein için ayrılır) protein izolasyonu için 1.5 ml'lik ependorfa alındı. Kalan 500 µl'si de RNA izolasyonu için başka 1.5 ml lik ependorfa alındı. Ependorflar, buz üzerine alındı ve 4000 RPM de +4 °C de 4' santrifüj edildi. Süpernatant, pipetle uzaklaştırıldı. Pellet, -80 °C'de saklandı. Bütün saatler toplandıktan sonra hücre pelletleri, -80 °C'den çıkarıldı. Üzerine Trizol-β ME karışımından 100 µl ilave edildi. Pelletin iyice çözünmesi sağlandı. Daha sonra 900 µl daha trizol ilave edildi. Homojenize edildikten sonra 500 µl si başka bir ependorfa alındı. Her bir ependorfa 500 µl daha trizol eklendi. 5' oda ısısında bekletildikten sonra 200 µl kloroform ilave edildi. Diğer aşamalar yukarıda anlatıldığı gibi yapıldı.

3.4.1.3. cDNA Analizi

İzole edilen total RNA'ların cDNA formuna çevrilmesi için cDNA sentez kiti (RevertAid First Strand cDNA sentez kit, Thermo Sci. K1612) kullanıldı. RNA ölçüm sonuçlarına göre cDNA formuna çevirilecek tüm RNA örnekleri 1 µg'a eşitlendi. Hesaplama şöyle yapıldı;

Örneğin OD'de okunan RNA değeri $X=274,2$ ng/µl olsun. Bu, 1 µg'a eşitlenmek isteniyorsa;

$$X * 274,2 \text{ ng} = 0,274 \text{ µg}$$

(0,274'ü neyle çarparsam 1'e eşitlenir diye hesap yapılır)

$$1000/274.2=3,65 \text{ µl} = \text{alınacak RNA miktarı}$$

(NOT: RNA ve kitin içinde bulunan malzemeler her zaman buzda bekletilmelidir).

Örnek sayısı kadar 1,5 ml'lik ependorf tüp çıkartıldı. Her tüpe ayrı ayrı 1µl oligo(dT) primer konuldu. Her bir örnek için hesaplanan miktarda RNA sırasıyla ependorf tüplere konuldu. Her bir örnek için alınması gereken su miktarı 11-(alınacak RNA miktarı). Miks içerisine de su koyabilmek için 11 yerine 6-(alınacak RNA miktarı)

şeklinde de hesaplama yapılabilir. Her bir örnek için 5µl su da miks içerisine ilave edildi. Her bir örnek için hesaplanan miktarda su (kitin içinde mevcut) sırasıyla ependorf tüplere konuldu. Aynı bir temiz ependorf tüpün içinde aşağıdaki oranlarda mix hazırlandı. Bir örnek için hazırlanacak miktarlar (ölü hacim de eklenerek örnek sayısıyla çarpılarak mix hazırlandı).

- o 5X Reaction Buffer..... 4µl
- o Ribolock™ RNase Inhibitor(20 u/µl)1µl
- o 10mM DNTP Mix2µl
- o RevertAid™ M-MuLV Reverse Transcriptase(200 u/µl)..... 1µl
- o Hazırlanan mix örnek tüplerinin üstüne 8 µl olacak şekilde dağıtıldı.

Toplam hacim 20 µl oldu (12 µl önceden vardı 8 µl mix eklenerek toplam 20 µl oldu). Daha sonra, 42 °C'de 60 dk. inkübasyona bırakıldı. Sonra 70°C'de 5 dk. bekletildi. Spin atırıldı. Elde edilen cDNA'lar etiketlendikten sonra kullanılacağı zamana kadar -80°C de muhafaza edildi.

3.4.1.4. Agaroz Jel Elektrofrezisi

PZR sonrası istenen bölgenin amplifiye olup olmadığını kontrol etmek için %2'lik agaroz jelde PZR ürünleri yürütüldü. Jelin hazırlanması için, 100 mL 1xTAE (Tris/Asetik Asit /EDTA) tamponunun içine 2 gr agaroz (Invitrogen kat no: 16500-100g) konuldu. Mikrodalga fırında homojen olana kadar tutuldu (2') ve 1.8 µL ethidium bromide (Merck, 11608.0030) ilave edildikten sonra jel kalıba dökülerek donmaya bırakıldı. PZR ürünlerinden 5 µL alınarak 1 µL 3x Loading dye (Thermo, #R0611) ile karıştırılıp kuyucuklara yüklendi. PZR reaksiyonu ile elde edilen ürünler %2 agaroz jel elektrofrezinde, 100V akım altında, 30dk. yürütüldükten sonra UV transliminatörde görüntüldü.

3.4.1.5. Kantitatif Real Time PZR (RT-PZR) Optimizasyonu ve Hedef Genlerin Analizi

Elde edilen cDNA'lardan bir miks oluşturuldu. Bu miksten alınan cDNA, standart 1 olarak seçildi. İkişer kat dilüsyon yapılarak beş tane standart hazırlandı. Cihazın software'ine standart konsantrasyonları 2, 4, 8, 16, 32 olarak girildi.

Hücre hatlarında TNF α uygulamasının mRNA düzeyinde etkinliğini saptamak için Qiagen Rotor Gene Q cihazı kullanılarak real time PZR çalışması yapıldı (tablo 3.5). *ADAMTS4*, *ADAMTS5* ve *I κ B α* hedef gen, *β aktin* geni, standardizasyon için housekeeping gen olarak incelendi. Real-time PZR’da kullanılan sybr green, ışıktan etkilendiği için çalışma alanı karanlıkta, metal bloklarda ve tablo 9’daki miktarlarda (bir örnek için) çalışıldı. Datalar, Rotor Gene Q Software programında analiz edildi. İlgili genlerdeki ekspresyon değerleri housekeeping gen olan *β aktin* değerlerine oranlanarak analiz edildi.

Tablo 3.5. Kantitatif real time PZR çalışması için gerekli reaktifler ve miktarları

Reaktif	Miktar
2X QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix	12.5 μ l
20 pmol Forward Primer	0.5 μ l
20 pmol Reverse Primer	0.5 μ l
dH ₂ O	9 μ l
cDNA	2.5 μ l

Yukarıdaki bileşenler her bir örnek için son hacim 25 μ l olacak şekilde karıştırıldı ve Rotor Gene Q cihazında her bir genimiz için uygun bağlanma sıcaklığında 45 döngüye ayarlanarak Real Time PZR çalışması gerçekleştirildi.

Real time PZR ile geninin artışı gösterildikten sonra, aynı sonuçları protein seviyesinde de konfirme etmek için western blot yapıldı. Hücreler, RNA izolasyonunda bahsedilen şekilde ependorflarda toplandı.

3.4.2. Western Blot Yöntemiyle Protein Analizi

Öncelikle deney ve kontrol grubu hücrelerden protein izolasyonu gerçekleştirildi. Bunun için; (6’lık well için)

Ependorf tüpün (1.5 ml’lik) içerisine 950 μ L RIPA lizis buffer (Santa Cruz, Cat.No: sc-24948), (RIPA nın %1 i kadar proteinaz inhibitörü eklenir. Proteinaz inhibitörü,

100X konsantrasyonda olduğu için 1X e düşürmek için 100 katı kadar RIPA da çözülür) 9.5 µl proteaz inhibitörü (Calbiochem, Cat.No:539137), konularak karışım hazırlandı. Her bir peletin üzerine hazırlanan karışımdan 150'şer µl konuldu. Çok hafif vorteks yapıldı. Ve buz üzerinde 5 dk. inkübe edildi. Sonra spin atırıldı. Her bir örnek 0,5 ml'lik ependorf tüpüne aktarılıp 2.5 dk. boyunca sonikasyon (sonikatörün suyu önceden buz eklenerek soğutuldu) işlemi yapılarak proteinlerin parçalanması sağlandı. Spin down yapıldı. Örnekler tekrar 1,5 ml'lik ependorf tüpe alındı ve +4°C'de 150.000 rpm hızında 5 dk. santrifüj edildi. Süpernatant (~150 µl) yeni ependorfa alındı. Üzerine 50 µl SDS (4X konsantrasyonda olup, 150 µl hacim üzerine eklenince 1X e düşer) eklendi. Vorteks + spin down yapıldı. 95°C'de 5 dk inkübe edildi. Proteinler jele yüklendi.

3.4.2.1. %10'luk SDS-PAGE Jelin Hazırlanması

Tablo 3.6. Western blot jeli için gerekli solüsyonların hazırlanması

%30 ACA (akrilamid)	58 gr ACA + 2gr N,N,metilen bis ACA + 200 ml
2M Tris HCL	72 gr Tris + 250 ml dH ₂ O karışımı hazırlanır ve iyice çözüldükten sonra pH:8.8 e ayarlanır.
0.5M TrisHCL	6 gr Tris + 80 ml dH ₂ O karışımı hazırlanır ve iyice çözüldükten sonra pH:6.8 e ayarlanır.
% 10 APS (ammonium persulfate)	25 mg APS + 250 µl dH ₂ O karışımı hazırlanır. Bu karışım uzun süre dayanmaz o yüzden hemen hazırlayıp kullanmalıyız.
% 10 SDS (sodium dodecyl sulfat)	5 gr SDS tartılıp 50 ml ye dH ₂ O ile tamamlanır.

2 ayrı jel hazırlandı (Running jel ve stacking jel)

Elde edilen proteinin moleküler boyutuna göre jelin % kaçlık olacağına karar verildi ve çalışma protokolüne göre jel hazırlandı.

Tablo 3.7. Western Blot Running Jel Hazırlanışı (x2 jel için)

Bileşen	% 10 luk Running jel
dH ₂ O	8.26 ml
%30 ACA	6 ml
2M Tris	3.38 ml
% 10 APS	180 µl
% 10 SDS	180 µl
TEMED	20 µl

Tablo 3.8. Western Blot Stacking Jel Hazırlanışı (x2 jel için)

Tablo 12. Western Blot Stacking Jel Hazırlanışı "Bileşen	% 10 luk Stacking jel
dH ₂ O	4.055 ml
%30 ACA	0.7 ml
0.5M Tris	1.5 ml
% 10 APS	50 µl
% 10 SDS	60 µl
TEMED	10 µl

Önce running jel hazırlandı. Yapım aşaması yukarıda tabloda belirtilen oranlarda malzemelerin hazırlanması ve birleştirilmesiyle tamamlandı. Malzemelerin 50 ml'lik falkonda birbirine karıştırılması sırasında APS ve TEMED eklenmesi sona bırakıldı. Çünkü jelin donmasını sağlayan bu iki maddenin birbiriyle etkileşimidir. Camlar birbirine paralel olacak şekilde ayarlandı ve sıkıştırıldı. Suyla sızdırma olup olmadığı kontrol edildi. Daha sonra tarak takılarak tarağın ulaştığı son nokta camda işaretlendi. Bu noktaya kadar olacak şekilde running jel pipetle hızlıca ve köpük bırakmadan eklendi. Ardından hemen izopropanol eklendi. Running jel donduğunda donduğunu anlamak için camları eğik bir pozisyona getirerek donan jelin konumunu koruması ve akışkan olan alkolün hareket etmesi sebebiyle kırıklı bir yapı oluşuyor.

Bu sayede jelin donduğu anlaşılır. Bu aşamadan sonra alkol döküldü. Stacking jel eklendi ve hemen tarak takıldı. Donduğundan emin olunca tarak çıkartıldı. Proteinler yüklemeye hazır hale geldi. Çıkarıldıktan sonra gözle kuyucukların yamuk olup olmadığı çatlak olup olmadığı kontrol edildi ve daha sonra camlar tanka takıldı. Tanka takılırken iki cam arasına önce olmak üzere, üzerine 1x running buffer eklendi. Eğer buffer sızdırıyorsa çıkarıp tekrar takmak gerekir. Çünkü bu sızdırma proteinler yüklenip güç kaynağına takıp proteinler yürümeye başladığında bu sızıntı verilen elektriğin de bu sızıntıdan sızmasına ve proteinler yavaş veya hiç yürümemesine sebep olur. O yüzden çok önemlidir. Sızdırmadığından emin olduktan sonra ve Running buffer eklendi ve protein yükleme aşamasına geçildi (tablo 3.5, 3.6, 3.7, 3.8).

3.4.2.2. Proteinlerin Jele Yüklenmesi, Membrana Tranferi ve Blotlama

İzole edilen proteinlerin OD'leri dikkate alınarak her bir kuyucuğa eşit miktarda total protein yüklendi. Proteinler yüklendikten sonra ProSieve™ EX running buffer 1X (Lonza) içerisinde 100 V'da 5 dk. ve 240 V'da 17 dk. yürütüldü. Yürütme işlemi tamamlandıktan sonra jeli camdan ayırarak transfer aşamasına geçildi. Nitroselüloz membran kullanılırken en önemli şey kurumamasına dikkat etmektir. Şayet kurursa proteini tutma özelliğini kaybeder. Nitroselüloz membran %100 metanol konulan bir kabın içerisinde 2-3 dk. bekletildi. Transfer buffer daha geniş yayvan bir kabın içerisine dolduruldu. İçerisine filtre kâğıtları konuldu. İşlem boyunca filtre kâğıtlarının ıslak bir şekilde kalması sağlandı. Membranın bekleme işlemi tamamlandıktan sonra jelin camlardan ayrılması sağlandıktan sonra membrana transfer için, Pierce G2 Fast Blotter (Thermo Scientific) cihazına sırasıyla filtre kağıdı-nitroselüloz membran-jel-filtre kağıdı şeklinde düzenek oluşturuldu. Hava kabarcığı kalmaması için hafifçe rulo ile basılarak işlem tamamlandı. Transfer cihazı eksiden artıya doğru elektrik akımı vererek proteinlerin jelden membrana geçmesini sağladı. Proteinleri jelden membrana aktardıktan sonra membrana geçen proteinlerin dışındaki boşlukların kapatılması amacıyla bloklama yapılır. Yani bu sayede proteinin yapısında olan antikorların membranların boş olan kısımlarına bağlanmasını elimizden geldiğince en aza indirmiş oluyoruz. Anlamlı ve güvenilir sonuç elde etmek için antikorların membran üzerinde hangi proteinlerle ilgileniliyorsa o proteinlere bağlanmış olmasıdır. Membran üzerindeki nonspesifik bağlanmaların ortadan kaldırılması gerekir. Bunu

yaparken de % 2.5'lik süt tozu çözeltisi kullanıldı. Falkonda 1.25 g süt tozunun üzerini TBS-T ile 50 ml'ye tamamlayarak süt tozu çözeltisi hazırlandı ve vortekslendi. Membranı süt tozu çözeltisine koymadan önce membranın önü ve arkası neresi diye karıştırmamak için işaret konuldu. Proteinler hep membranın üst kısmında kalmalı bu yüzden membranın ön yüzünün üzerine işaret konuldu. Hangi antibody kaç kDa bandında görülmesi gerekiyorsa, membran üzerindeki markerin kaç kDa bantlarına karşılık gelen yerleri işaretlendi. Normal bir kaba membran koyuldu. Süt tozu membranın yüzeyini kaplayacak şekilde koyuldu. Membran süt tozu çözeltisinde oda sıcaklığındaki orbital shakerda 30 dk. bekletildi.

3.4.2.3. Membranın Antikorlarla Muamelesi

Beta aktin (sc-47778, Santa Cruz Biotechnology), anti-ADAMTS4 antibody (ab84792, Abcam), ADAMTS-5 (H-200) (sc-134952 Santa Cruz Biotechnology) antikorları kullanıldı. Antikorlar yağsız süt tozu içinde ADAMTS5 1/250, ADAMTS4 1/1000, beta aktin ise 1/1000 oranında eklendikten sonra membranlar +4 °C'de orbital shaker üzerinde bir gece inkübasyona bırakıldı (tablo 3.9).

Tablo 3.9. Kullanılan antikorlara ait bilgiler ve optimize edilmiş dilüsyon koşulları

Birincil antikor	Protein (kDa)	Birincil antikor (μ l antikor/ml süt tozu)	İkincil antikor	İkincil antikor (μ l antikor/ml TBS-T)
B-aktin	42	1/1000	Mouse	1/4000
ADAMTS4	90	1/1000	Rabbit	1/4000
ADAMTS5	75-105	1/250	Rabbit	1/4000

Yaklaşık 16 saat sonra membranlar üzerinde bulunan primer antikorlar alındı. Antibody alındıktan sonra membran 1X TBS-T ile dolu bir kaba alındı. 2 kez 5 dakika orbital shakerda yıkama yapıldı. Kullanılacak olan ikincil antikor çözeltisi hazırlandı. Yıkama sonrasında 1X TBS-T içerisinde 1/4000 oranında anti-mouse IgG, HRP-linked secondary antibody (7076P2; Cell Signaling, Danvers, MA, USA) ile oda ısısında 30 dk. orbital shaker üzerinde bekletildi. Otuz dk sonunda membranlar yine

1X TBS-T ile dolu bir kaba alındı. İki kez 5 dakika orbital shakerda sallanarak yıkama yapıldı. Son yıkama yapılırken bir taraftanda ECL solüsyonu hazırlandı.

3.4.2.4. Western Blot Sonuçlarının Görüntülenmesi

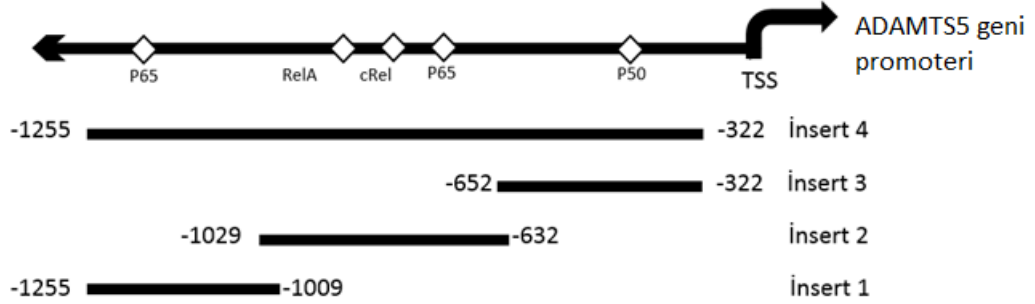
Yukarıdaki yıkama işlemleri yapılırken bir taraftan da deteksiyon solüsyonu hazırlandı. Bunun için, 750 µl lumi A, 750 µl lumi B solüsyonundan alınarak ve pipetaj yapılarak enzim çözeltisi hazırlandı. Bu oran, 500 µl de olabilir. Membranınızın büyüklüğüne göre değişir. Membranın üzerine hazırlanan enzim çözeltisi eklendi. Bir dk. bekletildi ve 5 dk. olduktan sonra membran CD poşetin arasına yerleştirildi. Poşet ile membran arasında hava kabarcığının kalmamasına dikkat edildi. Görüntü almaya hazır hale getirildi. Biorad ChemiDoc MP. Cihazında görüntü alındı.

3.5. ADAMTS5 Geni Promoter DNA Dizisinin Klonlaması

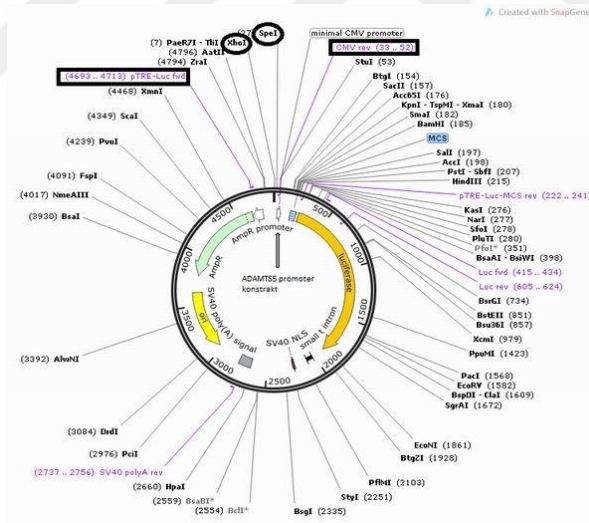
ADAMTS5 geni promoter analizi için ekspresyon plazmid konstraktları oluşturuldu. Bunun için;

ADAMTS5 geni promoter bölgesi üzerinde TF bağlanma bölgesi The MAPPER database: a multi-genome catalog of putative transcription factor binding sites programıyla analiz edildi. Yapılan araştırmada NFκB transkripsiyon faktörü bağlanma motifi içeren bölgeler tespit edildi. Bu faktörleri içeren 4 ayrı promoter konstraktı oluşturuldu (Şekil 3.1). Konstraktların çoğaltılması için primer dizayn edilirken klonlama yapılacak olan plazmid üzerinde seçilen birbirine yakın kesim bölgesi bulunan ve yapışkan uç meydana getiren iki enzimin (*XhoI* ve *SpeI*) tanıma bölgelerinden sırasıyla biri forward, diğeri reverse primerin ucuna ilave edildi (Tablo 3.2). Dizaynda ncbi'ın online primer dizayn programı kullanıldı (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Laboratuvarımızda daha önceki projemizde kullanılmış olan ve hipoksi response element içeren pHRE vektörünün HRE bölgesi *XhoI* ve *SpeI* enzimleriyle kesilerek insertler bu bölgeye klonlandı (şekil 3.2). Klonlama sonrası, sekans analizi ile dizilerin doğruluğu teyid edildi. Vektörde, minimal cytomegalovirus (CMV) promoter, lusiferaz geni ve ampisilin rezistans geni bulunmaktadır. Lusiferaz geninin önüne klonlanan promoter konstraktı, luiferaz assay ile NFκB'ye verdiği yanıt açısından test edildi. NFκB ise transfeksiyon yapılan

hücrelere TNF α uygulanarak hücrelerin üretmesinin sonucu açığa çıkmaktadır. Transfeksiyonun verimini kontrol etmek için Green fluorescent protein (GFP) ile eşzamanlı transfeksiyon yapıldı. Transfeksiyon verimi optimize edildi. Transfekte edilen hücrelere TNF α uygulandı. Ardından, lusiferaz assay yapıldı.



Şekil 3.1. En üstte, *ADAMTS5* geni promoterinin, TF bağlanma bölgesi tahmin programıyla analizi sonucu bulunan NF κ B bağlanma bölgeleri şematik olarak gösterilmiştir. Altta, bu bağlanma bölgelerinin bazılarını ya da tamamını içeren konstraktlar (insert 1,2,3,4) şematize edilmiştir.



ADAMTS5 NC_018932.2 (SnapGene programı)

Şekil 3.2. Klonlamada kullanılan vektörün şematik gösterimi. Vektör; minimal CMV promoter, lusiferaz geni ve ampisilin rezistans geni ve multiple klonlama bölgesi içermektedir. *XhoI* ve *SpeI* enzimlerinin tanıma bölgeleri yuvarlak içine alınmıştır. Koloni PZR da kullanılan primerler dikdörtgen içine alınmıştır.

3.5.1. ADAMTS5 Gen Promoter DNA Dizisinin PZR ile çoğaltılması

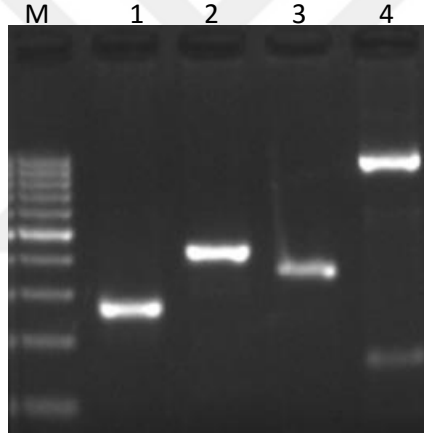
Klonlanacak DNA dizisi, PZR ile çoğaltıldı. Klonlamada kullanılacak olan vektörün üzerinde birbirine yakın kesim bölgesi bulunan ve yapışkan uç meydana getiren iki enzim seçildi. (*XhoI* ve *SpeI*)

Phusion high-fidelity DNA polimeraz ile PZR şartları;

5X buffer	10 µl	PZR cycle;	
10mM dNTP.....	1 µl	98°C.....	2'
Fwd primer.....	1,5 µl (5 pmol)	98°C.....	10''
Rev primer.....	1,5 µl (5 pmol)	Tm°C.....	30''
Phusion DNA pol....	0,5 µl	72°C.....	60''
gDNA.....	100ng	72°C.....	5'

Elde edilen PZR ürününün 5 µl'si, agaroz jel elektroforezde yürütüldü.

(Şekil 3.3)



Şekil 3.3. ADAMTS5 geni promoter bölgelerine spesifik primerler ile elde edilen PZR ürünleri %2 agaroz jel elektroforez görüntüsü. M: 100 bp Marker; kuyucuk 1: 256 bp ADAMTS5 geni promoter NfkB bağlanma bölgesi (p65); Kuyucuk-2: 417 bp ADAMTS5 geni promoter NfkB bağlanma bölgesi (p65, cRel, RelA); Kuyucuk-3: 351 bp ADAMTS5 geni promoter NfkB bağlanma bölgesi (p50); Kuyucuk-4: 953 bp ADAMTS5 geni promoter NfkB bağlanma bölgesi (p65, cRel, RelA, p50).

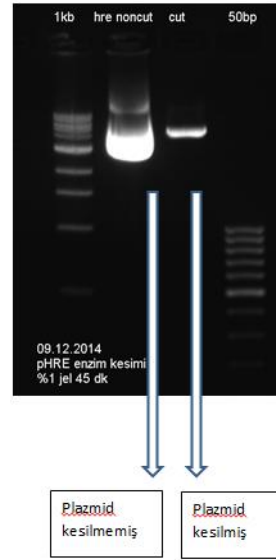
3.5.2. PZR Ürünlerinin Pürifikasyonu

PZR ürününden 5 µl elektroforez için kullanıldığından geriye 45 µl kaldı. PZR ürünlerinin purifikasyonu fenol-kloroform yöntemiyle gerçekleştirildi. Bunun için

fenol ve ürün 1:1 oranında karıştırılmalı ve fenol 100 µl kullanılmalıdır. Bu nedenle, 45 µl'lik ürünün üzerine 55 µl nükleaz free su eklenerek 100 µl'ye tamamlandı. Üzerine 100 µl fenol eklendi. 10-30'' vortekslandı. Oda ısısında, maximum hızda 10' santrifüj edildi. Üstte oluşan fazdan yaklaşık 85 µl pipetle çekilip temiz ependorfa alındı. Yeni ependorfa aktardığımız süpernatanın üzerine 10 µl sodyum asetat (oda ısısında saklanır) ve 250 µl %96'lık etanol eklendi ve +4 °C de max hızda 15' santrifüj edildi. Üstteki alkol fazı dökülerek boşaltıldı. Etanol (160 µl %70'lik) eklendi. Maximum hızda +4 °C'de 5'santrifüj edildi. Süpernatın, pipetle pelletin olmadığı çeperden çekilerek boşaltıldı. Tüpler oda ısısında 10' kurumaya bırakıldı. Pellet, 30 µl nükleaz free su ile çözülerek nanodrop'ta ölçüm yapıldı.

3.5.3. PZR Ürünlerinin Restriksiyon Enzimleri ile Kesimi ve Defosforilizasyon

PZR ürünü ve ürünümüzü klonlayacağımız vektör, aynı restriksiyon enzimleriyle kesildi. (Şekil 3.4)



Şekil 3.4. Plazmid enzim kesim ürünü agaroz jel elektroforez

Enzim kesimi;

DNA.....	1 µg	}	37 ⁰ de 16 saat inkübe edildi
Fast digest buffer.....	.5 µl		
<i>Xho</i> 1.....	1 µl		
<i>Spe</i> 1.....	1 µl		
H2O.....	50 µl'ye tamamlandı.		

Enzim kesimi sonrası ürünler (vektör hariç), PZR sonrası yapılan fenolkloroform pürifikasyonu metoduyla yeniden pürüfiye edildi. Vektör, enzim kesimi sonrası, kesilen uçlarının tekrar birleşmemesi için kesik uçlarının fosfatları koparılarak defosforilizasyon işlemi gerçekleştirildi. Bunun için;

Enzim kesimi sonrası reaksiyon tüpüne;

- Antarctic fosfataz enzimi.....1 µl
- Antarctic fosfataz buffer..... 5 µl
- Eklenip 37 °C de 1 saat inkübe edildi.

Enzim kesimi sonrası plazmid, jel ekstraksiyonu ile pürifiye edildi. Jel ekstraksiyonu Thermo Scientific GeneJET Gel Extraction Kiti ile yapıldı. Jel ekstraksiyonu yapılacak PZR ürünleri (20µL) yeni hazırlanmış taze kalın taraklı jelle yüklendi. Dimerlerin uzaklaşması için mümkün olan en uzun süre yürütüldü. Karanlık odada bantlara bakılıp, hangisinin alınacağına karar verildi. DNA bantları bant kesici (extractor) ile dikkatlice alındı. Kesilen bant, 1.5 ml lik ependorfa alındı. Üzerine 500 µl binding buffer eklendi. Vorteks + Spin down yapıldı. Heat block ta 55 °C’de 10 dk inkübe edildi (Jel parçaları tamamen eriyene kadar 2-3 dakikada bir vortex yapıldı. Jel parçaları eridikten sonra tamponun rengi sarı olmalı). Tüpler oda ısısına gelene kadar birkaç dakika bekletildi. Spin kolona aktarıldı ve 13.000 rpm’de 1dk. santrifüj edildi. Alttaki toplama tüpü boşaltılıp tekrar takıldı ve 700 µl wash buffer eklendi. Daha sonra, 13.000 rpm’de 1dk. santrifüj edildi. Alttaki toplama tüpü boşaltılıp tekrar takıldı ve 13.000 rpm’de 1dk. santrifüj edildi. Spin kolon yeni ependorf tüpe oturtuldu. Toplama tüpleri atıldı. Kolonun merkezine 30 µL nükleaz free su (70°C) eklendikten sonra, 2 dk. oda sıcaklığında bekletildi ve 3.000 rpm’de 2 dk. santrifüjlendi. Spin kolon atıldı. DNA değeri spektrofotometrede okutuldu.

3.5.4. PZR Ürünlerinin Plazmide Ligasyonu ve Plazmid Konstraktının Bakteriye Transformasyonu

PZR ve plazmid ürünü ligasyonu için vektör/insert oranı, 1:6 alındı.

İnsert ve vektöre ilaveten ,

10X T4 ligaz buffer.....2 µl	} 16 °C’de bir gece inkübasyona bırakıldı.
T4 ligaz.....0,5 µl	
H2O20 µl ye tamamlandı.	

Ligasyon reaksiyonu sonucunda, elde edilen ürünler, kompetan hücelere transformasyonu gerçekleştirildi. Bunun için öncelikle, agar plate ve Luria-Bertani (LB) bakteri kültür medyumları hazırlandı. Agar plate hazırlamak için;

Bir litre distile su + 35 gr kültür vasatı (Sigma^R agar ve besiyeri karışımı) karıştırıldı. Sıvı otoklavda otoklavlandı. Ampisilinden 1ml (50mg/ml) eklendi. Platelere zeminini kaplayacak şekilde döküldü. Katılaştıran platelerin kapakları kapatıldı. Tarih, isim, antibiyotik içeriği yazılarak +4 °C'ye kaldırıldı.

LB broth Hazırlamak için;

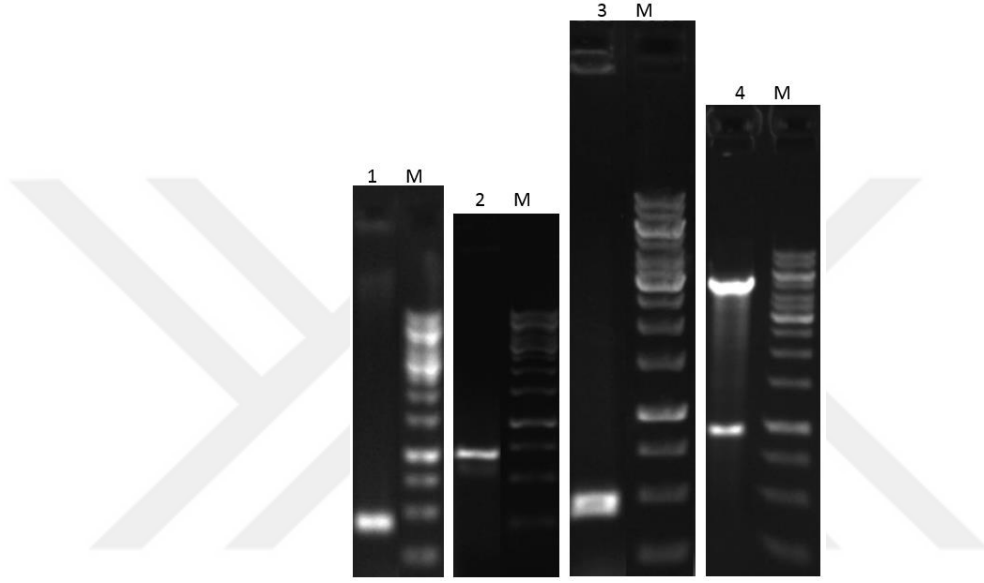
Bir litre distile su + 20 gr LB broth karıştırılıp sıvı otoklavda otoklavlandı. Soğuduktan sonra antibiyotik eklendi. 15 ml'lik falkona 4 ml alındı.

Kompetan hücre (-80 °C den) çıkarıldı ve buz üzerine alındı. Eridikten sonra yavaşça bir kaç kez alt üst edilerek karışması sağlandı. Önceden buz üzerine yerleştirilmiş 1,5 ml'lik ependorfa ligasyon ürününden 10 µl koyuldu. Üzerine 100-150 µl kompetan hücreden eklendi. Nazikçe pipetaj yapıldıktan sonra buz üzerinde 15-30 dk inkübe edilir. Bu arada hot plate 42°C'ye ayarlandı. Buzdan alınan ependorf, 42 °C'lik plate te 30'' bekletildi ve tekrar buz üzerine alındı ve 2-3 dakika buzda bekletildi. Bunzenbeki alevi yanında plate lere ekim yapıldı. Transformasyon ürünü, pipetle damla damla plate üzerine bırakıldı. Spreader ile yayıldı. Kapağı açık bırakılarak kurumaması beklendi. Kapağı alta gelecek şekilde ters olarak 37°C etüve kaldırıldı ve 16 saat sonra etüvden alındı ve oluşan kolonilerden hangilerinde insert olduğunu görmek için plazmid üzerine lokalize olmuş primerlerle koloni PZR yapıldı.

3.5.5. Koloni PZR

Etrafından iyi izole olmuş bir koloni seçildi ve numaralandırıldı. 0,2 ml'lik PZR tüpüne 5 µl nükleaz free su eklendi. Sterilize edilmiş kürdanla ya da 10'luk pipet ucuyla koloniye dokunularak ve suya batırılıp pipetaj yapılarak suya bırakıldı. Eş zamanlı olarak, PZR tüpüne batırılan pipet ucu temiz bir agara dokunduruldu ve koloninin alındığı plate'e verilen numarası buraya da yazıldı. Plate 37°C ye 16 saat

inkübasyona bırakıldı. Tüp, 95⁰C de 5' bekletildi. Taq polimerazla PZR reaksiyonu için hazırlanan miks, tüpe ilave edildi ve PZR cihazına koyuldu. Koloni PZR için primerler, insertin girdiği yeri içine alacak şekilde vektör üzerinden pTRE luc fwd, CMV rev primerleri seçildi (Şekil 7). İki primer arasındaki vektöre ait dizi 226bp olduğu için insert içeren kolonilerde 226bp+insert uzunluğu kadar ürün beklenmektedir (Şekil 3.5).



Şekil 3.5. Koloni PZR %2 agaroz jel elektroforez. M: 1kb Marker; kuyucuk 1: İnsert1: 226+256= 482bp; kuyucuk 2: İnsert2: 226+417= 643bp; kuyucuk 3: İnsert3: 226+351= 577bp; kuyucuk 4: İnsert4: 226+953= 1179bp.

3.5.6. Mini Prep ve Maksı Prep Plazmid İzolasyonu

Koloni PZR sonucu insert içirme ihtimali olan kolonilerde, gerçekten insert olup olmadığını görmek için mini kültür yapıldı. Mini kültür sonrası plazmid izolasyonu yapıldı. Klonlama sırasında vektör ve insertü kesmek için kullandığımız restriksiyon enzimleri ile kesim yapılarak kolonilerde insert varlığı doğrulandı. İnsert içeren kolonilerle mini kültürden maksı kültüre geçildi.

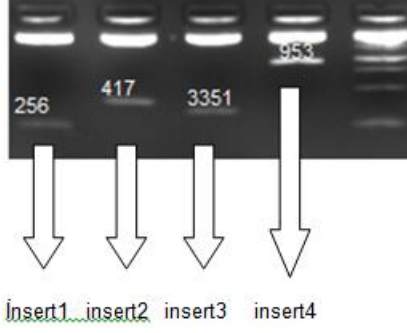
3.5.7. Plazmid İzolasyonu

Pozitif koloniden pipet ucu ile dokunularak alınan parça 4ml LB broth içeren falkona pipetajla bırakıldı ve 37⁰C lik etüvde shaker a yerleştirildikten sonra 16 saat inkübe edildi Sıvı kültür sonrası falkon, +4⁰C de 5' max hızda santrifüj edildi. Süpernatant atıldı ve 250 µl resüspanسیون solüsyonu eklendi. Sert bir şekilde 30'' vortekslendi. Ependorfa alındı. 250 µl lizis buffer eklendi. İki dk oda ısısında bakterilerin lizis olması için beklendi ve 350 µl nötralizasyon buffer eklendi. Alt üst edildi (15 kez). Bir dkmax hızda santrifüj edildi. Spin kolona süpernatant, aktarıldı. Spin kolon 1' max hızda santrifüj edildi. Spin kolon üst ucundan tutularak kolonun altındaki tüpe geçen sıvı faz pipetle çekilip atıldı. Kolon tekrar tüpe yerleştirildi ve 500 µl wash buffer eklendikten sonra 30'' max hızda santrifüj edildi. Tüpe geçen sıvı faz pipetle çekilip atıldı. Wash buffer ile yıkama bir kez daha tekrarlandı. İkinci yıkamanın ardından boşaltılan tüpe spin kolon yerleştirildi ve boş olarak tekrar santrifüj edildi ve tüp atıldı. Spin kolon temiz bir tüpe yerleştirildi. Kolonun tam ortasına 50 µl ellution buffer bırakıldı. Oda ısısında 2' beklendi. İki dk max hızda santrifüj edildi.

3.5.8. Enzim Kesimi ile Plazmidlerde İnsert Varlığının Kontrolü

İzole edilen plazmid DNA sı enzim kesimine bırakıldı.

DNA.....1 µg .
Fast digest buffer.....5 µl
İlgili enzim ya da enzimler....1 µl
H2O50 µl ye tamamlandı.
37⁰ de 16 saat inkübe edildi
(Şekil 3.6).

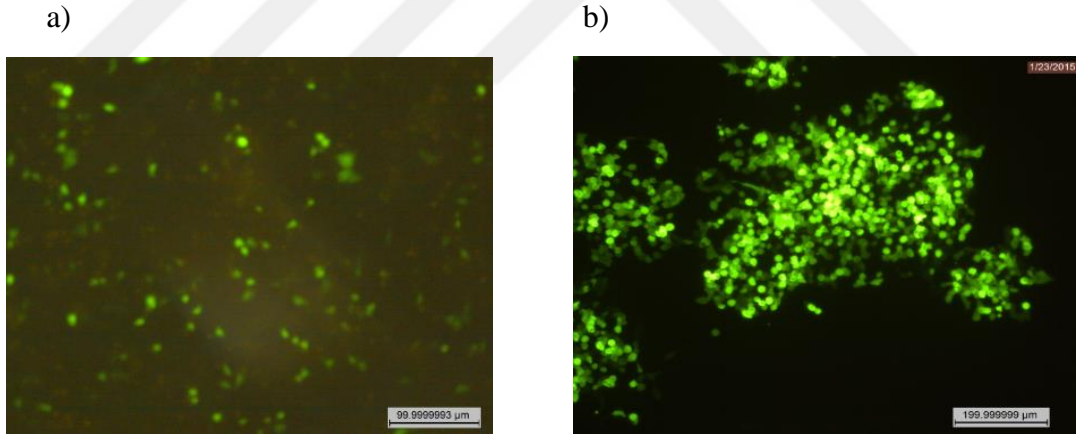


Şekil 3.6. Mini prep sonrası yapılan enzim kesim ürünü %2 agaroz jel elektroforez görüntüsü.

İnsert pozitif olan kolonilerden elde edilen plazmid DNA'sı insertleri çoğaltmak için kullanılan primerlerle sekanslandı ve doğrulandı. Enzim kesimi sonrası insert içerdiği tespit edilen ve sekansla doğrulanan plazmidi içeren koloniden maxi prep yapıldı. 100 ml LB broth içine, insert pozitif koloniden pipet ucu ile ekim yapıldı. 16 saat 37 °C de shaker da inkübe edildi. İnkübasyonun ardından 50 ml lik falkonlara bölündü. +4°C de max hızda 5' santrifüj edildi. Süpernatant atıldı. Pellet buz üzerine alındı. 8 ml resüspanسیون buffer eklendi. Vortekslenerek homojenize edildi. 8 ml lizis buffer eklendi. 8 kez hem kendi etrafında dönürülerek hem de alt üst edilerek karıştırıldı. 5' oda ısısında bekletildi. Her bir kolona 5 ml equilibration buffer eklendi. Buffer damlayarak kolondan süzülürken onu aktive etmiş olur. 5' beklemiş olan falkona 8 ml precipitation buffer eklendi. Oda ısısında 10' max hızda santrifüj edildi. Süpernatant, aktive olmuş kolona boşaltıldı. Kolonon damlayarak tamamen boşalması beklendi. 10 ml wash buffer eklendi. Damlayarak boşalması beklendi. Bitince tekrar wash buffer eklendi. Boşalınca, kolonun altına temiz 15 ml lik falkon yerleştirildi. Kolonun üzerine 5ml elution buffer eklendi. Elution buffer falkona boşalınca kolonlar atıldı. Falkona 3.5 ml izopropanol eklenir ve vortekslendi. 12000 g de 30' +4°C de santrifüj edildi. Süpernatant atıldı. Üzerine 3 ml % 70 lik etanol eklendi. 12000 g de 5' +4°C de santrifüj edildi. Alkol pipetle çekilip atıldı. 250 µl TE buffer ile DNA çözüldü.

3.5.9. ADAMS5 Geni Promotor DNA Dizisi İçeren Plazmid Konstraktlarının OUMS27 ve HEK-293T Hücrelerine Transfeksiyonu

Elde ettiğimiz insert içeren plazmid, ökaryot hücelere transfeke edildi. Transfeksiyon esnasında hücreler % 70-80 dolulukta idi. 12'lik well'e 1 ml antibiyotiksiz medyum içinde 3×10^5 hücre ekildi. Ertesi gün tutunmuş olan hücelere transfeksiyon yapıldı. Her bir kuyu için endorflara 100 µl optimem medium eklendi. 30 ng renilla lusiferaz vektörü eklendi. Üzerine 1.5 µg plazmid DNA sı ilave edildi. Renilla + optimem karışımı vorteks + spin down yapıldı. Her bir insert DNA'sından 1.5 µg eklendi. GFP için de 1,5 µg alındı. DNA + optimem karışımı vortekslenip, spin down yapıldı. Trans pass D2 transfeksiyon reagent'tan her bir endorfa 3 µl eklendi. Vorteks spin down yapıldı. 10' oda ısısında bekletildi. Well'e damla damla farklı noktalara bırakıldı. Well, sallanarak karıştırıldı. 48 saat boyunca inkübe edildi. GFP ışması mikroskopta floresan filtre altında incelendi (Şekil 3.7)



Şekil 3.7. Transfeksiyon sonrası GFP proteini mikroskop görüntüsü; a) OUMS27 hücrelerinin GFP plazmidi ile transfeksiyonu b) HEK-293T hücrelerinin GFP plazmidi ile transfeksiyonu

3.6. ADAMS5 Geni Promotor Dizisinin Lusiferaz Assay ile İncelenmesi

ADAMTS5 geni promoter bölgesinde bulunduğu varsayılan NFκB bağlanma bölgelerini içeren *ADAMTS5* geni promoteri plazmid ekspresyon konsgraktları ile

transfekte edilen ökaryot hücrelerde (OUMS-27 ve HEK-293T) TNF α uygulanması sonucu, *ADAMTS5* geni promoterinin çalışmasına etkilerini araştırmak için lusiferaz deneyleri yapıldı. Bunun için;

Transfeksiyon sonrası, her bir well'deki medyum aspire edildi. 150 μ l 1X working solüsyon eklendi. 15' +4⁰C de shaker da sallandı. Pipetaj yapılıp, luminometre cihazının 96 well plate kuyularına hücre lizatından 20 μ l bırakıldı. Üzerine 50 μ l lusiferin substratı eklendi ve ölçüm yapıldı.

3.7. İstatistiksel Analizler

MINITAB 14 istatistik programı ve excel (2013) programları kullanılarak istatistiksel analiz gerçekleştirildi. İstatistiksel test olarak tip2 çift kuyruklu t testi kullanıldı. Uygulanan tüm yöntemlerde numuneler ikili çalışıp, ortalamaları alındı. Analiz sonucu $p < 0,05$ çıkan değerler, istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

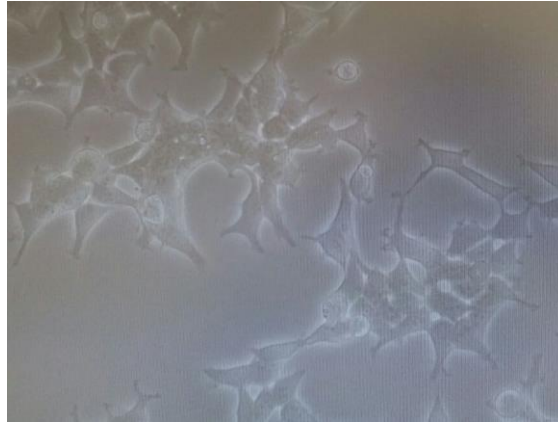
4. BULGULAR

4.1 Hücre Kültürü

OUMS-27 ve HEK-293T Hücreleri başarılı şekilde kültür ortamında çoğaltıldı. Yaklaşık üç günde %80 doluluğa ulaşan hücreler pasajlandı. Ortalama 2-3 pasaj sonrası well'lere bölünerek deneylere başlandı (Bkz. Resim: 4.1 ve 4.2)



Resim 4.1. OUMS-27 hücreleri ışık mikroskobu görüntüsü (20X)



Resim 4.2. HEK-293T hücreleri ışık mikroskobu görüntüsü (20X)

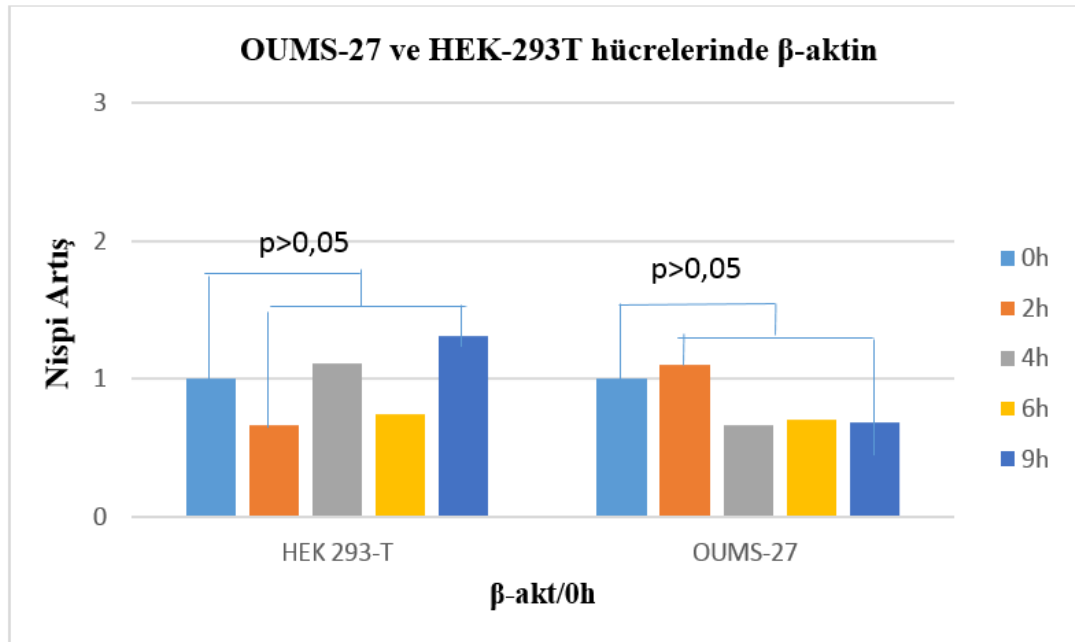
4.2. Gen Ekspresyon Sonuçları

OUMS-27 ve HEK-293T hücrelerinde TNF α uygulamasının, *ADAMTS5*, *I κ B α* ve *ADAMTS4* genleri ekspresyonuna etkisini araştırmak için, mRNA seviyesinde qPZR ile real time analizi, protein seviyesinde, western blotting tekniği ile analiz yapıldı. Sonuçlar aşağıda verilmiştir

4.2.1. Real time qPZR Sonuçları

4.2.1.1. OUMS-27 ve HEK-293T Hücrelerinde TNF α Uygulaması ve *β aktin* Geni Ekspresyonu

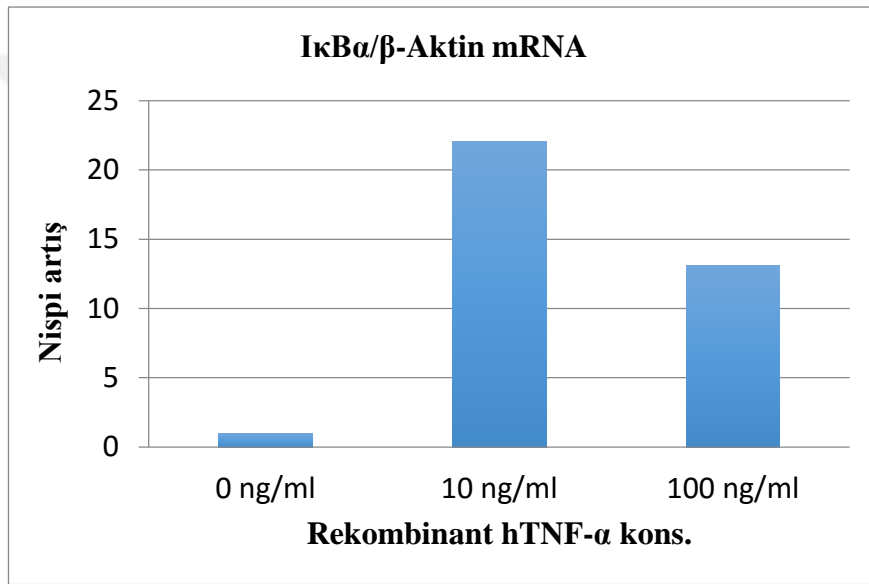
OUMS-27 hücrelerinde ve HEK-293T hücrelerinde housekeeping gen olarak *β aktin* geni seçildi. *β aktin* geni ekspresyonunun, TNF α uygulamasından etkilenmediği real time ekspresyon analizi ile gösterildi ($p>0,05$) (şekil 4.3)



şekil 4.3. HEK-293T ve OUMS-27 hücre hattına, farklı sürelerde 10ng/ml konsantrasyonda hTNF α (Gibco®) uygulanması sonrasında *β aktin* geni mRNA ekspresyon düzeyi

4.2.1.2 HEK-293T Hücrelerinde TNF α Uygulaması ve I κ B α Geni Ekspresyonu

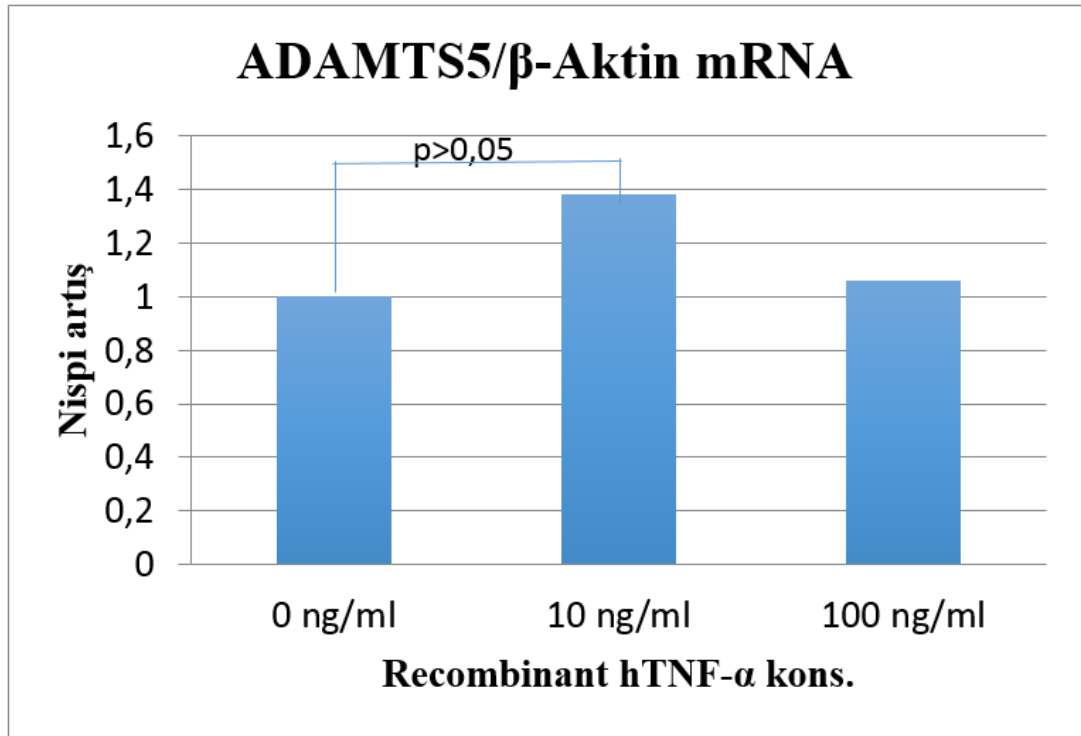
HEK-293T hücrelerine TNF α 'nın etkin dozunu belirlemek için, literatürde kullanılan dozlardan, 0 ng/ml, 10 ng/ml ve 100 ng/ml dozlarda TNF α uygulandıktan sonra TNF α 'nın hedef geni olduğu bilinen *I κ B α* geninin mRNA ekspresyonu analiz edildi. 0 ng/ml doza göre 10 ng/ml dozda 22 kat, 100 ng/ml dozda 13 kat artış tespit edildi. 10 ng/ml dozun daha etkin olması nedeniyle daha sonraki zamana bağımlı deneylerde 10ng/ml TNF α dozu kullanıldı (Şekil 4.4).



Şekil 4.4. HEK-293T hücre hattına, 1 saat süreyle, 0 ng/ml, 10 ng/ml ve 100 ng/ml konsantrasyonlarda hTNF α (Gibco®) uygulanması sonrasında *I κ B α* geni mRNA ekspresyon düzeyi. Referans gen olarak β -aktin geni kullanıldı. Sonuçlar, referans gene göre normalize edildikten sonra kontrol grubuna (0 ng/ml) bölünerek nispi artışlar grafiğe döküldü.

4.2.1.3 HEK-293T Hücrelerinde TNF α Uygulaması ve ADAMTS5 Gen Ekspresyonu

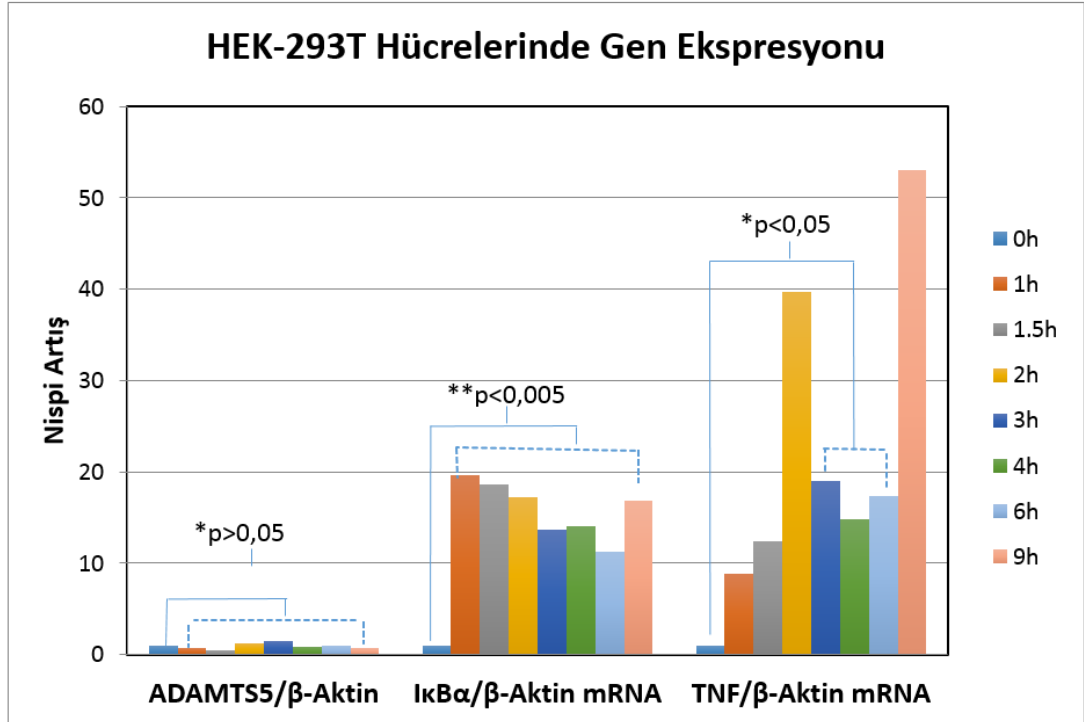
HEK- 293T hücrelerine 0 ng/ml, 10 ng/ml ve 100 ng/ml dozlarda TNF α uygulandıktan sonra hedef genimiz olan *ADAMTS5* geni mRNA ekspresyonu analiz edildi. 0 ng/ml doza göre 10 ng/ml ve 100 ng/ml dozda anlamlı artış meydana gelmedi (Şekil 4.5).



Şekil 4.5. HEK-293T hücre hattına, 1 saat süreyle, 0 ng/ml, 10 ng/ml ve 100 ng/ml konsantrasyonlarda hTNF α (Gibco®) uygulanması sonrasında *ADAMTS5* geni mRNA ekspresyon düzeyi. Referans gen olarak β -aktin geni kullanıldı. Sonuçlar, referans gene göre normalize edildikten sonra kontrol grubuna (0 ng/ml) bölünerek nispi artışlar grafiğe döküldü

4.2.1.4. HEK-293T Hücrelerinde TNF α Uygulaması ve *ADAMTS5*, *I κ B α* ve *TNF α* Gen Ekspresyonu

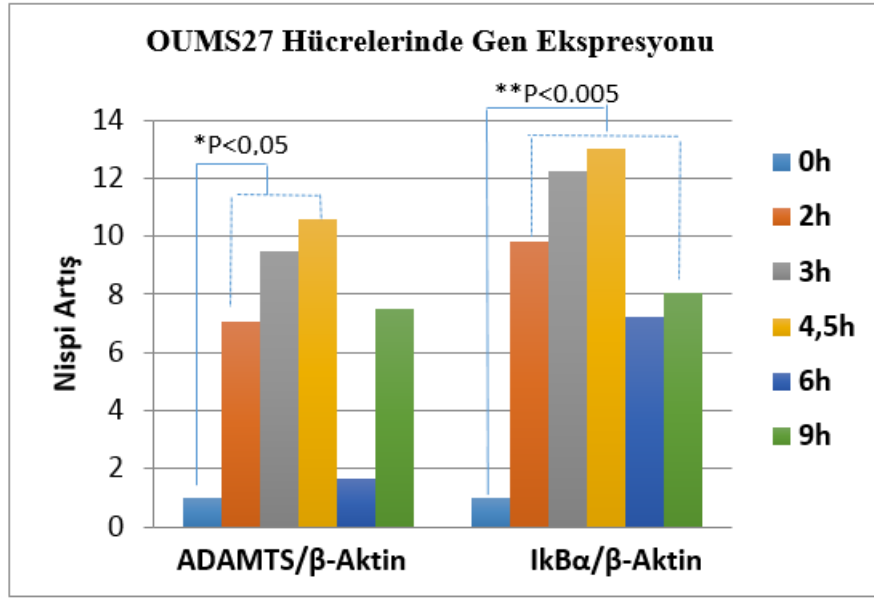
HEK- 293T hücrelerine daha önceki etkin doz belirleme deneyinden elde edilen verilere göre, 10 ng/ml dozda olmak üzere farklı sürelerde TNF α uygulandıktan sonra *ADAMTS5*, *I κ B α* ve *TNF α* geni mRNA ekspresyonu analiz edildi. 0. saate göre *ADAMTS5* geninde istatistiksel olarak anlamlı değişiklik tespit edilmedi. *I κ B α* geninde en fazla 1.saatte olmak üzere (x19) zamana bağlı artış tespit edildi. *TNF α* geninde en fazla 9. saatte olmak üzere (x52) zamana bağlı artış tespit edildi (Şekil 4.6).



Şekil 4.6. HEK-293T hücre hattına, farklı sürelerde 10 ng/ml konsantrasyonda hTNF α (Gibco®) uygulanması sonrasında *ADAMTS5*, *IκBα* ve *TNFα* geni mRNA ekspresyon düzeyi. Referans gen olarak β -aktin geni kullanıldı. Sonuçlar, referans gene göre normalize edildikten sonra 0. saate bölünerek nispi artışlar grafiğe döküldü.

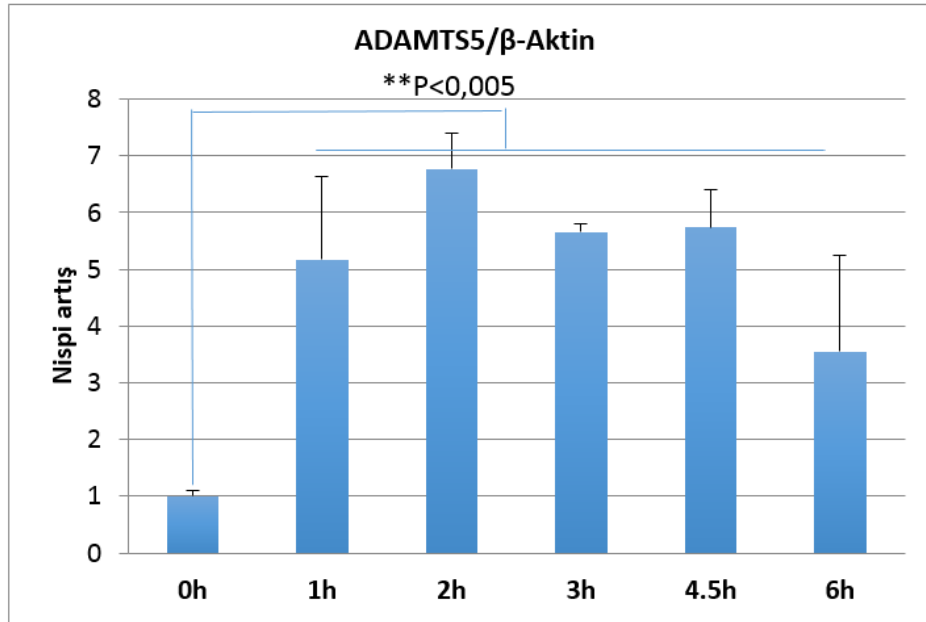
4.2.1.5. OUMS-27 Hücrelerinde TNF α Uygulaması ve *ADAMTS5*, *IκBα* Gen Ekspresyonu

OUMS-27 hücrelerine 10ng/ml dozda farklı sürelerde TNF α uygulandıktan sonra *ADAMTS5*, *IκBα* ve *TNFα* geni mRNA ekspresyonu analiz edildi. 0. saate göre *ADAMTS5* ve *IκBα* geninde 4,5. saatte en fazla olmak üzere (x13) zamana bağlı artış tespit edildi (Şekil 3.7).

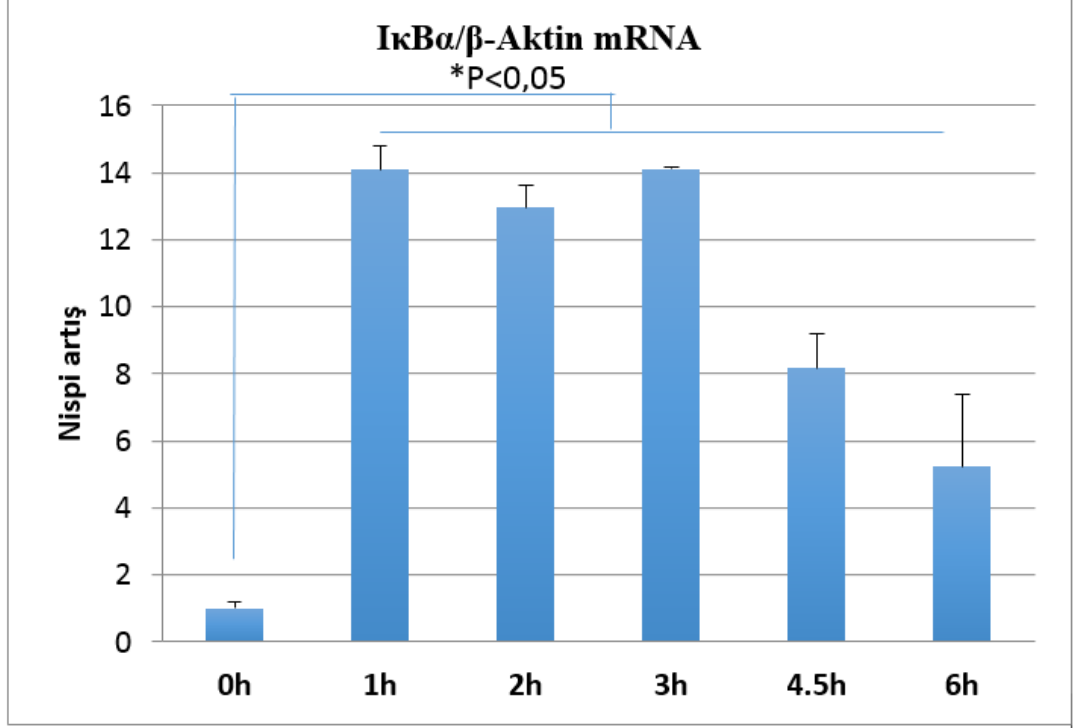


Şekil 4.7. OUMS-27 hücre hattına, farklı sürelerde 10 ng/ml konsantrasyonda hTNFα (Gibco®) uygulanması sonrasında *ADAMTS5* ve *IκBα* geni mRNA ekspresyon düzeyi. Referans gen olarak *β-aktin* geni kullanıldı. Sonuçlar, referans gene göre normalize edildikten sonra 0. saate bölünerek nispi artışlar grafiğe döküldü.

OUMS-27 hücrelerinde yapılan deney, bulunan sonuçları doğrulamak için tekrarlandı. Önceki çalışma ile paralel sonuçlar elde edildi (Şekil 4.8 ve 4.9).



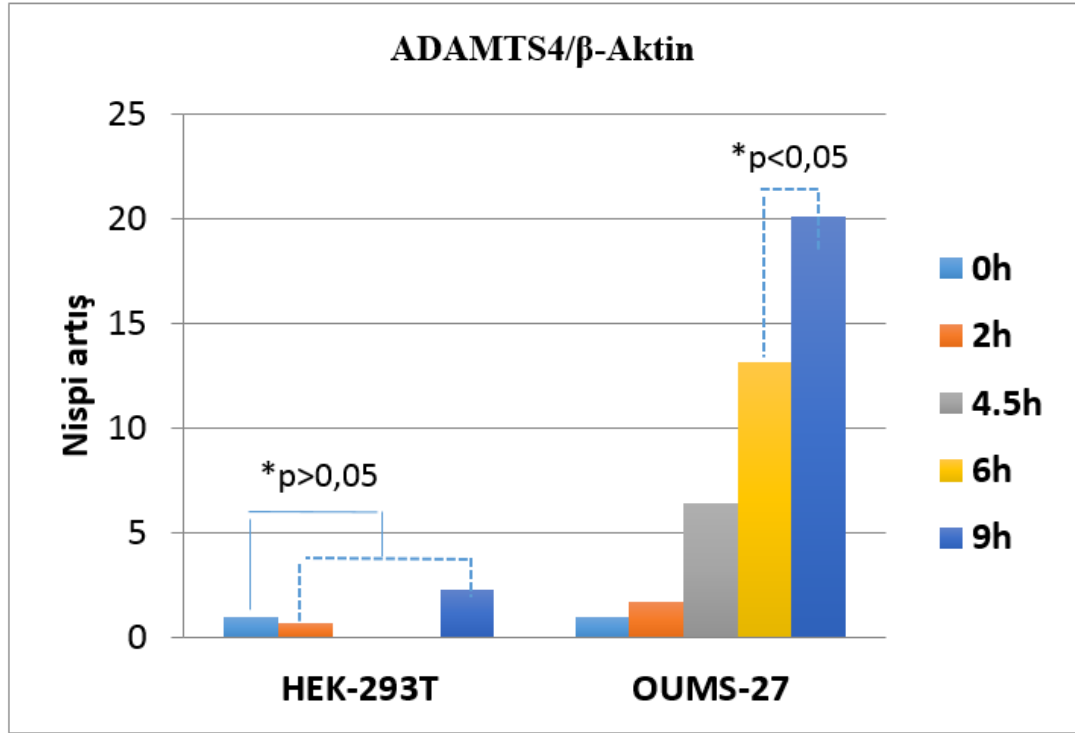
Şekil 4.8. OUMS-27 hücre hattına, farklı sürelerde 10ng/ml konsantrasyonda hTNFα (Gibco®) uygulanması sonrasında *ADAMTS5* geni mRNA ekspresyon düzeyi. Referans gen olarak *β-aktin* geni kullanıldı. Sonuçlar, referans gene göre normalize edildikten sonra 0. saate bölünerek nispi artışlar grafiğe döküldü.



Şekil 4.9. OUMS-27 hücre hattına, farklı sürelerde 10ng/ml konsantrasyonda hTNF α (Gibco®) uygulanması sonrasında *IκBα* geni mRNA ekspresyon düzeyi. Referans gen olarak β -aktin geni kullanıldı. Sonuçlar, referans gene göre normalize edildikten sonra 0. saate bölünerek nispi artışlar grafiğe döküldü.

4.2.1.6. OUMS-27 Hücrelerinde TNF α Uygulaması ve *ADAMTS4* Gen Ekspresyonu

HEK-293T ve OUMS-27 hücrelerine 10ng/ml dozda TNF α uygulandıktan sonra *ADAMTS4* geni mRNA ekspresyonu analiz edildi. HEK-293T hücrelerinde 0ng/ml doza göre 10ng/ml dozda anlamlı artış görülmezken OUMS-27 hücrelerinde en fazla 9.saatte olmak üzere (x20) zamana bağlı artış tespi edildi (Şekil 4.10).



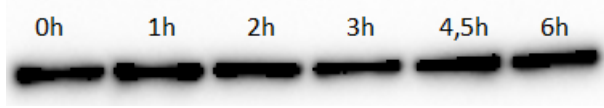
Şekil 4.10. OUMS-27 ve HEK293T hücre hattına, farklı sürelerde 10ng/ml konsantrasyonda hTNF α (Gibco®) uygulanması sonrasında ADAMTS4 geni mRNA ekspresyon düzeyi. Referans gen olarak β -aktin geni kullanıldı. Sonuçlar, referans gene göre normalize edildikten sonra 0. saate bölünerek nispi artışlar grafiğe döküldü.

4.2.2. Western Blot Sonuçları

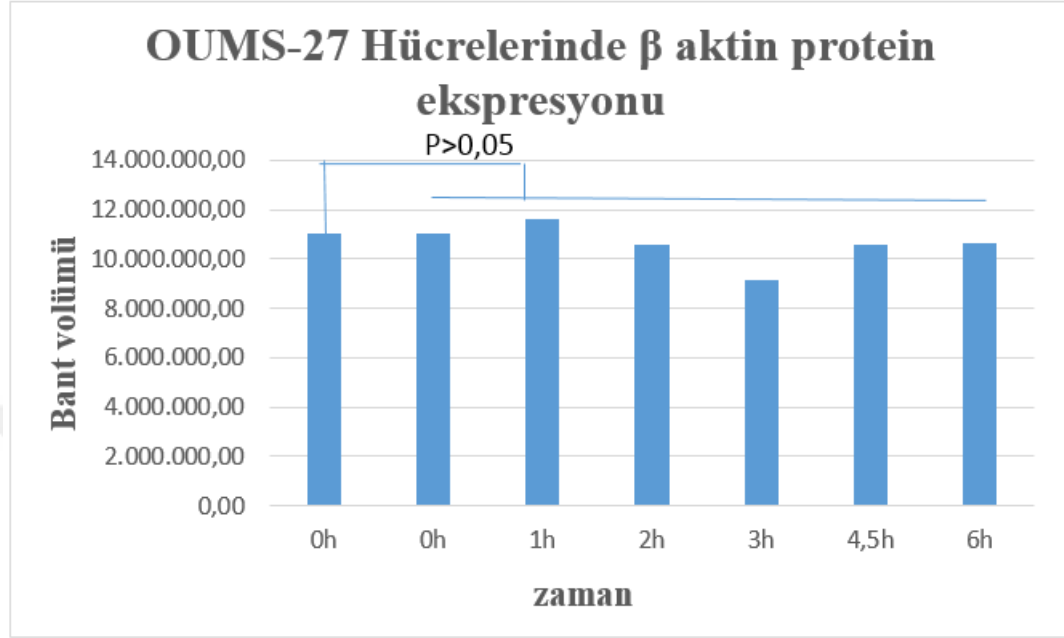
4.2.2.1. OUMS-27 Hücrelerinde TNF α Uygulaması ve β Aktin Proteinini Ekspresyon Analizi

Real time analizi ile OUMS-27 hücrelerinde TNF α ya yanıt olarak mRNA ekspresyonu artan *ADAMTS5* geninin protein düzeyinde değişimini araştırmak için western blot analizi yapıldı.

Protein analizlerinde de mRNA analizlerinde olduğu gibi, housekeeping gen olarak β aktin geni seçildi. OUMS-27 hücrelerinde, TNF α uygulanmasının ardından β aktin proteinini analiz edildi. Sıfırıncı saate göre istatistiksel olarak anlamlı artış tespit edilmedi (şekil 4.11).



a)

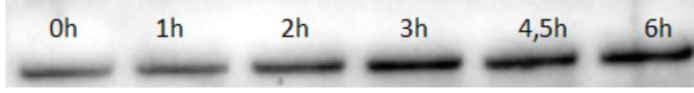


b)

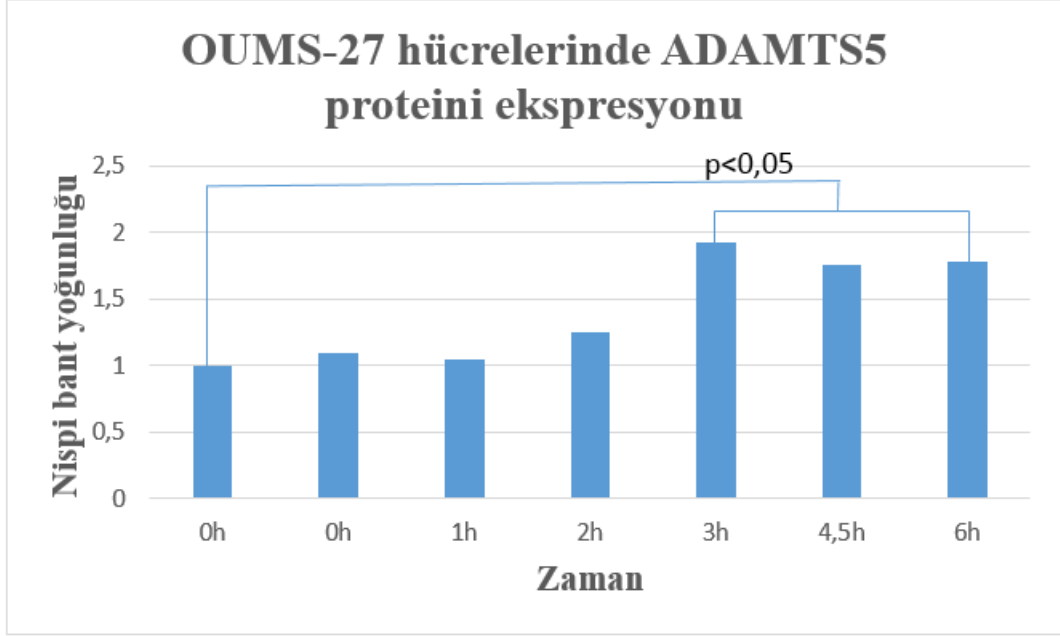
Şekil 4.11. a) OUMS-27 hücre hattına, farklı sürelerde 10ng/ml konsantrasyonda hTNF α (Gibco®) uygulanması sonrasında β aktin geni protein ekspresyonu western blot görüntüsü. b) western blot görüntüsünün grafiği.

4.2.2.2. OUMS-27 Hücrelerinde TNF α Uygulanması ve ADAMTS5 Proteinini Ekspresyon Analizi

OUMS-27 hücrelerinde, TNF α uygulanmasının ardından ADAMTS5 proteini analiz edildi. Real time sonuçlarını destekleyen, en fazla 3. saatte olmak üzere ($\times 1.8$), zamana bağlı artış tespit edildi (şekil 4.12).



a)

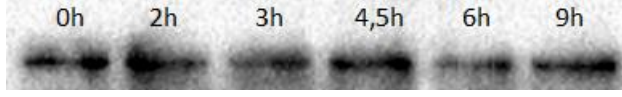


b)

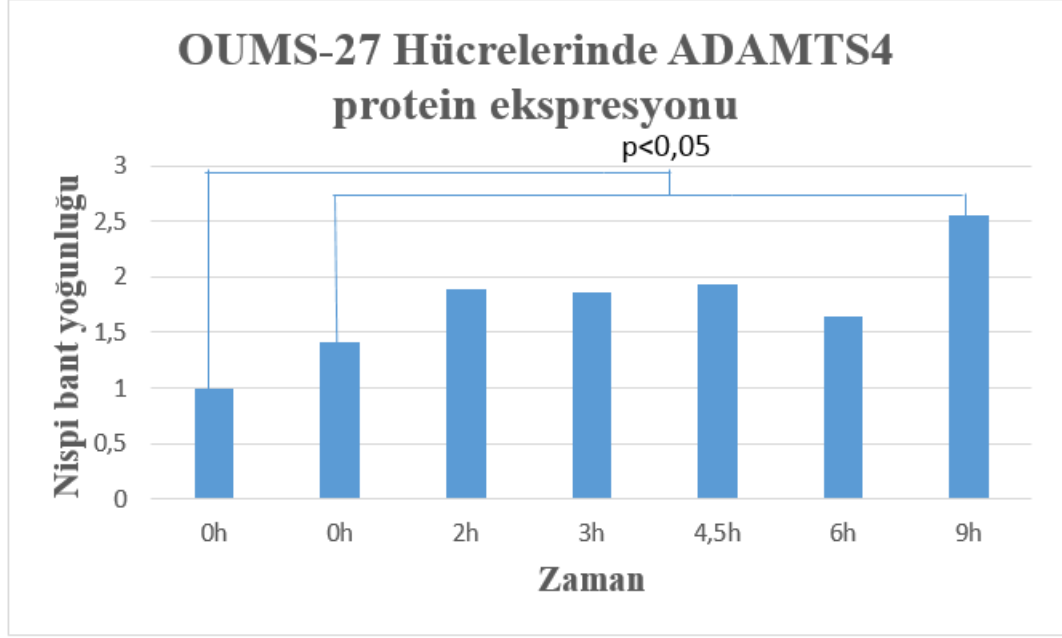
Şekil 4.12 a) OUMS-27 hücre hattına, farklı sürelerde 10ng/ml konsantrasyonda hTNF α (Gibco®) uygulanması sonrasında ADAMTS5 geni protein ekspresyonu western blot görüntüsü. b) Referans gen olarak β -aktin geni kullanıldı. Sonuçlar, referans gene göre normalize edildikten sonra 0. saate bölünerek nispi artışlar grafiğe döküldü.

4.2.2.3. OUMS-27 Hücrelerinde TNF α Uygulaması ve ADAMTS4 Proteini Ekspresyon Analizi

OUMS-27 hücrelerinde, TNF α uygulanmasının ardından ADAMTS4 proteini analiz edildi. Real time sonuçlarını destekleyen, en fazla 9. saatte olmak üzere (x2.6), zamana bağlı artış tespit edildi (şekil 4.13).



a)



b)

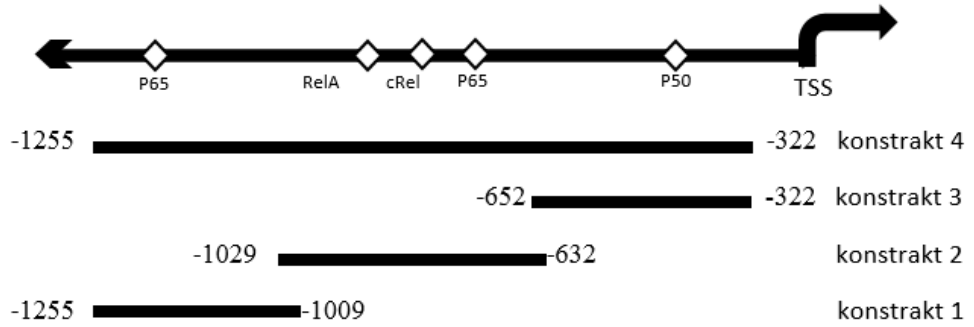
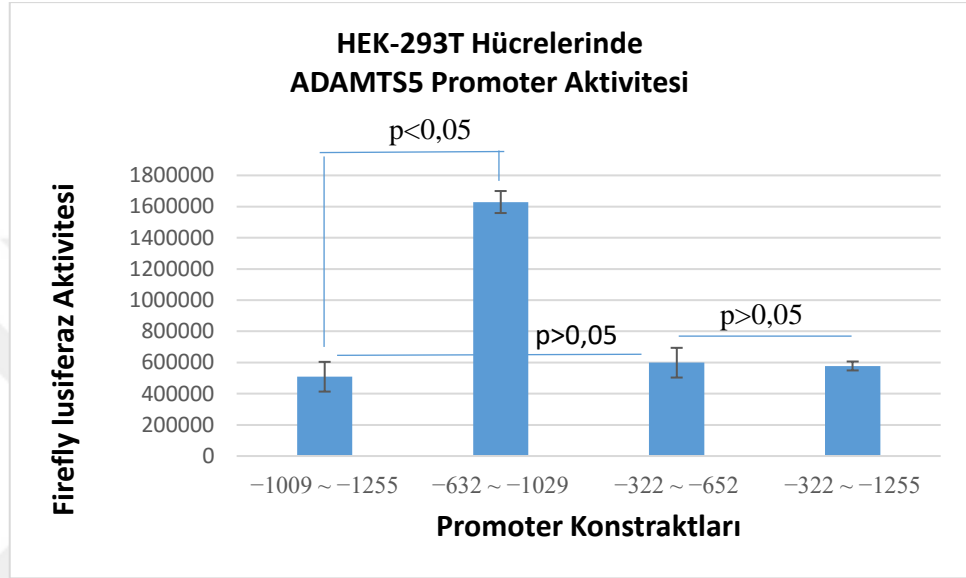
Şekil 4.13. a) OUMS-27 hücre hattına, farklı sürelerde 10ng/ml konsantrasyonda hTNF α (Gibco®) uygulanması sonrasında *ADAMTS4* geni protein ekspresyonu western blot görüntüsü. b) Referans gen olarak β -aktin geni kullanıldı. Sonuçlar, referans gene göre normalize edildikten sonra 0. saate bölünerek nispi artışlar grafiğe döküldü.

4.2.2.4. *ADAMTS5* Geni Promoter Bölgesi Plazmid Ekspresyon Konstraktlarının Lusiferaz Aktivitesi Sonuçları

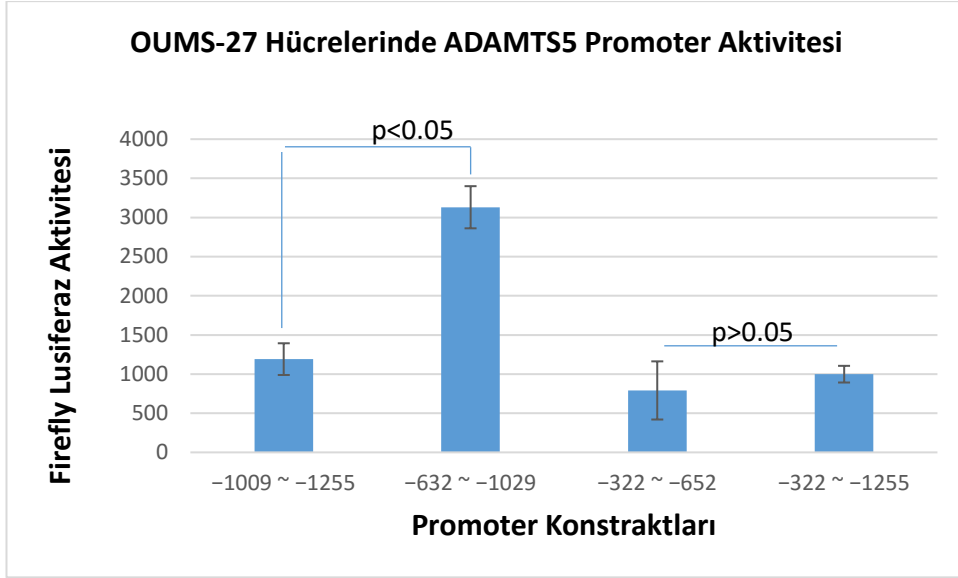
OUMS-27 hücrelerinde *ADAMTS5* geninin TNF α tarafından stimülasyonunu protein ve mRNA düzeyinde ortaya koyduktan sonra, *ADAMTS5* geni promoteri üzerinde saptanan NF κ B bağlanma bölgelerinin, TNF α uygulaması (10ng/ml) sonrası promoter aktivitesine etkisini araştırmak için, OUMS-27 ve HEK-293T hücrelerine *ADAMTS5* geni promoter bölgesi plazmid ekspresyon konstraktları transfekte edilerek lusiferaz deneyleri yapıldı.

4.3. HEK-293T ve OUMS-27 Hücrelerinde Lusiferaz Deney Sonuçları

HEK-293T ve OUMS-27 hücrelerinde, farklı sayıda NFκB bağlanma bölgeleri içeren dört ayrı konstraktan, en fazla aktivatör NFκB bağlanma bölgesi içeren ikinci konstrakt, diğer konstraktlara göre istatistiksel olarak anlamlı yüksek lusiferaz aktivitesi gösterdi. Diğer konstraktlar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark görülmedi. (şekil 4.14 ve 4.15)

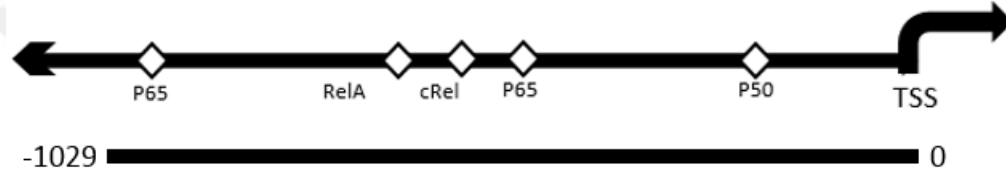
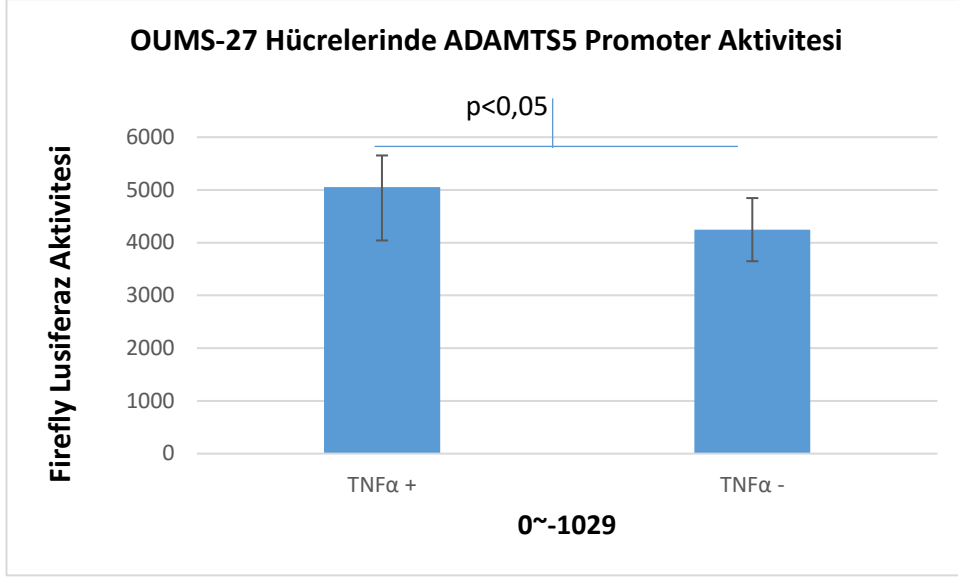


Şekil 4.14. Farklı uzunluklarda *ADAMTS5* geni promoter bölgesi konstraktları ile transfekte edilen HEK-293T hücre hattına, 10ng/ml konsantrasyonda hTNFα (Gibco®) uygulanması sonrasında *ADAMTS5* geni promoter bölgesi plazmid ekspresyon konstraktlarına ait lusiferaz aktivitesi.



Şekil 4.15. Farklı uzunluklarda *ADAMTS5* geni promoter bölgesi konstraktları ile transfekte edilen OUMS-27 hücre hattına, 10ng/ml konsantrasyonda hTNF α (Gibco®) uygulanması sonrasında *ADAMTS5* geni promoter bölgesi plazmid ekspresyon konstraktlarına ait lusiferaz aktivitesi.

Bu bulgulara göre en yüksek promoter aktivitesini gösteren promoter konstraktı, transkripsiyon start site (TSS) noktasından başlayarak tekrar klonlandı (0 ile -1029 arası). OUMS-27 hücrelerine transfekte edildikten sonra, TNF α uygulanan ve uygulanmayan gruplar karşılaştırıldı. TNF α uygulanan gruba uygulanmayan gruba göre istatistiksel olarak anlamlı yüksek promoter aktivitesi görüldü (şekil 4.16)



ADAMTS5 geni promoter bölgesine ait plazmid ekspresyon konstraktı

Şekil 4.16. *ADAMTS5* geni promoter bölgesi konstraktı ile transfekte edilen OUMS-27 hücre hattına, 10ng/ml konsantrasyonda hTNFα (Gibco®) uygulanan ve uygulanmayan hücrelerde, *ADAMTS5* geni promoter bölgesi plazmid ekspresyon konstraktına ait lusiferaz aktivitesi.

5. TARTIŞMA

OA, en sık karşılaşılan eklem hastalığı olması, ortalama yaşam süresinin uzamasıyla birlikte artan insidansı, eklem kırıkdağında geri dönüşümsüz hasara yol açması ve eklemi kaybeden hastaların proteze mahkum olması nedeniyle yaşam kalitesini etkileyen önemli bir hastalıktır. Ayrıca tedavi giderleri, ülke ekonomilerinde önemli bir yere sahiptir. Bu nedenle protez tedavileri yerine, medikal tedavilerin geliştirilebilmesi için hastalığın moleküler mekanizması araştırılmaktadır. Literatürde hastalığın patogenezini aydınlatmaya yönelik yapılan çalışmalarda, kırıkdağ yıkımında bazı katabolik enzimlerin rol oynadığı gösterilmiştir. Bu enzimlerin aktivitesinin azaltılmasının, tedavide kullanılabilir bir hedef olarak görülmesi, bilim adamlarını bu enzimlerin regülasyonunda görev alan moleküler mekanizmaları araştırmaya yönlendirmiştir. Kırıkdağ yıkımından sorumlu tutulan bu enzimler, matriks metalloproteazlar ve ADAMTS4 ve ADAMTS5 gibi ADAMTS ailesi üyeleridir. ADAMTS4 ve ADAMTS5, agrekan yıkımına daha spesifik olduğu için agrekanaz I ve agrekanaz II olarak isimlendirilmiştir. Agrekanaz enzimlerinin katabolik domainlerini içermeyen hayvan modellerinde, agrekan yıkımı azalmıştır. Ancak *ADAMTS5* geninde bu korunma daha fazla olduğu için, agrekan yıkımından primer sorumlu gen olarak nitelendirilmiştir (Little ve ark 2005, Song ve ark 2007).

Daha sonra bu genin regülasyonu ile ilgili yapılan çalışmalarda TNF α ve IL1 β gibi çeşitli inflamatuvar sitokinlerin süreci yönettiği ortaya konmuştur. Bu sitokinlerin içinde TNF α , kritik öneme sahiptir. Hem diğer inflamatuvar sitokinlerin üretimini uyarmakta, hem de katabolik enzimlerin stimülasyonunu sağlamaktadır (Goldring ve ark 2007). Yapılan çalışmalarda *ADAMTS5* geni ekspresyonunun TNF α tarafından stimüle edildiği gösterilmiştir (Seguin ve ark 2005, Tetsunaga ve ark 2011). Mevcut çalışmada da *ADAMTS5* geninin TNF α tarafından regülasyonu araştırıldı ve benzer şekilde ekspresyonun arttığı gösterildi. *ADAMTS5* geninin TNF α tarafından stimüle edildiğine dair çalışmaların yanında bazı çalışmalarda, *ADAMTS4* ün inflamatuvar sitokinlerle stimüle edildiği fakat *ADAMTS5* in konstitüsyonel olarak eksprese olduğu ve sitokin uyarısından etkilenmediği bildirilmiştir (Koshy ve ark 2002, Verma P ve Dalal K 2011). Bu çalışmalar ise bizim çalışmamızdan ve literatürdeki diğer

çalışmalardan farklı olarak normal kondrositler ile yapılmıştır. Hücre tipine, organizmaya ve hücrenin immortalizasyonuna bağlı olarak *ADAMTS5* geninin TNF α 'ya verdiği yanıt değişebilmektedir. Amanda ve ark (2008) nın yorumladığı üzere, literatürdeki bu çelişkiler, kullanılan hücre tipi ve seçilen model organizma ile ilişkilendirilebilir. Bizim çalışmamızda, OUMS-27 insan kondrosarkom hücre hattı ve HEK-293T insan embriyonik böbrek hücre hattı kullanıldı. OUMS-27 hücre hattında kontrol gen olarak kullandığımız TNF α 'nın hedef molekülü olduğu bilinen *I κ B α* ve *TNF α* geni her iki hücre hattında da TNF α 'ya yanıt olarak artan ekspresyon paterni gösterirken, *ADAMTS5* geni, OUMS-27 hücre hattında artmış, HEK-293T hücre hattında ise ekspresyon düzeyi değişmemiştir. Bu farklılığın, hücrelerin zigotta sonra farklılaşması sırasında genomlarının epigenetik olarak yeniden düzenlenmesi ve bazı genlerin ekspresyonlarının durdurulmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Giriş kısmında belirtildiği gibi NF κ B moleküllerinin gen transkripsiyonunu düzenlemede DNA'ya bağlanmasını sağlayan yardımcı proteinlerin varlığına ihtiyaç duyması ve bu yardımcı proteinlerin farklı hücre tipleri arasında farklı düzeylerde eksprese olması NF κ B tarafından genlerin regülasyonunu, hücre tipine spesifik hale getirmektedir.

Daha sonra yapılan çalışmalarda *ADAMTS5* geninin TNF α tarafından regülasyonu ile ilgili sinyal yolları araştırılmıştır. Wang ve ark (2011) nın yaptığı benzer bir çalışmada TNF α nın intervertebral disk kırıkdağında *ADAMTS5* geninin ekspresyonunu, sindekan-4 molekülü aracılığıyla artırdığını göstermiştir. Chen ve ark (2014) intervertebral disk kırıkdağında yaptıkları çalışmada, TNF α 'nın *ADAMTS5* geninin ekspresyonunu artırdığını ve yine aynı çalışmada TNF α 'nın etkisine NF κ B molekülünün aracılık ettiğini göstermiştir. Ancak, bu çalışmada kullanılan hücrelerin insan kondrositleri değil, sığır kondrositleri olması, çalışmanın insan OA modeli olmasında kısıtlılığa neden olmuştur. Bu nedenle bizim çalışmamızda, insan kökenli kondrosit hücreleri kullanılarak daha iyi bir OA modeli seçilmiştir. Bizim çalışmamızda da, NF κ B molekülünün, TNF α tarafından *ADAMTS5* geninin regülasyonundaki rolü araştırıldı ve bu regülasyona katkısı olduğu hem promoter düzeyinde, hem mRNA düzeyinde ve hem de protein düzeyinde tespit edildi. OUMS-27 hücrelerinde TNF α uygulamasının ardından *ADAMTS5* ve *NF κ B* genlerinin ekspresyonlarının birlikte artması, *ADAMTS5* geninin regülasyonuna katıldığı bir

göstergesi olarak yorumlanmaktadır. Hem OUMS-27 hücrelerinde, hem de HEK-293T hücrelerinde, TNF α uygulamasına yanıt olarak ekspresyonu artan genlerin, önce artan sonra azalan ve sonra tekrar artan bir ekspresyon paterni göstermesi ile ilgili olarak, hücrede reseptörüne bağlanan eksojen TNF α 'nın, ilk artıştan sorumlu olduğu, TNF α tarafından aktive edilen NF κ B'nin, endojen TNF α üretimini stimüle etmesi sonucu hücre tarafından üretilen TNF α 'nın da ikinci artıştan sorumlu olduğu düşünülmüştür. Ayrıca *ADAMTS5* geninin TNF α uygulamasının ardından OUMS-27 hücrelerinde protein düzeyinde de artış göstermesi real time bulgularını desteklemektedir. Benzer şekilde, OUMS-27 hücrelerinde, diğer agreganızı kodlayan *ADAMTS4* geni de, TNF α uygulamasının ardından mRNA ve protein düzeyinde artış göstermiştir. Bu bulgu da literatür ile uyumludur. Çalışmanın ikinci kısmında, OUMS-27 ve HEK-293T hücrelerinde *ADAMTS5* geni promoter analizinde 4 ayrı konstraktan, en fazla aktivatör NF κ B bağlanma bölgesi içeren konstrakt (insert 2) en yüksek lusiferaz aktivitesini göstermiştir. Bu sonuç, TF bağlanma bölgesi tahmin programı tarafından öngörülen bağlanma bölgelerinin doğru olabileceğini göstermektedir. Buna göre *ADAMTS5* geni promoter (-632) - (-1029) bölgesinde, olası NF κ B bağlanma bölgeleri olduğu söylenebilir. Tüm konstraktları kapsayan en büyük konstraktın (insert 4), en yüksek aktiviteyi gösteren insert 2'ye göre, azalmış lusiferaz aktivitesi göstermesi, aktivatör NF κ B bağlanma bölgeleri yanında, inhibitör NF κ B bağlanma bölgeleri (p50) de içermesine bağlı olabilir. Bu sonuç da, TF bağlanma bölgesi tahmin programının öngördüğü p50 bağlanma bölgesinin gerçekte bulunan bir tanıma bölgesi olabileceğini ortaya koymuştur. Bir adet aktivatör NF κ B bağlanma bölgesi içeren konstrakt (insert1) ile bir adet inhibitör NF κ B bağlanma bölgesi içeren konstrakt (insert3) arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olmaması, bu aktivatör NF κ B bağlanma bölgesinin gerçekte bulunmayan ve sadece NF κ B tanıma bölgelerine benzerlik gösteren bir sekans olabileceğini düşündürmüştür.

Promoter analizinde kullandığımız yöntem, in vivo fizyolojiye daha uygun olması nedeniyle, literatürde yapılan diğer promoter deneylerinden ayrılmaktadır. Örneğin, Kobayashi ve ark (2013) nın yaptığı çalışmadaki gibi promoter üzerinde TF araştırmalarında genelde, TF'nin overekspresyon vektörleri kullanılmıştır. Bu da, bir üst basamakta bu TF'yi uyaran sitokin (TNF, IL gibi) basamağını by-pass etmek olacağından, pathwaydeki üst ve alt basamaklar arası bağlantıyı ortaya

koyamamaktadır. Ayrıca, overekspresyon vektörleri fizyolojik dozun çok üzerinde olacağından gerçek hücre fizyolojisinden uzaklaşmaktadır. Diğer yandan, DNA üzerinde bağlanma bölgesi olmasa bile bazı TF'lerinin, özellikle de aynı aileye ait üyelerin tanıma bölgelerinde homoloji bulunabilir ki bu da aşırı dozda non-spesifik bağlanmalara ve yanlış pozitif sonuçlara neden olabilir. Bu bağlamda, çalışmamızda *ADAMTS5* genini içeren vektörle transfekte edilen hücrelerde, önce TNF α tarafından stimülasyon gerçekleştirilmiş, sonra da hücrenin buna yanıt olarak NF κ B üretmesi sağlanmıştır. Bu yönüyle, kullanılan prosedür, daha gerçekçi bir sonuç ortaya koymuştur. Bu sonuçlar ışığında, *ADAMTS5* geninin OUMS-27 hücre hattında TNF α tarafından NF κ B molekülü aracılığıyla ekspresyonunun artırıldığı ortaya koyuldu. Bu bulgu, literatürde yapılan diğer çalışmalardan bazıları ile uyumlu olmakla birlikte *ADAMTS5* geninin TNF tarafından regüle edilmediğini ortaya koyan çalışmalarla çelişmektedir. Bu nedenle *ADAMTS5* geni regülasyonu ile ilgili henüz net bir sonucun ortaya konulamaması ve konu ile ilgili çok kısıtlı çalışmanın olması bu sinyal yolağı ile ilgili yeni çalışmaların yapılması gerektiğini ortaya koymaktadır. Ayrıca, literatürde HEK-293T hücre hattında, *ADAMTS5* geninin ekspresyonu ve regülasyonu ile ilgili çalışma bulunmamaktadır. Mevcut çalışmada, kontrol hücre hattı olarak seçtiğimiz HEK-293T hücrelerinde TNF α 'ya yanıt olarak hem *TNF α* geni hem de *I κ B* geni ekspresyonunun, mRNA düzeyinde stimüle olduğu gösterilmiştir. Buna karşılık *ADAMTS5* geni ekspresyonu TNF α 'dan etkilenmemiştir. Bu yönüyle de çalışmamız, literatüre yeni bir bilgi kazandırmıştır ve yukarıda da bahsettiğimiz gibi genlerin ekspresyonlarının düzenlenmesinde rol oynayan TF'lerinin hücre tipine göre selektif davrandığını bir kez daha ortaya koymuştur. Mevcut çalışmamızda, OUMS-27 hücrelerinde, *ADAMTS5* geninin TNF α tarafından regülasyonunun araştırılması ve TNF α , *ADAMTS5* ve NF κ B arası regülasyonun incelenmesi literatürde bir ilk teşkil etmektedir. Bu bulgular, OA patogeneğinde TNF α ve NF κ B moleküllerinin rolünü ortaya koymaktadır. Ayrıca OA tedavisinde, *ADAMTS5* genine yönelik tedavi prosedürlerinde, TNF α ve NF κ B moleküllerinin hedef alınması gerektiğini göstermektedir. Ancak, bu sonuçların yeni çalışmalarla desteklenmesi ve hipotezin güçlendirilmesi gerekmektedir.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Literatürde, OA patogenezi aydınlatmaya yönelik yapılan çalışmalarda sorumlu bulunan *ADAMTS5* geninin regülasyonunda görevli olabileceği gösterilen TNF α ve onun etkilerine aracılık eden NF κ B molekülünün, *ADAMTS5* geni üzerindeki etkilerinin araştırıldığı bu çalışmada, TNF α 'nın, *ADAMTS5* geni ekspresyonunu NF κ B molekülü aracılığıyla artırdığı gösterilmiştir. Bu sonuç, hem protein, hem RNA, hem de promoter düzeyinde gösterildi. Ancak, literatürde *ADAMTS5* geni regülasyonu ile ilgili henüz az sayıda çalışmanın olması nedeniyle mevcut bulguları destekleyen ve *ADAMTS5* geninin TNF α tarafından regülasyonunu araştıran yeni çalışmalara ihtiyaç vardır. Ayrıca, mevcut çalışmada elde edilen bulgular, *in vivo* çalışmalarla da desteklenmelidir. *ADAMTS5* geni regülasyonu net olarak aydınlatıldığında OA hastalığı için yeni tedavi yöntemleri de gündeme gelebilecektir.

7. KAYNAKLAR

- Amanda JF, Fraser MR, Charlotte JE, Heather S: ADAMTS-5: The story so far. *European Cells and Materials*. 2008, 15:11-26.
- Anita EW, Cate B, Lombard, FM Cicuttini: Tackling obesity in knee osteoarthritis. 2013, doi:10.1038/nrrheum.2012.224.
- Apte SS: A disintegrin-like and metalloprotease (reprolysin-type) with thrombospondin type 1 motif (ADAMTS) superfamily: functions and mechanisms. *J Biol Chem*. 2009, 284(46):31493–7.
- Baker RG, Hayden MS, Ghosh S: NF-kappaB, inflammation, and metabolic disease. *Cell Metab*. 2011, 13:11–22.
- Beutler B, Greenwald D, Hulmes JD, Chang M, Pan YC, Mathison J, et al: Identity of tumour necrosis factor and the macrophage-secreted factor cachectin. *Nature*. 1985, 316:552–4.
- Bodur H: Dünyada ve türkiye’de osteoartrite güncel bakış; epidemiyoloji ve sosyoekonomik boyut. *Turkish Journal Of Geriatrics*. 2011, 1: (7-14).
- Bondeson J, Browne KA, Brennan FM, Foxwell BM, Feldmann M: Selective regulation of cytokine induction by adenoviral gene transfer of I κ B α into human macrophages: lipopolysaccharide-induced, but not zymosan-induced, proinflammatory cytokines are inhibited, but IL-10 is NF κ B independent. *J Immunol*. 1999, 162: 2939–45.
- Brown K, Park S, Kanno T, Franzoso G, Siebenlist U: Mutual regulation of the transcriptional activator NF-kappa B and its inhibitor, I kappa B-alpha. *Proc Natl Acad Sci*. 1993, 90:2532–6.
- Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, Green S, Fiore N, Williamson B: An endotoxin induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci*. 1975, 72:3666–70. Haydena MS,
- Chen S , Huang Y, Zhou ZJ, Hu ZJ , Wang JY, Xu WB, Fang XO, Fan SW: Upregulation of Tumor Necrosis Factor α and ADAMTS-5, But Not ADAMTS-4, in Human Intervertebral Cartilage Endplate With Modic Changes. *Spine*. 2014, doi: 10.1097/BRS.0000000000000362.
- Chiusaroli R, Visentini M, Galimberti C, Casseler C, Mennuni L, Covaceuszach S, Lanza M, Ugolini G, Caselli G, Rovati LC, Visintin M: Targeting of ADAMTS5’s ancillary domain with the recombinant mAb CRB0017 ameliorates disease progression in a spontaneous murine model of osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage*. 2013, 1807-1810.
- Chu W: Tumor necrosis factor. *Cancer Lett*. 2013,328:222–225
- Clark ME, Kelner GS, Turbeville LA, Boyer A, Arden KC, Maki RA: ADAMTS9, a novel member of the ADAM-TS/metallospodin gene family. *Genomics*. 2000, doi:10.1006/geno.2000.6246.
- Courtois G, Gilmore TD: 2006. Mutations in the NF-kB signaling pathway: Implications for human disease. *Oncogene* 25: 6831–6843.
- Dancevic CM ve McCulloch DR: Current and emerging therapeutic strategies for preventing inflammation and aggrecanase mediated cartilage destruction in arthritis. *Arthritis Research & Therapy*. 2014, 16:429.
- Elliott MJ, Maini RN, Feldmann M, Long-Fox A, Charles P, Bijl H, et al: Repeated therapy with monoclonal antibody to tumour necrosis factor alpha (cA2) in patients with rheumatoid arthritis. *Lancet*. 1994, 344:1125–7.
- Gao G, Westling J, Thompson VP, Howell TD, Gottschall PE, Sandy JD: Activation of the proteolytic activity of ADAMTS4 (aggrecanase-1) by C-terminal truncation. *J Biol Chem*. 2002, doi: 10.1074/jbc.M107443200.

- Ghosh S: Regulation of NF- κ B by TNF family cytokines. *Seminars in Immunology*. 2014, <http://dx.doi.org/10.1016/j.smim.2014.05.004>.
- Glasson S, Askew R, Sheppard B, Carito BA, Blanchet T, Ma HL, et al: Characterization of and osteoarthritis susceptibility in ADAMTS-4-knockout mice. *Arthritis Rheum*. 2004, doi: 10.1002/art.20558.
- Glasson S, Askew R, Sheppard B, Carito B, Blanchet T, Ma H, et al: Deletion of active ADAMTS5 prevents cartilage degradation in a murine model of osteoarthritis. *Nature* 2005, 434:644–8.
- Goldring MB and Goldring SR: Osteoarthritis. *J Cell Physiol*. 2007, 213: 626–634.
- Guilak F, Fermor B, Keefe FJ, Kraus VB, Olson SA, Pisetsky DS, Setton LA, Weinberg JB: The role of biomechanics and inflammation in cartilage injury and repair. *Clinical Orthopaedics And Related Research*. 2004, 423: 17–26.
- Hayden MS, Ghosh S: Signaling to NF- κ B. *Genes Dev*. 2004, 18: 2195–2224.
- Hayden MS, West AP, Ghosh S: NF- κ B and the immune response. *Oncogene*. 2006, 25: 6758–6780.
- Hurskainen TL, Hirohata S, Seldin MF, Apte SS: ADAM-TS5, ADAM-TS6, and ADAM-TS7, novel members of a new family of zinc metalloproteases. General features and genomic distribution of the ADAM-TS family. *J Biol Chem*. 1999, doi: 10.1074/jbc.274.36.25555.
- Jan Bondeson, Arjen B. Blom, Wainwright S, Hughes C, Caterson B, Berg W B: The Role of Synovial Macrophages and Macrophage-Produced Mediators in Driving Inflammatory and Destructive Responses in Osteoarthritis. *Arthritis & Rheumatism*, 2010, DOI 10.1002/art.27290
- Kobayashi H, Hirata M, Saito T, Itoh S, Chung U, Kawaguchi H: Transcriptional induction of ADAMTS5 protein by nuclear factor- κ B (NF- κ B) family member RelA/p65 in chondrocytes during osteoarthritis development. *J. Biol. Chem*. 2013, doi: 10.1074/jbc.M113.452169.
- Koshy PJT, Lundy CJ, Rowan AD, Porter S, Edwards DR, Hogan A, Clark IM, Cawston TE: The modulation of matrix metalloproteinase and ADAM gene expression in human chondrocytes by interleukin-1 and oncostatin M: A time-course study using real-time quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction. *Arthritis Rheum*. 2002, 46:961–967.
- Kristjánsson B, Honsawek S: Current perspectives in mesenchymal stem cell therapies for osteoarthritis. *Stem Cells Int*. 2014, doi:10.1155/2014/194318.
- Kuno K, Kanada N, Nakashima E, Fujiki F, Ichimura F, Matsushima K: Molecular cloning of a gene encoding a new type of metalloproteinase-disintegrin family protein with thrombospondin motifs as an inflammation associated gene. *J Biol Chem*. 1997, 272(1):556–62.
- Li Z, Xu SF, Li DC, Sun Z, Zhang T, Lu JX, Wang Z: Composite artificial semi-knee joint system. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci*. 2014, 18:1229–1240.
- Little CB, Mittaz L, Belluoccio D, Rogerson FM, Campbell IK, Meeker CT, et al: ADAMTS-1-knockout mice do not exhibit abnormalities in aggrecan turnover in vitro or in vivo. *Arthritis Rheum*. 2005, 52:1461–72.
- Lynne C Tetlow, David E Woolley: Mast cells, cytokines, and metalloproteinases at the rheumatoid lesion: dual immunolocalisation studies. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 1995, 54: 896–903
- Mankin HJ, Lipiello L: Biochemical and metabolic abnormalities in articular cartilage from osteoarthritic human hips. *J Bone Joint Surg*. 1970, 52:210–15.
- Mary b. Goldring and Steven r. Goldring: Osteoarthritis. *J. Cell. Physiol*. 2007, 213: 626–634.

- Oeckinghaus A, Ghosh S: The NF- κ B family of transcription factors and its regulation. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2009, doi: 10.1101/cshperspect.a000034.
- Paula Borden, Deborah Solymar, Anita Sucharczuk, Brian Lindman, Paul Cannon, and Renu A. Heller: Cytokine control of interstitial collagenase and collagenase-3 gene expression in human chondrocytes. *J Biol Chem.* 1996, 271:23577–81.
- Qvist P, Bay-Jensen AC, Christiansen C, Dam BE, Pastoreau P, Karsdal MA: The disease modifying osteoarthritis drug (DMOAD): is it on the horizon? *Pharmacol Res.* 2008, 58:1–7.
- Roy D. Altman, Carlos J. Lozada: Weinblatt Osteoartrit ve ilişkili bozukluklar. In: Michael H Weisman, Michael E. Rheumatology. 4.th ed. Ankara, Rotatıp Kitabevi, 2011, 1701
- Seguin CA, Pilliar RM, Roughley PJ, Kandel RA: Tumor necrosis factor α modulates matrix production and catabolism in nucleus pulposus tissue *Spine.* 2005, DOI: 10.1097/01.brs.0000176188.40263.f9.
- Sen R, Baltimore D: Inducibility of κ immunoglobulin enhancer-binding protein Nf- κ B by a posttranslational mechanism. *Cell.* 1986, 47: 921–928.
- Sen R, Smale ST: Selectivity of the NF- κ B response. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2010, 2:a000257
- Shakhov AN, Martine A, Vassalli, PC, Nedospasov SA, Jongeneel CV: κ btype enhancers are involved in lipopolysaccharide-mediated transcriptional activation of the tumor necrosis factor α gene in primary macrophages. *J. Exp. MED.* 1990, 171: 35-47.
- Song RH, Tortorella MD, Malfait AM, Alston JT, Yang Z, Arner EC, Griggs DW: Aggrecan degradation in human articular cartilage explants is mediated by both ADAMTS-4 and ADAMTS-5. *Arthritis Rheum.* 2007, 56:575–585.
- Sun Y, Huang J, Yang Z: The roles of ADAMTS in angiogenesis and cancer. *Tumor. Biol.* 2015, doi: 10.1007/s13277-015-3461-8.
- Tetsunaga T, Nishida K, Furumatsu T, Naruse K, Hirohata S, Yoshida A y, Saito T, Ozaki T: Regulation of mechanical stress-induced MMP-13 and ADAMTS-5 expression by RUNX-2 transcriptional factor in SW1353 chondrocyte-like cells. *Osteoarthritis and Cartilage* 2011, 19:222 232.
- Tortorella MD, Liu RQ, Burn T, Newton RC, Arner E: Characterization of human aggrecanase 2 (ADAM-TS5): substrate specificity studies in comparison with aggrecanase 1 (ADAM-TS4). *Matrix Biol* 2002, doi:10.1016/S0945-053X(02)00069-0.
- Tortorella MD, Malfait A M, Deccico C, Arner E: The role of ADAM-TS4 (aggrecanase-1) and ADAM-TS5 (aggrecanase-2) in a model of cartilage degradation. *Osteoarthritis and Cartilage.* 2001, doi: 10.1053/joca.2001.0427.
- Tortorella MD, Pratta M, Liu RQ, Austin J, Ross OH, Abbaszade I, et al: Sites of aggrecan cleavage by recombinant human aggrecanase-1 (ADAMTS-4). *J Biol Chem* 2000, 275:18566–73.
- Tracey KJ, Fong Y, Hesse DG, Manogue KR, Lee AT, Kuo GC, et al: Anticachectin/ TNF monoclonal antibodies prevent septic shock during lethal bacteraemia. *Nature.* 1987, 330:662–4.
- Tsushima H, Okazaki K, Hayashida M, Ushijima T, Iwamoto Y: CCAAT/enhancer binding protein β regulates expression of matrix metalloproteinase-3 in arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2012, doi: 10.1136/annrheumdis-2011-200061.
- Vandenabeele P, Declercq W, Beyaert R, Fiers W: Two tumour necrosis factor receptors: structure and function. *Trends Cell Biol.* 1995, 5:392–9.

Verhelst K, Carpentier I, Beyaert R: Regulation of TNF-induced NF- κ B activation by different cytoplasmic ubiquitination events. *Cytokine & Growth Factor Reviews*. 2011, 22: 277–286

Verma P, Dalal K: ADAMTS-4 and ADAMTS-5: Key Enzymes in Osteoarthritis. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2011, 112:3507–3514.

Walker PS, Yildirim G, Arno S, Heller Y: Future directions in knee replacement. *Proc. Inst. Mech. Eng. H*. 2010, 224, 393–414.

Wang J , Markova D , Anderson DG , et al: TNF-alpha and IL-1beta promote a disintegrin-like and metalloprotease with thrombospondin type I motif-5-mediated aggrecan degradation through syndecan- 4 in intervertebral disc . *J Biol Chem*. 2011, 286 : 39738 – 49.

Williams RO, Feldmann M, Maini RN: Anti-tumor necrosis factor ameliorates joint disease in murine collagen-induced arthritis. *Proc Natl Acad Sci*. 1992, 89:9784–8.



8. ÖZET

T.C.

SELÇUK ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

ADAMTS AGREKAZLARIN KONDROSİTLERDEKİ BİYOLOJİK ROLLERİ VE KLİNİK UYGULAMA POTANSİYELLERİ

Dilek GÜN BİLGİÇ

Tıbbi Genetik Anabilim Dalı

TIPTA UZMANLIK TEZİ / Konya, 2015

Osteoartrit, eklem kıkırdağının yük binen kısımlarında kıkırdakta hasarlanma, eklem çevresinde yeni kemik oluşumu ve sinovitis ile karakterize dejeneratif bir eklem hastalığıdır. Tutulan eklemdede, ağrı ve deformiteye yol açmaktadır. OA tedavisinde, ağrı kesici ilaçlar ilk basamak tedavidir. Son evrede ise hastalar eklemlerini kaybederek, protez ameliyatı ile tedavi edilmektedir. OA'nın sebebi henüz bilinmemektedir. Yaşlanma, obezite, travma gibi dış nedenler yanında genetik yatkınlık da suçlanmaktadır. Bugüne kadar yapılan çalışmalarda, kıkırdak yıkımına neden olan katabolik enzimlerle ilgili birçok veriye ulaşılmıştır. Bu enzimler, matriks metalloproteaz ailesi ve ADAMTS ailesi üyeleri olmakla birlikte, ADAMTS5 enzimi kıkırdağa daha spesifiktir. ADAMTS5 geninin kıkırdak dokusunda regülasyonu ile ilgili çalışmalar, OA patogenezini konu alan çalışmaların yeni odağı haline gelmiştir. Bugüne kadar yapılan çalışmalarda, inflamatuvar sitokinlerin, ADAMTS5 genini stimüle ederek kıkırdak hasarını artırdığı belirtilmiştir. Bu sitokinlerin başında, TNF α gelmektedir. TNF α 'nın hangi aracı moleküllerle, bu geni regüle ettiği araştırılmaktadır. TNF α 'nın, hedef moleküllerinden biri olan NF κ B, bu bağlamda araştırılmaktadır. Bu çalışmada, ADAMTS5 geninin, kondrositlerde, TNF α tarafından regülasyonu ve NF κ B'nin bu regülasyondaki rolü araştırıldı. Kondrosit hücreleri ve kontrol hücrelerinde, TNF α uygulanarak, TNF α 'nın bilinen hedef molekülleri olan TNF α ve I κ B genleri ve ADAMTS5 geni ekspresyonları, RNA düzeyinde real time PZR ve protein düzeyinde western blot tekniği ile araştırıldı. Daha sonra, TF bağlanma bölgesi tahmin programıyla, ADAMTS5 geni promoteri üzerinde NF κ B için bağlanma bölgeleri tespit edildi. Bu bölgeleri içeren ADAMTS5 geni promoter delesyon konstraktları oluşturularak plazmid ekspresyon vektörlerine klonlandı. OUMS-27 ve HEK-293T hücrelerine transfekte edildi. TNF α tarafından uyarılan bu hücrelerde, ADAMTS5 geni promoteri aktivitesi, lusiferaz deneyleriyle araştırıldı. Deneyler sonucunda, OUMS-27 hücrelerinde, TNF α uygulanmasının ardından, ADAMTS5 geni, mRNA ve protein düzeyinde aktive oldu. Lusiferaz deney sonucunda da aktivatör NF κ B bölge sayısı en fazla olan ADAMTS5 geni promoter konstraktı en yüksek

aktiviteyi gösterdi. TNF α uygulanması, bu konstraktın aktivitesini daha da artırdı. Bu sonuçlara göre, OUMS-27 hücrelerinde, TNF α , NF κ B aracılığıyla, ADAMTS5 genini stimüle etmektedir. Ancak, kontrol hücre grubu olan Hek-293T de ADAMTS5 geni ekspresyonu, TNF α dan etkilenmemektedir.

Anahtar Sözcükler: ADAMTS5; Hek-293T; NF κ B; OUMS-27; TNF α .



9. SUMMARY

THE BIOLOGICAL ROLES OF ADAMTS AGGREGANASES IN CHONDROCYTES AND POTENTIAL OF CLINICAL APPLICATIONS

Osteoarthritis is a degenerative joint disease characterized by damage in the joints cartilage's load bearing part, new bone formation around the joint and synovitis. It leads to pain and deformity in the involved joint. Pain medications are the first line therapy in OA. In the last stage of the disease, patients lose their joints and are treated with prosthesis operation. The cause of OA is not known yet. Genetic predisposition is also charged in addition to external causes such as aging, obesity and trauma. In studies to date, it has reached a lot of data about the catabolic enzymes that cause cartilage destruction. These enzymes are the family of matrix metalloproteinases and ADAMTS family members, but ADAMTS5 enzyme is more specific for cartilage. Recently, the studies related to ADAMTS5 gene regulation in the cartilage has become a focus of study in OA pathogenesis subject area. In the studies to date, it is reported that, inflammatory cytokines, increase cartilage damage by stimulating ADAMTS5 gene. One of the most important cytokine is TNF α among these. By which molecule, the TNF α regulates this gene is being investigated. In this context, NF κ B, one of the target molecule of TNF α is being investigated. In this study, regulation of the ADAMTS5 gene in chondrocytes by TNF α and the role of NF κ B in this regulation is investigated. For this, chondrocyte cells and the control cells were treated with the TNF α and the expression of TNF α and I κ B genes that are known target molecules of TNF α and ADAMTS5 gene expression were investigated by the real time PCR in the RNA level and by western blot technique in the protein level. Then, binding sites for NF κ B on ADAMTS5 promoter were detected by the program estimates the binding sites of transcription factors. ADAMTS5 gene promoter deletion constructs that containing these regions formed and cloned into the expression vector and transfected to OUMS-27 and HEK-293T cells. In these cells induced by TNF α , ADAMTS5 gene promoter activity was examined by luciferase assay. As a result of experiments, in the OUMS-27 cells, following administration of TNF α , ADAMTS5 gene was activated in mRNA and protein level. In the luciferase assay result, the ADAMTS5 gene promoter construct that has the highest number of activator NF κ B binding sites showed the highest activity. This construct's activity, further increased after implementation of the TNF α . According to these results, TNF α stimulates the ADAMTS5 gene via NF κ B in OUMS-27 cells. However, in the control group of cells HEK-293T, the ADAMTS5 gene expression is unaffected by TNF α .

Key Words: ADAMTS5; Hek-293T; NF κ B; OUMS-27; TNF α .

Ek-1**Tablo 2.1. Kullanılan kimyasalların ve üretici firmaların listesi**

Kimyasallar	Üretici
DMEM Medyum	HyClone
FBS (Fötal Bovin Serum)	HyClone
L-Glutamin	HyClone
Penicillin/Streptomycin	HyClone
PBS (Phosphate Buffered Saline)	HyClone
Plazmosin	InvivoGen
DMSO (Dimetilsulfoksid)	Fisher Scientific
Etidyum Bromür	Merck, Germany
Depc Treated Water	Sigma, Germany
Izopropanol	Sigma, Germany
Etanol	Merck, Germany
Metanol	Sigma, Germany
Kloroform	Merck, Germany
Ksilen	Merck, Germany
İzoamil Alkol	Merck, Germany
N, N-Metilen Bisakrilamid	Fluka, Schweiz
Merkaptoetanol	Invitrogen, Germany
Amonyum persülfat (APS)	Sigma, Germany
Skim Milk Powder	Fluka, Schweiz
TAE (Tris/Asetik Asit/EDTA)	Sigma, Germany
Agaroz	Invitrogen, Germany
SDS (Sodyum Dodesil Sülfat)	Sigma, Germany
TEMED	BIO-RAD
Tripan Blue	BIO-RAD
Tripsin 0,25%	HyClone
Glycine	Sigma, Germany
Gliserol	Fisher Scientific
Trizol	Invitrogen, Germany
Opti-MEM	Life Technologies
Western ECL Solüsyon	BIO-RAD
TransPass™ D2 Transfection Reagent	NEB
PCR Enzimleri ve master miksleri	Thermo Scientific
Restriksiyon Enzimleri ve buffer ları	New England Biolabs

Ek-2**Tablo 2.2. Kullanılan Cihazlar ve Üretici Firmaları**

Cihazlar	Üretici
İnkübatör	Sanyo
mikroskop	Leica
Heat Block	Techne, UK
Azot Saklama Tankı	Air
-80°C Dondurucu	Sanyo

Tablo 2.2. Kullanılan Cihazlar ve	Üretici Firmaları (devam)
-20°C Dondurucu	Bosch
Hücre Sayım Cihazı	BIO-RAD
Tablo 2.2. (devam) Kullanılan Cihazlar ve	Üretici Firmaları
Santrifüj	Hettich Rotina, Germany
Katı ve Sıvı Otoklav	Nüve SteamArt
Su Banyosu	Nüve
Ph metre	Hanna
Hassas Terazi	Shimadzu, Japan
Jel Elektroferez Sistemi	Thermo Scientific, USA
Mikrodalga Fırını	Samsung, Korea
UV Translüminatör	Herolab, Germany
Steril Hücre Kültürü Kabini	Thermo BioSafety Cabinet Class II
Manyetik Karıştırıcı	Cleaver Scientific
Elektroferez Sistemi	VWR Galaxy Ministar, Korea
Sonikasyon Cihazı	Diagenode
Western Transfer Cihazı	Thermo Scientific
Biospec-nano Spektrofotometre	Shimadzu, Japan
Orbital Shaker	VWR
Buz Makinası	Scotsman IL, USA
Etüv	Nüve
Thermal Cycler	BIO-RAD
Real-Time PCR cihazı	QIAGEN
Kriyo Tüp	Thermo Scientific
Hücre Kültür Flaskı	Thermo Scientific
Santrifüj Tüpleri (15ml-50ml)	Thermo Scientific
Santrifüj Tüpleri (0.5ml-2ml)	NEPTUNE
Serolojik Pipet	SARSTEDT
Spreader	Greiner, Germany
Well Plate (6-12-24)	Thermo Scientific
Petri	Nunclon
Hücre Sayım Lamı	BIO-RAD
Pipet Ucu	NEPTUNE
PVDF Transfer Mebran	Thermo Scientific
Western Görüntüleme Cihazı	BIO-RAD ChemiDoc MP
Pipet Tabancası	Thermo Scientific
Otomatik Pipetler	Gilson Pipetman

ÖZGEÇMİŞ

Kimlik Bilgileri

Adı Soyadı: Dilek GÜN BİLGİÇ
Doğum Yeri: K. Maraş
Medeni Hali: Evli
E-Posta: dilekgun@selcuk.edu.tr
Adresi: Selçuk Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı
Konya

Eğitim

Lise: Selçuklu Anadolu Lisesi
Lisans: Selçuk Üniversitesi, Tıp fakültesi
Uzmanlık: Selçuk Üniversitesi, Tıp fakültesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı

Yabancı Dil

İngilizce

Katıldığı Kongreler

European Human Genetics Conference, 2012
10. Ulusal Tıbbi Genetik Kongresi, 2012
2. Nörometabolik Dismorfoloji Sempozyumu, 2013