

**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**PERİODONTİTİSE YATKINLIKTA ROL OYNADIĞI DÜŞÜNÜLEN *RSPO4* GENİNE
AİT PUTATİF BİR DÜZENLEYİCİ BÖLGENİN GEN İFADESİNİ HIZLANDIRICI
ETKİSİNİN GÖSTERİLMESİ**

Hüseyin Gencay KEÇELİ

**Tıbbi Biyoloji programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

ANKARA

2023

**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**PERİODONTİTİSE YATKINLIKTA ROL OYNADIĞI DÜŞÜNÜLEN *RSPO4* GENİNE
AİT PUTATİF BİR DÜZENLEYİCİ BÖLGENİN GEN İFADESİNİ HIZLANDIRICI
ETKİSİNİN GÖSTERİLMESİ**

Hüseyin Gencay KEÇELİ

**Tıbbi Biyoloji programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

ANKARA

2023

ONAY SAYFASI

YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe Üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanılması zorunlu metinlerin yazılı izin alınarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim. Yükseköğretim Kurulu tarafından yayınlanan "**Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge**" kapsamında tezim aşağıda belirtilen koşullar haricince YÖK Ulusal Tez Merkezi / H.Ü. Kütüphaneleri Açık Erişim Sisteminde erişime açılır.

o Enstitü / Fakülte yönetim kurulu kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 2 yıl ertelenmiştir. ⁽¹⁾

o Enstitü / Fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren ... ay ertelenmiştir. ⁽²⁾

o Tezimle ilgili gizlilik kararı verilmiştir. ⁽³⁾

12/06/2023

H. Gencay Keçeli

¹"Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge"

(1) Madde 6.1 Lisansüstü teze ilgili patent başvurusu yapılması veya patent alma sürecinin devam etmesi durumunda, tez **danışmanın** önerisi ve **enstitü anabilim dalmın** uygun görüşü üzerine **enstitü** veya **fakülte yönetim kurulu** iki yıl süre ile tezin erişime açılmasının ertelenmesine karar verebilir.

(2) Madde 6. 2. Yeni teknik, materyal ve metotların kullanıldığı, henüz makaleye dönüşmemiş veya patent gibi yöntemlerle korunmamış ve internette paylaşılması durumunda 3. şahıslara veya kurumlara haksız kazanç imkanı oluşturabilecek bilgi ve bulguları içeren tezler hakkında tez **danışmanın** önerisi ve **enstitü anabilim dalmın** uygun görüşü üzerine **enstitü** veya **fakülte yönetim kurulunun** gerekçeli kararı ile altı ayı aşmamak üzere tezin erişime açılması engellenebilir.

(3) Madde 7. 1. Ulusal çıkarları veya güvenliği ilgilendiren, emniyet, istihbarat, savunma ve güvenlik, sağlık vb. konulara ilişkin lisansüstü tezlerle ilgili gizlilik kararı, **tezin yapıldığı kurum** tarafından verilir *. Kurum ve kuruluşlarla yapılan işbirliği protokolü çerçevesinde hazırlanan lisansüstü tezlere ilişkin gizlilik kararı ise, **ilgili kurum ve kuruluşun önerisi** ile **enstitü** veya **fakültenin** uygun görüşü üzerine **üniversite yönetim kurulu** tarafından verilir. Gizlilik kararı verilen tezler Yükseköğretim Kuruluna bildirilir.

* Tez **danışmanın** önerisi ve **enstitü anabilim dalmın** uygun görüşü üzerine **enstitü** veya **fakülte yönetim kurulu** tarafından karar verilir.

ETİK BEYAN

Bu çalışmadaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında özgün olduğunu, Prof. Dr. Pervin Rukiye Dinçer danışmanlığında tarafımdan üretildiğini ve Hacettepe Üniversitesi Türkiyat Araştırmaları Enstitüsü Tez Yazım Yönergesine göre yazıldığımı beyan ederim.

12/06/2023

H. Gencay Keçeli

TEŞEKKÜR

Tezimin hazırlanma süreci boyunca bilgi ve tecrübesini paylaşan danışmanım Prof. Dr. Pervin Rukiye Dinçer'e teşekkür ediyorum.

Yüksek lisans eğitimim süresince beni destekleyen tüm Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerine teşekkürlerimi sunuyorum.

Eğitimim ve tez hazırlama sürecinde desteğini esirgemeyen başta Hasan Basri Kılıç ve Tayfun Hilmi Akbaba olmak üzere tüm araştırma görevlisi arkadaşlarıma en iyi dileklerimi ve şükranlarımı sunuyorum.

Tıbbi Biyoloji alanında eğitim almakla gösterdiği vizyon ve destekleri için Hacettepe Üniversitesi Periodontoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Rahime M. Nohutcu'ya ve bu zorlu dönemde dostluklarını ve desteklerini her noktada hissettiğim değerli arkadaşlarım Prof. Dr. Abdullah Cevdet Akman ve Prof. Dr. Güliz N. Güncü'ye çok teşekkür ediyorum.

Poyraz Deniz'e.....

* Tez çalışması, THD-2021-19415 kodlu Hızlı Destek Projesi ve TYL-2022-20176 kodlu Yüksek Lisans Projesi kapsamında Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi tarafından desteklenmiştir.

ÖZET

Keçeli HG. Periodontitise yatkınlıkta rol oynadığı düşünülen *RSPO4* genine ait putatif bir düzenleyici bölgenin gen ifadesini hızlandırıcı etkisinin gösterilmesi. Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 2023

Periodontitis genetik, çevresel ve hayat tarzı faktörlerinin bir arada rol oynadığı, dişe özgü destek yapıların yıkımıyla karakterize kompleks hastalıklardan birisidir. Patogenezi ve yatkınlığı ile ilişkili genetik mekanizmalar henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. *RSPO4* özellikle tırnak ve ekstremitte gelişimi ile ilişkili mekanizmalarda rolünün yanı sıra kemik oluşumu ve olgun iskelette görev alan bir genidir. *Porphyromonas gingivalis* (majör periodontopatojen) kaynaklı oral enfeksiyona direnç gösteren spesifik fare hatlarında RNA dizi analizi sonucu *RSPO4* ifadesinin arttığını gösteren bulgular *RSPO4* gen regülasyonunun periodontal yıkıma dirençte rol oynadığını düşündürmüştür. Genom boyu ilişkilendirme çalışmaları, *ENCODE* verileri ve çeşitli hücre tiplerinde ChIP-dizileme analizleri; *RSPO4*'ün 3'UTR bölgesinde yer alan, transkripsiyon faktörü bağlanma bölgeleri olan, H3K4Me1 ve H3K27Ac histon modifikasyonlarına ve DNaz I aşırı duyarlılığına sahip, güçlü *linkage disequilibrium* değeri gösteren tek nükleotit polimorfizmleri görülen bir haplotip bloğun aşağı yönünde gen ifadesini hızlandırıcı etkisi olduğunu düşündürmüştür. Bu bilgiler ışığında ilgili kromozom bölgesinin periodontitis etiolojisinde işlevi olan düzenleyici elemanlar içerdiği düşünülmüştür. Araştırmanın amacı bu putatif düzenleyici elemanların gen ifadesini hızlandırdığını doğrulamaktır. Bu amaçla putatif gen ifadesini düzenleyen bölge amplifiye edilip DNA dizi analizi ile doğrulanmış, *firefly luciferase reporter* vektörü (pGl4.24) içerisine klonlanıp ardından kompetan bakteriler içerisinde yüksek düzeyde ifadesi sağlandıktan sonra *RSPO4*'ün güçlü bir şekilde ifade edildiği SaOs-2 hücrelerine transfeksiyonu gerçekleştirilmiş ve putatif dizinin promotör aktivitesine olan etkisi *luciferaz assay* ile incelenmiştir. İnceleme sonucunda dizinin promotör aktivitesini azalttığı belirlenmiştir. Mevcut sonuçlar incelenen bölgenin gen ifadesini azaltıcı (repressör) bir bölge olduğunu ortaya koymuştur.

Anahtar kelimeler: Periodontitis, R-spondin, *RSPO4*

ABSTRACT

Keceli HG. Demonstration of the enhancing effect of a putative regulatory region regarding the *RSPO4* gene carrying a potential role in the susceptibility to periodontitis. Hacettepe University Graduate School of Health Sciences, Medical Biology Master Thesis, Ankara, 2023. Periodontitis is one of the complex diseases characterized by the destruction of tooth-specific supporting structures in which genetic, environmental and lifestyle factors play a role, and the genetic mechanisms associated with its pathogenesis and susceptibility have not yet been fully elucidated. *RSPO4* is a gene that is involved in bone formation and mature skeleton, as well as has role in mechanisms related to nail and extremity development. Findings showing increased *RSPO4* expression as a result of RNA-seq in specific mouse lines resistant to *Porphyromonas gingivalis* (major periodontopathogen) infection suggested that *RSPO4* gene regulation plays a role in resistance to periodontal destruction. According to the genome-wide association studies, ENCODE data and ChIP-seq analyses in various cell types; a haplotype block located in the 3'UTR region of *RSPO4*, which has transcription factor binding sites, H3K4Me1 and H3K27Ac histone modifications, DNase I hypersensitivity, and single nucleotide polymorphisms showing strong linkage disequilibrium suggested that the downstream gene expression of a haplotype block is a putative *enhancer* region. Accordingly, it was thought that the relevant chromosome region containing regulatory elements that have a function in the etiology of periodontitis. The aim of the study is to confirm that these putative regulatory elements enhance gene expression. For this purpose, the region was amplified and confirmed by DNA sequencing, cloned into the firefly luciferase reporter vector pgl4.24, and then transfected into cells where *RSPO4* was strongly expressed after it was expressed at a high level in competent bacteria, and the effect of the putative sequence on the promoter activity was carried out. The effect was examined with the luciferase assay. As a result, it was determined that the sequence decreased the promoter activity revealing that the region is a repressor region.

Keywords: Periodontitis, R-spondin, *RSPO4*

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ONAY SAYFASI	iii
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iv
ETİK BEYAN	v
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR	x
ŞEKİLLER	xi
TABLolar	xii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Periodonsiyum	3
2.2. Periodontal Hastalıklar	3
2.3. İnflamatuvar Periodontal Hastalıkların Oluşum Mekanizması	7
2.3.1. Dental Biyofilm	7
2.3.2. Konak Yanıtı	8
2.3.3. Sistemik ve Çevresel Faktörler	9
2.3.4. Genetik Faktörler	9
2.4. RSPO4	11
3. GEREÇ VE YÖNTEM	16
3.1. Araştırma planı	16
3.2. Putatif Hızlandırıcı Test Bölgesinin ve Kontrol Bölgesinin Belirlenmesi	16
3.3. Primer Tasarımı	18
3.4. PCR Amplifikasyonu	21
3.5. Elde Edilen Amplikonların Dizi Analizi ile Doğrulanması	24
3.6. PCR Ürünlerinin Saflaştırılması	24
3.7. Putatif Test ve Kontrol Bölgelerinin Reporter Gen Plazmitine Klonlanması	25
3.7.1. Reporter Gen Plazmiti Seçimi	26

3.7.2 Enzim Kesimi Reaksiyonu ve Ligasyon	26
3.7.3 Transformasyon	29
3.7.4 Mini-prep ile Kompetan Bakterilerden DNA İzolasyonu	29
3.7.5 Midi-prep ile DNA Konsantrasyonunun Artırılması	30
3.8 Osteosarkom Hücre Kültürü	31
3.9 Transfeksiyon	31
3.10 Lusiferaz Aktivasyonunun Kantitasyonu	32
3.11 Verilerin Analizi	33
4. BULGULAR	34
4.1 Putatif Hızlandırıcı Test ve Kontrol Bölgelerinin PCR Amplifikasyonu	34
4.2 PCR Ürünlerinin Reporter Gen Plazmitine Klonlanması	36
4.3 Hücre Kültürü ve Transfeksiyon	38
4.4 Lusiferaz Aktivasyonunun Kantitasyonu	40
5. TARTIŞMA	42
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	48
7. KAYNAKLAR	49
8. EKLER	58
Ek-1. Etik kurul onay belgesi	58
Ek-2. Orjinallik ekran çıktısı	59
Ek-3. Dijital makbuz	60
9. ÖZGEÇMİŞ	61

SİMGELER VE KISALTMALAR

AAP	Amerikan Periodontoloji Akademisi
AMTN	Amelotin
ANGPT	Anjiopoetin
ANGPTL	Anjiopoetin benzeri
ANRIL	Antisense non-coding RNA in the INK4 Locus
AP1M2	Adaptor related protein complex 1 subunit M2
BMP	Kemik morfogenez proteini
BPIFB1	Bactericidal permeability increasing fold containing family B1
CALB	Calbindin
CAMTA	Calmodulin binding transcription activator
ChIP	Kromatin immünpresipitasyon
CNTN	Contactin
CRABP	Cellular retinoic acid binding protein
CXCL	C-X-C motif chemokine ligand
DEFA1A3	Defensin alpha 1 and alpha 3
DNA	Deoksiribonükleik asit
dNTP	Deoksiribonükleotit trifosfat
DOS	Dişeti oluğu sıvısı
EDTA	Etilendiaminasetik asit
ENCODE	Encyclopedia of DNA elements
EFP	Avrupa Periodontoloji Federasyonu
FBN	Fibrillin
FBXO	F-box protein
fMLP	N-formil-metil-lösin-fenilalanin yüzey reseptörü
GFP	Yeşil floresan proteini
GJA	Gap junction protein alpha
GLDN	Gliomedin
GLT6D1	Glycosyltransferase 6 domain containing 1
GO	Gen ontolojisi
HSPG	Heparan sülfat proteoglikan

IL	Interlökin
INMT	Indolethylamine N-methyltransferase
KEGG	Kyoto gen ve genom ansiklopedisi
KRI1	Krishah 1
KRT	Keratin
LAR	Luciferase assay reagent
LB	Luria broth
LD	Linkage disequilibrium
LEF	Lenfoid enhancer factor
LGR	Lösinden zengin tekrarlar içeren G-protein çifti reseptörü
LPS	Lipopolisakkarit
LRP	Lipoprotein ilişkili reseptör
MAF	Musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene
MMP	Matriks metalloproteaz
MSX	Msh homeobox
MUC	Mucine
NET	Nötrofil hücre dışı tuzakları (<i>neutrophil extracellular traps</i>)
NPY	Nöropeptid Y
OCN	Osteokalsin
OPTN	Osteopontin
PAPLN	Papilin
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
PF4	Platelet factor
PLG	Plazminogen
PMN	Polimorfonükleer hücreler
PPBP	Pro-platelet basic protein
RNA	Ribonükleik asit
RNAP	RNA polimeraz
RNF	Ring finger protein
RSPO	R-spondin
SCO-spondin	SSPO geni tarafından kodlanan protein

SIGLEC	Sialic acid-binding Ig-like lectin
SPINK6	Serine peptidase inhibitor kazal type 6
SPSS	Statistical package for the social sciences
SRY	Sex determining region Y
TCF	T-hücre faktörü (<i>T-cell factor</i>)
Th	Yardımcı T hücresi
TSR-1	Trombospondin tip 1 tekrar
TWIST	Twist family BHLH transcription factor
UCSC	University of California Santa Cruz
UMI	Unique molecular identifiers
UTR	Untranslated region
VAMP	Vesicle associated membrane protein
WIF	WNT inhibitory factor
ZNRF	Zinc and ring finger

ŞEKİLLER

Şekil		Sayfa
2.1	Periodontal sağlık-hastalık dönüşümü	5
2.2	Periodontal hastalıkların gelişim mekanizması	7
3.1	Araştırma planı	16
3.2	İncelenen bölgenin UCSC genome browser görüntüsü	17
3.3	Gen ifadesi üzerindeki etkileri incelenen test ve kontrol bölgeleri	18
3.4	Test bölgesini içeren uzun DNA bandı dizisi ve primerler	19
3.5	Kontrol bölgesini içeren uzun DNA bandı dizisi ve primerler	19
3.6	Test dizisi ve tasarlanan primerler	20
3.7	Kontrol dizisi ve tasarlanan primerler	20
3.8	Klonlama sürecine ait özet gösterim	25
3.9	Araştırmada kullanılan <i>Firefly lusiferaz reporter</i> vektörünün yapısı	26
3.10	Transfeksiyon deney planı	32
3.11	Firefly ve Renilla Lusiferazları tarafından katalizlenen reaksiyonlar	33
4.1	Test bölgesini içeren uzun bandın elektroforez görüntüsü	34
4.2	Kontrol bölgesini içeren uzun bandın elektroforez görüntüsü	34
4.3	Putatif test dizisine ait PCR ürününün elektroforez görüntüsü	35
4.4	Kontrol dizisine ait PCR ürününün elektroforez görüntüsü	35
4.5	İmmünkompetan bakterilere transformasyon sonrası koloni oluşumu	36
4.6	Klonlamanın doğrulanmasını gösteren enzim kesimi reaksiyonu	37
4.7	Reporter gen plazmitine klonlanan test ve kontrol bölgeleri	38
4.8	Hücre ekimi sonrası kültür kabına tutunan SaOs-2 hücreleri	39
4.9	Test plazmitine ait hücre ve transfeksiyon etkinliği görüntüsü	39
4.10	Kontrol plazmitine ait hücre ve transfeksiyon etkinliği görüntüsü	39
4.11	Test ve kontrol gruplarına ait lusiferaz aktivitesi sonuçları	41

TABLolar

Tablo		Sayfa
2.1	Periodontitis yaygınlığı, evresi ve derecesi	6
3.1	Putatif hızlandırıcı bölgeyi içeren uzun bandın PCR koşulları	21
3.2	Kontrol bölgesini içeren uzun bandın PCR koşulları	22
3.3	Putatif hızlandırıcı bölgeye ait kısa bandın PCR koşulları	22
3.4	Kontrol hızlandırıcı bölgeye ait kısa bandın PCR koşulları	23
3.5	DNA dizi analizi öncesi PCR koşulları	24
3.6	Enzim kesim reaksiyonu koşulları	27
3.7	Ligasyon reaksiyonu koşulları	27
3.8	Klonlama başarısının testi için enzim kesimi reaksiyonu koşulları	28
3.9	Klonlama başarısının testi için dizi analizi reaksiyonu koşulları	28
4.1	Test ve kontrol gruplarına ait lusiferaz aktivitesi sonuçları	40

1. GİRİŞ

Periodontitis alveol kemiği, sement ve periodontal ligament gibi dişe özgü çevreyici yapıların yıkımına yol açan bir hastalıktır. Periodontitis; genetik, çevresel ve hayat tarzı faktörlerinin bir arada rol oynadığı kompleks hastalıklardan olup genetik yatkınlığa sahip her bireyde hastalık gelişmeyebilir. Ancak bazı bireyler henüz genç yaşta periodontitis fenotipine sahip olabilir (agresif periodontitis) ve bu bireylerde genetik yatkınlığın varlığına sıklıkla işaret edilmektedir. Genetik açıdan periodontitiste tek bir genetik değişken güçlü bir etki ile açığa çıkmamakta, erken yaşta başlayan hastalık tablosu genellikle çeşitli risk alellerinin özgül kombinasyonlarını taşımaktadır. Farklı hastalık fenotipleri arasındaki sınırlar belirgin bir farklılık göstermemekle birlikte bu fenotipler bazı ortak risk alellerine ve varyasyonlara sahiptir. Hastalık şiddeti bireysel genotip ile tarif edilebilmekte ve çok şiddetli vaka örnekleri yatkınlık alellerini daha yüksek sıklıkta taşımakta iken orta şiddette fenotipe sahip hastalarda çevresel ve hayat tarzı faktörleri daha önemli rol oynamaktadır. Genel olarak bu risk alelleri yaygın, orta düzeyde yıkım gösteren ve geç yaşta ortaya çıkan periodontitis formlarında (kronik periodontitis) görülmektedir. Homojen etnik zemine sahip geniş vaka örneklerini bulabilmekteki zorluklar periodontitisin genetik risk lokuslarının belirlenmesi sürecini yavaşlatmaktadır. Sonuç olarak çok sayıda aday gen analizi çalışmasına rağmen istatistiksel ilişki kanıtları henüz yetersizdir ve genom düzeyinde ilişki çalışmaları ile ancak *GLT6D1*, *DEFA1A3*, *SIGLEC5*, *NPY*, *PF4/PPBP/CXCL5*, *ANRIL*, *CAMTA1/VAMP3* ve *PLG* gibi bazı genlerdeki varyasyonlar periodontitis için gerçek genetik yatkınlık faktörü olarak kabul edilebilmektedir (1).

Gingival dokulardaki inflamasyon (gingivitis) periodontitis gelişimi için ön koşuldur (2,3). Ancak bazı bireylerdeki gingivitis, periodontitise dönüşmez (4,5). Hastalık patogenezi ve yatkınlığın anlaşılması açısından oldukça ilgi çekici olmasına karşın bu dönüşümün hangi bireylerde olabildiği henüz bilinmemektedir. Ayrıca aynı bireydeki bazı bölgeler periodontitise dönüşürken bazıları yıllarca gingivitis olarak stabil kalmaktadır. Bu durum hastalığın bölgeye özgü olma özelliğini (*site-specificity*) tanımlamaktadır. Ancak hangi bölgelerin hastalığa dönüşüp hangilerinin direnç gösterdiği ile ilişkili mekanizmalar henüz aydınlatılamamıştır. Yakın tarihli bir araştırmada bir grup spesifik fare hattı (*recombinant inbred lines*) altı hafta süreyle oluşturulan majör bir periodontopatojen (*Porphyromonas gingivalis*) kaynaklı oral enfeksiyona direnç gösterirken diğer hatlarda belirgin kemik kaybı gözlenmiştir (6). Araştırmada periodontal dokular kullanılarak yapılan RNA-dizi analizi sonucunda dirençli farelerde bakteriyel enfeksiyona yanıt

olarak *RSPO4* ifadesinin arttığı görülmüştür. Spekülatif olmakla birlikte bu bulgular *RSPO4* gen regülasyonunun *P.gingivalis* kaynaklı periodontal yıkıma dirençte rol oynadığını düşündürmektedir. Mevcut bilgiler *RSPO4*'ün osteogenezde rolü bulunduğunu ve canonical Wnt sinyal aktivatörü olduğunu doğrulamaktadır (7-9). Ayrıca evre III-IV, C dereceli periodontitisli bireylerde gerçekleştirilen bir genom boyu ilişkilendirme çalışması sonuçları *RSPO4*'ün periodontistide rolü olduğunu düşündürmüştür (10).

RSPO4'ün genetik düzenleyici bölgesi ile ilgili olarak 896 vaka ve 7.104 kontrol bireyi ile gerçekleştirilen genom boyu ilişkilendirme çalışmasının sonuçları *RSPO4*'ün 3'UTR bölgesindeki bir haplotip bloğun aşağı yönünde agresif periodontitis ile ilişkili olduğunu göstermiştir ($p=0,002$; $OR=1,3$; 95% güven aralığı=1,1-1,57). *ENCODE* verileri ile birleştirildiğinde ilişkilendirme bölgesinde putatif bir hızlandırıcı bölgesine rastlanmıştır. Çeşitli hücre tiplerinde ChIP-dizileme analizi sonucunda tespit edilmiş olan transkripsiyon faktörü bağlanma bölgelerinin, DNaz I aşırı duyarlılığı gösteren açık kromatin bölgelerinin varlığı, ile H3K4Me1 ve H3K27Ac histon modifikasyonlarının varlığı bu bölgenin gen ifadesini hızlandırıcı bir dizi olduğunu düşündürmüştür (11,12). Ayrıca belirtilen olası düzenleyici bölgede güçlü LD değerine sahip tek nükleotit polimorfizm bölgelerinin de bulunması bu fikri desteklemektedir.

Bu bilgiler ışığında gerçekleştirilen tez çalışmasının hipotezi; “*RSPO4* geninin 3' yönünde etiketlenen, periodontitis ile ilişkili varyantların yer aldığı putatif bir düzenleyici bölge, gen ifadesini hızlandırıcı etki gösterir” şeklindedir. Çalışmanın amacı ise *RSPO4* genine yakın konumlanmış olan putatif bir düzenleyici bölgenin, gen ifadesini hızlandırıcı rolünü doğrulamaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Periodonsiyum

Periodonsiyum dişleri çevreleyen ve destekleyen dokuların genel adıdır ve periodontal ligament, alveol kemiği, sement ve dişetinden oluşur (13). Bu dört yapı fonksiyonel, biyokimyasal ve anatomik açıdan tek bir doku gibi işlev görür ve dişleri destekler (14). Dişeti, dişin kökünü ve içerisinde yer aldığı alveol kemiğini sıkıca kaplayan mukozadır. Alveol kemiği, çene kemiğinin diş köklerini çevreleyen kısmıdır. Periodontal ligament, alveol kemiğinin iç yüzeyi ile diş kökünün dış yüzeyi arasında yer alarak dişlerin alveol kemiğine tutunmasını sağlayan; hücre, lifler, vasküler ve nöral yapılardan oluşan bir bağ dokusudur (13). Sement ise diş kökünü örten, mezenkimal kökenli, avasküler kalsifiye dokudur (15).

2.2. Periodontal Hastalıklar

Sağlıklı periodonsiyum; gül kurusu pembe renkte, fibrotik kıvamlı, kanamasız ve yüzeyinde yer yer pürüklü alanlara sahip bir dişeti ve destek kaybı, cep ve alveoler kemik rezorbsiyonu görülmeyen periodontal koşulları tarif etmektedir. Başka bir ifade ile periodontal sağlık, klinik olarak inflamasyon ve destek kaybının oluşmadığı ya da tedavi edilerek giderildiği durumdur. Dünya genelinde en sık görülen bulaşıcı olmayan iltihabi hastalıklar olarak bilinen inflamatuvar periodontal hastalıklar ise bu homeostazinin bozulduğu, aktif olarak mikrobiyal dental biyofilm tarafından başlatılıp birçok sistemik ve lokal faktörün hazırlayıcı ve ilerletici faktör olarak rol oynadığı hastalıklardır (16).

Periodontal hastalıklar ve durumlar Amerikan Periodontoloji Akademisi (*American Academy of Periodontology*, AAP) ile Avrupa Periodontoloji Federasyonu (*European Federation of Periodontology*, EFP) arasında sağlanan ortak görüş sonucunda 2017 yılında oluşturulan aşağıdaki sınıflandırma içerisinde yer almaktadır (17).

Periodontal Hastalıklar ve Durumlar

1. Periodontal sağlık, gingival hastalıklar ve durumlar

- Gingival sağlık

- Gingivitis (biyofilm tarafından indüklenen)

- Gingival hastalıklar (biyofilm tarafından indüklenmeyen)

2. Periodontitis

- Periodontitis

- Nekrotizan periodontal hastalıklar

- Sistemik bir hastalığın bulgusu olarak periodontitis

3. Periodonsiyumu etkileyen diğer durumlar

- Periodontal destek dokuları etkileyen sistemik hastalıklar ve durumlar

- Periodontal abseler ve endodontik-periodontal lezyonlar

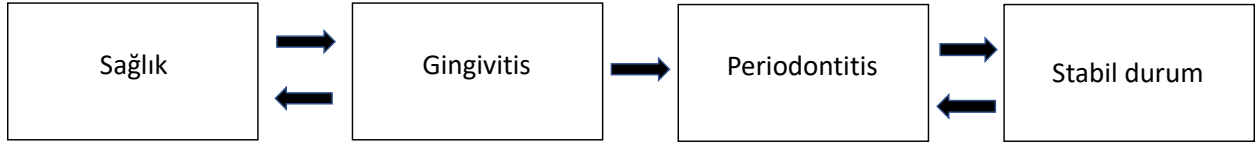
- Mukogingival deformateler ve durumlar

- Travmatik okluzal kuvvetler

- Diş ve protez ilişkili faktörler

İnflamatuvar periodontal hastalıklar temel olarak gingivitis ve periodontitistir. Gingivitis dişeti düzeyinde sınırlı kalan ve periodontal destek kaybına yol açmayan, geri dönüşümlü bir inflamasyon tablosudur. Karakteristik klinik bulguları dişetinde eritem, ödem, kanama ve form değişikliğidir (18). Periodontitis ise inflamasyon sonucu diş destekleyen yapıların yıkıma uğradığı periodontal hastalıktır. Periodontitis biyofilm (mikroorganizmaların diş yüzeyine yapışkan bir matris aracılığıyla tutunup kolonize olarak meydana getirdiği karmaşık sistem) ve bu biyofilme konak tarafından inflamatuvar medyatörler aracılığıyla verilen yanıt aracılığıyla oluşmaktadır (19). Oluşan inflamasyon sonucunda dişeti, alveol kemiği ve periodontal ligamente ait bağ dokularında yıkım meydana gelirken alveol kemiği ve sementin mineral fazında da rezorbsiyon oluşmaktadır (20). Periodontitisin klinik bulguları gingivisteki kanama, ödem ve eritem bulgularına ek olarak periodontal destek kaybı, kemik rezorbsiyonu ve patolojik cep oluşumudur. Ağrı genellikle azdır veya görülmemektedir. Periodontitisin ilerlemesi sonucu oluşan diş kayıpları çiğneme fonksiyonunda bozulmaya ve estetik problemlere neden olmaktadır. Periodontitis hayat kalitesini önemli ölçüde bozarak sosyal problemlere sebep olurken tedavi maliyetleri de sosyo-ekonomik

yükü artırmaktadır (16). Yapılan araştırmalar periodontitis ile sistemik sağlık arasında yakın ilişki olduğunu ve periodontitisin başta diyabet olmak üzere kardiyovasküler problemler, romatizmal hastalıklar, nörolojik problemler, gastrointestinal sorunlar gibi birçok sistemik problemin hem komplikasyonları arasında yer aldığını hem de etiolojisinde rol oynadığını göstermektedir (20). Periodontal sağlık ile gingivitis arasındaki geçiş tamamen geri dönebilir iken periodontitis oluşmuş bir hasta ancak stabil duruma döneşebilmektedir (21) (şekil 2.1).



şekil 2.1. Periodontal sağlık-hastalık döneşümü

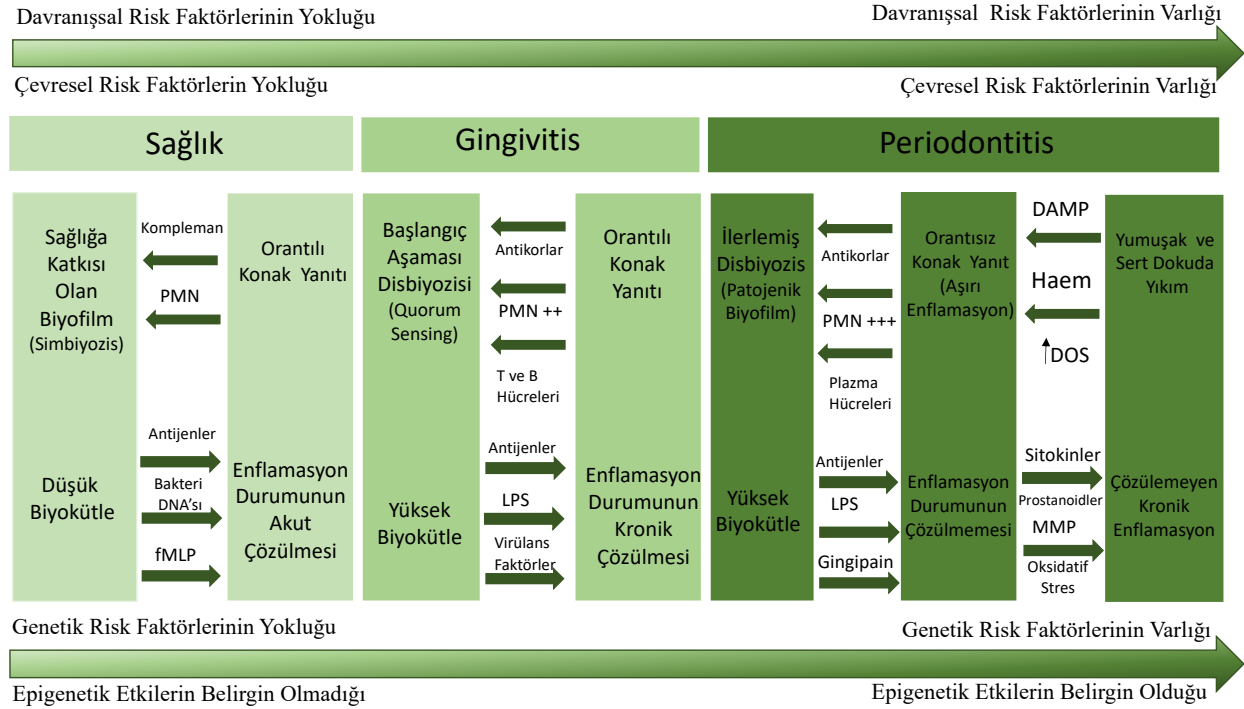
Periodontal hastalığın türünün yanı sıra hastalığa ait yaygınlık, evre (şiddet) ve derece (ilerleme hızı) bilgileri ile tanı süreci tamamlanmaktadır (Tablo 2.1). Yaygınlık etkilenen diş sayısını temsil eden bir terimdir. Buna göre yaygınlık tayin edilirken etkilenen diş sayısının toplam diş sayısına oranı %30'dan fazla ise genel, %30'dan az ise lokal ifadesi kullanılmaktadır. Bazı olgularda periodontal hastalık özellikle genç yaşlarda spesifik dişleri etkileyebilmektedir. Bu dişlerin çoğunlukla birinci keser dişler ve/veya birinci molar dişler olması sebebiyle yaygınlık için üçüncü bir ifade de molar-keser tutulumudur. Periodontal hastalığın evresi hastalığın ne oranda ilerlediğinin bir göstergesidir ve tümör evrelemesi ile benzer bir mantığa sahiptir. Buna göre evre I periodontitiste hastalığın gingivitisten ve periodontitise henüz döneştüğü aşamadır ve periodontal destek kaybının erken aşamalarını temsil etmektedir. Evreler ilerledikçe hem destek kaybı hem de kaybedilen diş sayısı artmaktadır. Periodontitis derecesi ise hastalığın ilerleme hızının göstergesidir. Beş yıllık periyotta oluşan periodontal destek kaybının ölçülmesi veya hastalıkta oluşan kemik rezorbsiyon miktarının hastanın yaşına bölünmesi ile hesaplanmaktadır. Risk faktörlerinin hastalığın ilerleme hızını artıracadığı gerçeğinden hareketle periodontitis derecesi, kontrol altında olmayan diyabet ve günde 10 adetten fazla sigara kullanımını varlığında artmaktadır (Tablo 2.1) (22,23).

Tablo 2.1. Periodontitis yaygınlığı, evresi ve derecesi

1- Yaygınlık	<i>Lokal (<%30)</i>			
	<i>Genel (≥%30)</i>			
	<i>Molar-keser tutulumu</i>			
2-Evre	<i>Evre I (Başlangıç)</i>	<i>Evre II (Orta)</i>	<i>Evre III (Şiddetli + diş kaybı)</i>	<i>Evre IV (Şiddetli + dentisyon kaybı)</i>
	1-2 mm destek kaybı	3-4 mm destek kaybı	≥ 5mm destek kaybı	≥ 5mm destek kaybı
	<%15 kemik kaybı	%15-33 kemik kaybı	>%33 kemik kaybı	
	Diş kaybı yok		≤ 4 diş kaybı	≥ 5 diş kaybı
3-Derece	<i>Derece A (yavaş)</i>	<i>Derece B (orta)</i>	<i>Derece C (hızlı)</i>	
	Son 5 yılda kemik kaybı yok	Son 5 yılda <2mm kemik kaybı	Son 5 yılda ≥2mm kemik kaybı	
	Kemik kaybı / yaş < 0.25	Kemik kaybı / yaş = 0.25-1	Kemik kaybı / yaş >1	
	Fazla biyofilm-az yıkım	Biyofilm ile uyumlu yıkım	Az biyofilm- fazla yıkım	
	-	<10 sigara/gün	≥10 sigara/gün	
		HbA1c<7	HbA1c≥7	

2.3. İnflamatuar Periodontal Hastalıkların Oluşum Mekanizması

İnflamatuar periodontal hastalıklar temel olarak dental biyofilm ile ona karşı gelişen konak yanıtı ve bu etkileşimin modülasyonunda rol oynayan genetik ve çevresel faktörlerin etkisi sonucu ortaya çıkmaktadır (Şekil 2.2) (24).



Şekil 2.2. Periodontal hastalıkların gelişim mekanizması (PMN, polimorfonükleer hücreler; fMLP, N-formil-metil-lösin-fenilalanin yüzey reseptörü; LPS, lipopolisakkarit; DOS, dişeti oluğu sıvısı; MMP, matriks metalloproteaz)

2.3.1. Dental Biyofilm

Gingivitis ve periodontitis diş yüzeyine tutunan biyofilm içerisinde yer alan mikroorganizmalar tarafından başlatılmakta ve sürdürülmektedir (19). Mikrobiyal biyofilm bir kişide yaklaşık 150 tür içerirken günümüze kadar insan dental biyofilminden 800'e yakın farklı tür izole edilmiştir (25). Periodontitis başlangıcına neden olan türlerin hangisi/hangileri olabileceği sorusunun yanıtı hala gizemini korusa da (26, 27) gram-negatif anaerobik bakteriler, spiroketler ve hatta virüslerin hastalık tablosundan sorumlu patojenler arasında olduğu; *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola* ve *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* gibi bakterilerin agresif periodontal hastalık formları ile ilişkili olduğu

belirtilmektedir (28,29). Ancak günümüzde hiçbir patojenin kendi başına hastalığın nedeni olmadığı ve bunun yerine *disbiyoz* (mikrobiyal biyofilm dengesizliği) durumunun 'patojenik birim' olduğu ve yukarıda adı geçen organizmaların ise anahtar (*keystone*) patojen oldukları kabul edilmektedir (30,31). Dolayısıyla son dönemde periodontal tedavi yaklaşımında hastalığa özgü bir veya birkaç spesifik patojenin eliminasyonu yerine biyofilm içeriğinin ve dengesinin hedefli bir şekilde değiştirildiği stratejiler ön plana çıkmaktadır (27).

2.3.2. Konak Yanıtı

Konak yanıtı periodontal hastalıkta dokuda meydana gelen yıkımın esas belirleyicisi olmakla birlikte biyofilm varlığında homeostaziyi sürdürme işlevine de sahiptir. Bu bağlamda gingiviteşte görülen T-hücre yanıtı konağın plak biyofilmi ile dengede olduğu varsayılan homeostatik yanıtı temsil ederken bu dengenin bozulduğu durumda (*disbiyoz*) hastalık ilerleyip periodontitise dönüşmektedir. Periodontitis lezyonuna B hücreleri ve plazma hücreleri hakimdir ve başta IL-1 ile tümör nekroz faktör- α olmak üzere B hücresi sitokinlerinin kontrolsüz üretimi; bağ dokusu yıkımı, destek kaybı ve kemik rezorpsiyonu ile sonuçlanmaktadır (32).

Gingiviteşteki T-hücre yanıtından periodontitiste baskın olan B-hücre/plazma hücresi yanıtına dönüşüm Th1 ve Th2 hücreleri arasındaki dengenin bozulmasının bir sonucudur (33). Buna ek olarak M1 ve M2 makrofajları arasındaki denge de periodontitiste yıkım ve yapımın bir arada görüldüğü kronik inflamasyon sürecini yansıtan bir belirteçtir (34). Gerek Th1-Th2 gerekse M1-M2 makrofaj dengesinin korunması ve kontrolü ise polimorfonükleer (PMN) hücre yanıtı ile sağlanmaktadır (35). Esas olarak mikrobiyal biyofilme karşı gelişen PMN hücre aktivitesi genetik, doğal immün yanıt ve spesifik olarak da antijen sunucu hücrelerin davranışı ile yönlendirilir (36). PMN hücre yanıtındaki bozulma periodontal hastalığın ilerlemesi ile sonuçlanmaktadır (37). Dişeti, kemik ve periodontal ligamentin bağ dokusunda meydana gelen bu olaylar ve özellikle PMN hücre yanıtı dişetin cep içerisinde yer alan epitel bariyerinin de bozulmasına yol açmaktadır. Epitelin bariyer görevinde kritik fonksiyona sahip olan IL-17 ve NET (*neutrophil extracellular traps*) moleküllerinin yapımındaki azalma epitelin hem bütünlüğünü hem de yenilenme sürecini bozarak mikroorganizma invazyonunu kolaylaştırmaktadır (38). Otoimmünite periodontitiste kronik inflamasyonda kritik rolü olan bir diğer mekanizmadır. Örneğin kolajen fragmanları ile zarar görmüş hücrelerin proteazla sindirilme süreci fibroblast fagositozunu da

artırarak dokuda kolajen kaybına yol açmaktadır (39). Bu süreç *regulator* T hücre-*natural killer* T hücre dengesinin bozulması ile gerçekleşmektedir (40).

2.3.3. Sistemik ve Çevresel Faktörler

Sistemik ve çevresel faktörler konağın periodontitise verdiği cevabı değiştirebilmektedir. Bu değişim periodontitisin yaygınlığı, şiddeti, ilerleme hızı ve tedaviye yanıtı üzerinden gerçekleşmektedir. Diyabet ve tütün kullanımı başta olmak üzere obesite ve beslenme, yaş, osteoporoz, stres, menstruasyon, hamilelik, HIV/AIDS gibi faktörler ile kontraseptif, antikonvülzan, immünsüpresan ve antihipertansif ilaçlar periodontal problemin hazırlayıcıları arasında yer almaktadır (41). Bu faktörler içerisinde diyabet ve sigara kullanımının etkisi diğer risk faktörlerinden daha barizdir.

2.3.4. Genetik Faktörler

Periodontal hastalıkta biyofilmdeki patojenler, immün sistem ile sistemik ve çevresel faktörler arasındaki kompleks etkileşime ait birçok olay genetik faktörler tarafından düzenlenmektedir. Genler immün reseptörlere ve bakteriyel suşlara spesifik birçok molekülü kodlamalarının yanı sıra inflamatuvar olaylara aracılık eden sinyal transdüksiyon yollarında yer alan molekülleri kodlayarak inflamatuvar yanıtın yoğunluğunu düzenlemektedir (42). Biyofilmde yer alan organizmalar da gen transferi ve mutasyonlar aracılığıyla biyofilmdeki sayılarını, oranlarını ve karakteristiklerini değiştirebilmektedir (43). Sistemik ve çevresel faktörlerin etkisi altında yaşın ilerlemesi ile değişim gösterebilen konak immün yanıtı gibi genetik faktörler de yaş ilerledikçe epigenetik etkiler ve somatik mutasyonlar ile değişim göstermektedir (44).

Genetik-periodontitis ilişkisini inceleyen, ikiz çalışmalarının ön plana çıktığı araştırmalar öncelikli olarak hastalığın kalıtımına odaklanmıştır. Örneğin erken başlayan periodontitis olgularının görülme riski dizigotik ikizlere kıyasla monozigotik ikizlerde iki kattan daha fazla bulunmuştur (45). Nitekim erken başlayan periodontitis tanısı esnasındaki ortalama yaş farkı monozigotik ikiz çiftlerinde 0,9 yıl iken dizigotik ikiz çiftlerinde 5,4 yıldır. Başka bir popülasyon temelli ikiz çalışmasında, yavaş ilerleyen periodontitis formundaki kalıtım incelenmiş ve destek kaybı açısından monozigotik ve dizigotik ikizler benzer iken periodontal hastalığın şiddeti ve yaygınlığı açısından monozigotik ikizlerin benzerliği çok daha yüksek bulunmuştur (46). Bu

araştırmalarda yaş, cinsiyet, sigara kullanımı gibi diğer sistemik ve çevresel faktörlerin etkileri sabit tutulduğunda %50 civarında kalıtım derecesi olduğu saptanmıştır.

Genetik açıdan periodontitis kompleks hastalık olarak tanımlanmaktadır. İnsan genomunun dizilenmesinden bu yana on milyonlarca ortak nükleotit polimorfizmini içeren genetik varyantların haritaları oluşturularak kompleks hastalıkların anlaşılmasında belirgin düzeyde yol alınmıştır (47-50). Periodontitise yatkınlık ve şiddetli periodontal yıkımla ilişkilendirilmiş çok sayıda genetik varyant bulunmaktadır (51). Bu varyantların saptanmasında 15 yıl öncesine kadar en sık kullanılan strateji aday gen ilişkilendirme çalışmaları idi. Bu çalışmalarda mevcut moleküler mekanizma ve hastalık etiyojisindeki olası rolü bilgilerine göre seçilen gene ait ön hipotez kurulup bu genin yatkınlık ve riskteki etkisi ile sahip olduğu fonksiyonel varyant(lar) incelenmekteydi (52). Aday gen analizlerinin interlökinler, toll-like reseptör aileleri ve matriks metalloproteinazlar gibi kazanılmış ve adaptif immünite ile ilgili mekanizmalara odaklandığı görülmektedir (53). Bu yaklaşımın en büyük limitasyonu hastalıkta rolü olabilecek yüzlerce olası genin, fonksiyonları bilinmediği için ve/veya hastalıkla ilişkili yolaklarda görev aldığı henüz tespit edilmediği için seçilmemesidir. Ayrıca periodontitis ve benzeri kompleks hastalıklarda popülasyonlar içerisindeki doğal heterojenite nedeniyle çok geniş vaka-kontrol gruplarına ihtiyaç duyulmaktadır. Oysa yapılmış birçok aday gen analizi çalışmasında incelenen ortak belirteçlerin / hastalığa yol açan genetik varyantların olasılık oranı (odds ratio-OR) 1,3 ve altında kalmaktadır (54-57). Halbuki OR'si 1,3 ve minör allel frekansı %20 olan bir varyantı incelemek için %80 güce sahip minimum vaka ve kontrol örneklem büyüklüğü 1000'er kişiyi bulmaktadır (58). Bu da geçmişte yapılan birçok aday gen analizi çalışmasının yeterli örneklem büyüklüğüne ulaşmadığını göstermektedir. Bu limitasyonlar nedeniyle periodontal risk varyantlarına yönelik çalışmalarda kapsamlı, ön hipotez içermeyen ve genomun tamamını dikkate alan bir varyant inceleme yaklaşımı olan genom boyu ilişkilendirme çalışması yöntemleri kullanılmaya başlanmıştır (59). Genom boyu ilişkilendirme çalışmaları daha geniş örneklem büyüklüğünü inceleyebilme imkânı sunmaktadır. Ayrıca aday gen analizi ile yalnız bir veya birkaç varyantın olduğu bölge incelenirken genom boyu ilişkilendirme ile bir haplotip bloğundaki tüm varyantlar bir arada incelenebilmektedir. Nitekim bu alandaki genom boyu ilişkilendirme çalışmaları, aday gen analizlerinden farklı sonuçlar ortaya koymuştur. Örneğin 2010 yılında yayınlanan bu alandaki ilk genom boyu ilişkilendirme çalışması makalesinde periodontal hastalıkla ilgili mekanizmalarda henüz adı geçmemiş olan *GLT6D1* geni agresif yıkımla karakterize periodontitis ile ilişkili bulunmuştur (60). Devam eden genom boyu

ilişkilendirme çalışmalarında ise *DEFA1A3*, *SIGLEC5*, *NPY*, *PF4/PPBP/CXCL5*, *ANRIL*, *CAMTA1/VAMP3* ve *PLG* gibi bazı genlerdeki varyasyonlar periodontitis için gerçek genetik yatkınlık faktörü olarak tespit edilmiştir (1).

2.4. *RSPO4*

RSPO4 geni 44 kb uzunluğundaki bir genomik DNA bölgesinde yer almaktadır. 5 eksondan oluşan bu bölge 234 amino asitlik bir proteini kodlamaktadır (61). *RSPO* genleri tarafından kodlanan R-spondin protein ailesi memelilerde yakın dönemde tanımlanmış, geniş ifadeye sahip ve yapısal homolojilerle ilişkili ortak organizasyonları paylaştığı öngörülen insanlarda dört farklı gen tarafından kodlanmaktadır (62,63). *RSPO4*'ün beş eksonun her biri ayrı bir yapısal domaine sahiptir. Ekson 1 tarafından kodlanan N ucu sinyal peptit dizisi düşük derecede korunmuşluk gösterirken ekson 2 ve 3 tarafından kodlanan komşu iki sisteinden zengin furin benzeri domainleri ile ekson 4'ün kodladığı bir trombospondin motifi protein aileleri arasında belirgin benzerlik gösterir. Ekson 5 tarafından kodlanan C-terminal bölgesi ise farklı uzunluklarda olabilir ve çekirdek lokalizasyon sinyali olarak bilinmektedir.

R-spondinler hücre morfolojisi, proliferasyonu ve migrasyonunu düzenleyen, evrimsel olarak korunmuş Wnt/b-katenin sinyal yolağını aktifleştirmektedir (64-66). Wnt yolağının uygun olmayan aktivasyonunun çeşitli kanserlerle ilişkisi gösterilmiştir (67). *R-spondin* aile üyeleri ve *RSPO4*'ün splice varyantının intestinal epitel proliferasyonunu artırdığı bilinmektedir (61). Ancak R-spondin 4'ün Wnt sinyal yolağı üzerindeki kesin işlevi henüz tam olarak bilinmemektedir. Ailenin yakın üyesi olan R-spondin-3 ile ilgili bilgilere dayanarak R-spondinlerin *Frizzled* ailesi reseptörlerine ve düşük yoğunluklu lipoprotein ilişkili reseptör (LRP) 5 ve 6'ya bağlanarak kanonik Wnt ligantları ile çakıştığı, bu yol üzerinden b-katenin ve T-hücre faktörü (TCF)-*lefoid enhancer factor* (LEF) transkripsiyon faktör kompleksi aracılığıyla gen aktivasyonu sağladığı söylenebilir (66). Öte yandan *RSPO1* ve *RSPO4* mutlaka *leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptor* (LGR) yolağı üzerinden etki gösterirken *RSPO2* ve *RSPO3*'ün heparan sülfat proteoglikan (HSPG) alternatif yolağını da kullanabildiği gösterilmiştir (68).

R-spondinler trombospondin tip 1 tekrar (TSR-1) içeren protein süper ailesinin üyeleridir. Prototip üyesi trombin ile uyarılmış trombositlerden izole edilmiştir ve bu yüzden “trombine duyarlı protein” olarak isimlendirilmiştir (69). Daha sonra içerisinde üç tekrara sahip olduğu trombospondin proteinlerinde de karakterize edilmiştir (70). Trombospondin proteinleri; diğer

sitokinleri, büyüme faktörlerini, membran reseptörlerini ve proteazları kompleman sisteminde yer alan properdin, C6, C7, C8A, C8B, C9 gibi çeşitli proteinler ile mindin, F-spondin ve SCO-spondin gibi bir veya daha fazla TSR-1 içeren çeşitli proteinlerle bir araya getirerek etki göstermektedir. Dört tip R-spondin proteininin pleiotropik etkileri bulunmaktadır. R-spondin-1 bireyler arasındaki cinsiyet fenotipi gibi en temel farklılıkları kontrol etmektedir. *RSPO1* gen mutasyonu SRY-bağımsız XX erkek cinsiyet değişimi ve palmoplantar hiperkeratoz ile deride skuamoz hücreli karsinom predispozisyonunu kombine eden oldukça nadir bir sendromun ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Bu tablo fibroblast kaynaklı R-spondin-1 stimülasyonunun keratinositlerde b-katenin azalmasına yol açması ile açıklanmaktadır (71). R-spondin-2 ekstremiteler, akciğer ve saç foliküllerinde gelişim için gerekli iken R-spondin-3 plasenta gelişiminde rol oynamaktadır. Koryoallantoik ara yüzde R-spondin-3 yapımı mevcutken R-spondin-3 yokluğunda koryoallantoik birleşme normal görünümdeydir. R-spondin 4'ün en belirgin fenotipik etkisi tırnak gelişimi sırasında ortaya çıkmaktadır. *Anonychia congenita* el ve ayak tırnaklarının yokluğu ile karakterize hafif bir klinik bozukluktur ve otozomal resesif geçişli bir hastalık olarak görülmektedir. Etkilenmiş bireylerde R-spondin-4 proteinini kodlayan gende homozigot ve birleşik heterozigot mutasyonlar ile işlevsel R-spondin-4 proteininin azalmış sentezi mevcuttur (72-74). Bu mutasyonların etkilerini inceleyen bir çalışmada p.C78Y ve p.C113R dönüşümleri sekresyon bozukluğuna yol açmıştır (75). p.Q65R dönüşümü sekresyonu etkilememiş ama R-spondin aktivitesini şiddetli biçimde azaltmıştır. *Anonychia* ile kombine *brachydactyly* (parmak ve tırnak kısalığı) görülen hastalarda Wnt yolağının tırnak gelişimindeki etkisi ayrıca belirtilmiştir (76). Differensiyel gen ekspresyonu (ifadesi farklılık gösteren genler), gen ontolojisi ve yolak analizleri *OCLN*, *OPTN*, *KRT7* dahil birçok gen ile birlikte RSPO4'ün erken doğumda bozulan trofoblast fonksiyonları ile Wnt yolağı üzerinden ilişkili olduğunu göstermiştir (77).

Viral enfeksiyona yanıt olarak insan hücreleri, bir grup bağışıklık sinyal proteini olan interferonları serbest bırakmaktadır. RSPO4'ün antiviral tedaviye yanıtla genom düzeyinde ilişkisi olduğu R-package (tmod) ve gen ontolojisi (GO) gibi zenginleştirilmiş gen setleri kullanılarak bildirilmiştir (78). Ek olarak, hücre dışı matriks etkileşimlerine ait reaktom ve Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) ile oluşturulan zenginleştirilmiş gen setleri, hücre çoğalmasını ve farklılaşmasını, hücre göçünü ve hücre yapışmasını içeren mekanizmaların etkisini doğrulamaktadır. Bu bilgiler RSPO4'ün inflamasyondaki doğal bağışıklık ve hücre dışı matriks fonksiyonları üzerinden gelişen rolünü ortaya koymaktadır.

Yukarıda belirtilen fonksiyonlarının yanı sıra tüm R-spondinlerin iskelet gelişiminde rol oynadığı bilinmektedir. Farelerde ekstremitte gelişiminin embriyonik tomurcuk evresinde (E10.5) *RSPO1*'in ifadesi düşerken parmak kemiklerinin mezenkimal organlarındaki ifadesi daha ileri evrede (E12.5–E14.5) artmaktadır. *RSPO2* ifade artışı bacak gelişimi tomurcuk evresinde (E10.5–E14.5) apikal ektodermal kret ile ilişkilidir (66,79). *RSPO2* (-/-) farelerde otopod ve arka bacak fibula kaybı, parmak tutuşunda kayıp, ön ayaklarda çarpıklık ve tırnak kaybı ile sonuçlanmaktadır. Yarık damak ve kraniyofasiyal malformasyon da görülmektedir. Bu fenotip Wnt sinyal iletiminin azalması ile ortaya çıkan fenotipe benzerdir (80). *RSPO2/RSPO3* (-/-) farelerde bu fenotip daha şiddetli olmaktadır (81). *RSPO4* ifadesi, ekstremitte gelişimi sırasında polarizasyon aktivitesi bölgesinde, ön ekstremitte tomurcuğu ve parmak uçlarının en uzak bölgelerinde artmaktadır. Bu veriler, *RSPO2* ve *RSPO3*'ün apikal ektodermal kret korunmasında ve dolayısıyla ekstremitenin uzamasında ve distal yapıların oluşumunda önemli bir role sahip olduğunu göstermektedir. Ayrıca R-spondinlerin tümü kraniyofasiyal kemiklerde bir miktar ifadeye sahiptir ve *RSPO2* delesyonu malformasyona neden olmaktadır (66,82). Bu da R-spondinlerin intramembranöz kemiklerin gelişiminde önemli rol oynadığını düşündürmektedir.

Sınırlı sayıda araştırma, olgun iskelette de R-spondinlerin rolü olduğunu desteklemektedir. *Rspo1*, *in vitro* olarak fare myoblast hücre hattında (C2C12) ve primer murin kalvary hücrelerinde Wnt3A ile sinerji oluşturarak osteoblastik farklılaşmayı (alkalen fosfataz aktivitesi ve osteokalsin ifadesi) ve osteoprotegerin ifadesini (83) etkilemektedir. Benzer şekilde, *RSPO2*'nin yüksek düzeyde ifadesi kemik morfogenez proteinini varlığında osteoblastik hücre farklılaşmasını (alkalen fosfataz aktivitesi, mineral boyama ve gen ifadesi) artırmakta ve *RSPO2* baskılanması ise Wnt11 ifade artışı ile görülen farklılaşmayı baskılamaktadır (84). *RSPO1* transkript seviyeleri, farklılaşma sırasında insan primer osteoblastlarında ve FOB1.19 hücrelerinde artmakta ve rekombinant *RSPO1* uygulaması, Wnt stabilizasyonunu ve alkalen fosfataz aktivitesini artırabilmektedir (85). *RSPO1* seviyeleri, *in vitro* uyaranlara yanıt olarak artmakta ve rekombinant *RSPO1*'in sistemik uygulaması, osteoporotik fenotipe sahip olduğu bilinen üç fare yaşlanma modelinde mineralizasyon oranını ve kemik hacmini arttırmıştır (86). Farelerde R-spondin reseptörü olan *LGR4*'ün silinmesi hem azalmış kemik oluşumuna hem de artmış kemik rezorpsiyonuna bağlı olarak azalmış kemik kütlelerine sebep olmaktadır. Bu da periodontal dokular da dahil olmak üzere tüm vücuttaki olgun kemik idamesinde R-spondinlerin rolü olduğunu düşündürmektedir (87).

Terapötik bir perspektiften, bir fare artrit modelinin (tümör nekroz faktör- α 'nın yüksek düzeyde ifadesi) eklemine enjekte edilen rekombinant RSPO1, osteoblast gelişimini uyarırken osteoklast gelişimini baskılayarak kemik erozyonunu azaltmış ve kırıldak bütünlüğünü artırmıştır (88). Ayrıca, osteoartrit hastalarında *RSPO2* mRNA ve protein ifadesi azalmaktadır. *RSPO2*'nin yüksek düzeyde ifadesi kemik morfogenez proteinini varlığında osteoblastik hücre farklılaşmasını (alkalen fosfataz aktivitesi, mineral boyama ve gen ifadesi) artırırken *RSPO2* baskılanması ise Wnt11 ifade artışı ile görülen farklılaşmayı baskılamaktadır (28). B-katenin stabilizasyonu, osteoartrit hastalarından izole edilen hücrelerde de azalmakta ve rekombinant Rspo2, bu stabilizasyonu normal seviyelere geri getirebilmektedir (89). Henüz ileri araştırmalara ihtiyaç olsa da R-spondin ailesi artrit veya periodontal hastalıklar gibi kemik kaybı ile seyreden klinik durumlarda tedavi potansiyeline sahip osteoanabolik terapötikler için umut verici bir hedef sunmaktadır.

RSPO4'ün periodontal dokular üzerinde etkisi olabileceğine dair en erken bulgular 2007 yılında fare diş gelişimini mikroarray yöntemiyle inceleyen bir araştırmada rapor edilmiştir (90). Araştırmada mRNA *in-situ* hibridizasyon incelemesinde Rspo4, Papln, Amtn, Gjal ve Maf transkriptlerinin diş gelişimi ile ilişkili olduğu belirtilmiştir (90). Yakın tarihli bir araştırmada ise bir grup spesifik fare hattı (*recombinant inbred lines*) 6 hafta süreyle oluşturulan majör bir periodontopatojen (*Porphyromonas gingivalis*) kaynaklı oral enfeksiyona direnç gösterirken diğer hatlarda belirgin kemik kaybı gözlenmiştir (6). Araştırmada periodontal dokular kullanılarak yapılan RNA-dizi analizi sonucunda dirençli farelerde bakteriyel enfeksiyona yanıt olarak *RSPO4* ifadesinin arttığı görülmüştür. Spekülatif olmakla birlikte bu bulgular *RSPO4* gen regülasyonunun *P.gingivalis* kaynaklı periodontal yıkıma dirençte rol oynadığını düşündürmektedir. Mevcut bilgiler RSPO4'ün osteogenezde rolü bulunduğunu ve *canonical* Wnt sinyal aktivatörü olduğunu doğrulamaktadır (7-9). Ayrıca evre III-IV, C dereceli periodontitisli bireylerde gerçekleştirilen bir genom boyu ilişkilendirme çalışması sonuçları RSPO4'ün periodontitiste rolü olduğunu düşündürmüştür (10).

RSPO4'ün genetik düzenleyici bölgesi ile ilgili olarak 896 vaka ve 7.104 kontrol bireyi ile gerçekleştirilen genom boyu ilişkilendirme çalışmasının sonuçları *RSPO4*'ün 3'UTR bölgesindeki bir haplotip bloğun aşağı yönünde agresif tipteki periodontitis ile ilişkili olduğunu göstermiştir ($p=0,002$; OR=1,3; 95% güven aralığı=1,1-1,57) (91). *ENCODE* verileri ile entegre edildiğinde ilişkilendirme bölgesinde putatif bir hızlandırıcı bölgesine rastlanmıştır. Çeşitli hücre tiplerinde

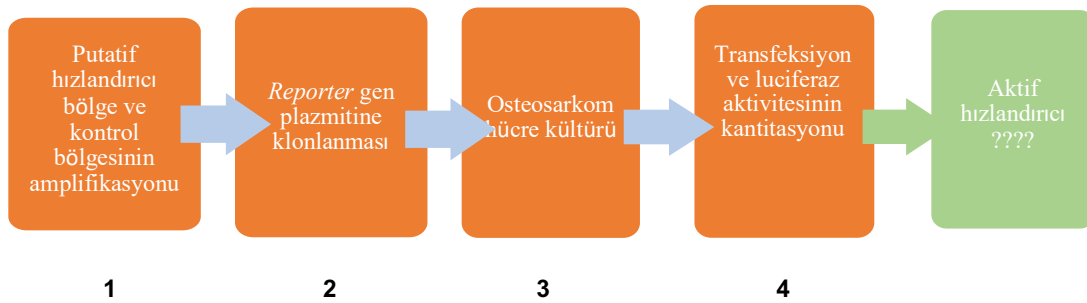
ChIP-dizileme analizi sonucunda tespit edilmiş olan transkripsiyon faktörü bağlanma bölgelerinin, DNaz I aşırı duyarlılığı gösteren açık kromatin bölgelerinin varlığı, ile H3K4Me1 ve H3K27Ac histon modifikasyonlarının varlığı bu bölgenin gen ifadesini hızlandırıcı bir dizi olduğunu düşündürmüştür (11,12). Ayrıca belirtilen olası düzenleyici bölgede güçlü LD değerine sahip tek nükleotit polimorfizm bölgelerinin de bulunması bu fikri desteklemektedir.

Bu bilgiler ışığında gerçekleştirilen tez çalışmasının hipotezi; “*RSPO4* geninin 3’ yönünde etiketlenen, periodontitis ile ilişkili varyantların yer aldığı putatif bir düzenleyici bölge, gen ifadesini hızlandırıcı etki gösterir” şeklindedir. Çalışmanın amacı ise *RSPO4* genine yakın konumlanmış olan putatif bir düzenleyici bölgenin, gen ifadesini hızlandırıcı rolünü doğrulamaktır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Araştırma Planı

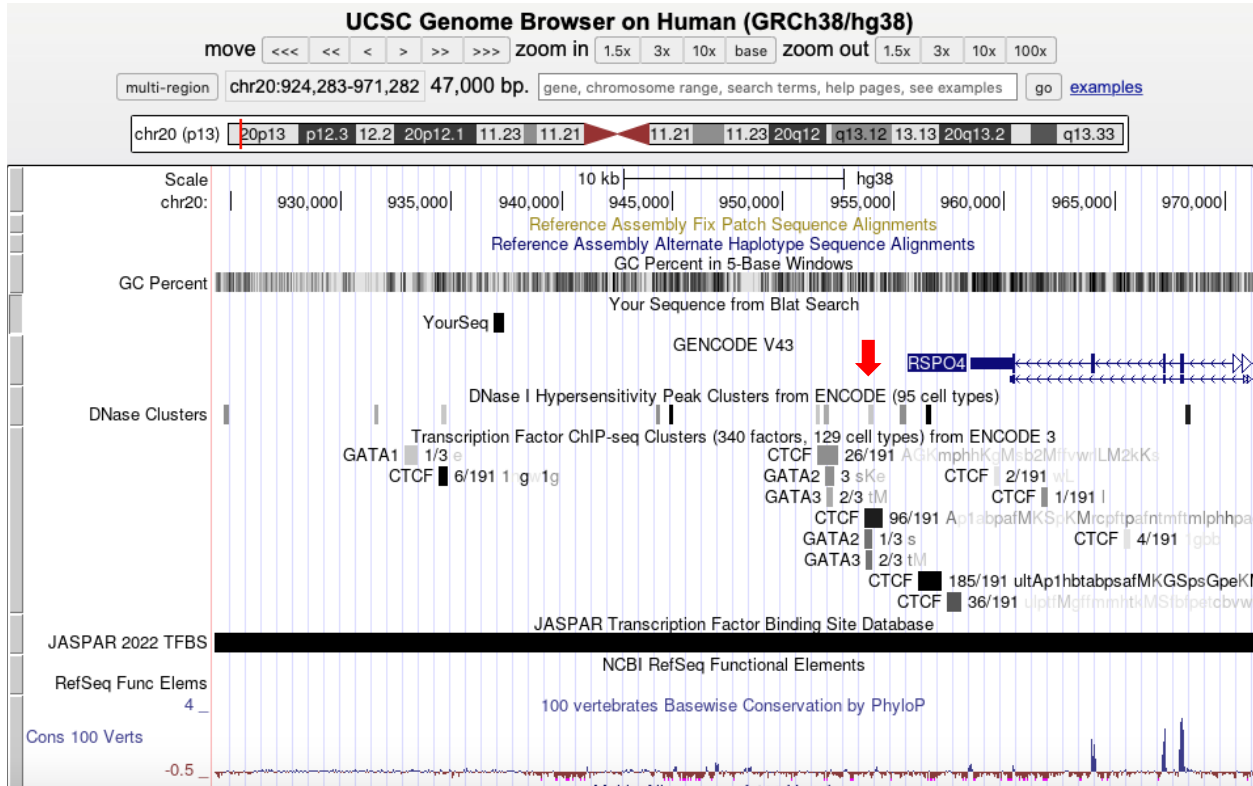
Araştırma için etik kurul izni gerekmemiştir ancak etik kurul izninin gerekmediğine dair onay alınmıştır (Ek-1). Tez çalışması Hacettepe Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı laboratuvar alt yapısı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Teze ait araştırma planı putatif hızlandırıcı ve kontrol bölgelerinin amplifikasyonu, *reporter* gen plazmitine klonlanması, osteosarkom hücre kültürü, transfeksiyon ve lusiferaz aktivitesinin kantitasyonu aşamalarından oluşmaktadır (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Araştırma planı

3.2 Putatif Hızlandırıcı Test Bölgesinin ve Kontrol Bölgesinin Belirlenmesi

Araştırmanın konusunu oluşturan ve agresif tipteki periodontitis ile ilişkili olduğu gösterilmiş olan putatif hızlandırıcı bölge (test bölgesi) *RSPO4*'ün 3'UTR bölgesindeki bir haplotip bloğun 3' yönünde yer almaktadır. Çeşitli hücre tiplerinde yapılan CHIP-dizileme analizi sonucunda transkripsiyon faktörü bağlanma bölgelerine sahip olması, DNaz I aşırı duyarlılığı göstermesi, açık kromatin bölgelerine sahip olması, H3K4Me1 ve H3K27Ac histon modifikasyonları göstermesi, etrafında güçlü LD değerine sahip tek nükleotit polimorfizm bölgelerinin bulunması nedeniyle bu bölge gen ifadesini düzenleyici bir bölge olarak düşünülmüş ve incelenmesine karar verilmiştir (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. İncelenen bölgenin 04.07.2023 tarihli UCSC genome browser görüntüsü (Ok; DNaz I aşırı duyarlı putatif düzenleyici bölge)

DNaz I aşırı duyarlılığına sahip olan alanı tamamen içermesine ve primer tasarlanabilen bir alan olmasına dikkat edilen putatif dizi chr20:953596-954125 lokalizasyonunda yer alan 530 bp'lik bir bölgeyi kapsamıştır (şekil 3.3, test bölgesi) ve nükleotit dizisi şu şekildedir;

Test Bölgesi Nükleotit Dizisi (>chr20:953596-954125 = 530 bp)

```
TGCTATGGGCTGTATATACAGAAATACATCAGTGAGAGTCCTCAGCCCTAAGGCCAT
TGGTCTGAAGAAAAAGAGAAATTGCAACAAGTGCCATAGCAAACACAGCTGGGA
AATTCAGTATGATGTTTGGAGGTGTGTCTCTGCTCAAATCATATATTGAAATGTAA
TCTGCAGTGTGGAGGTAGGGCCTGGTGGGAGGTGATTGGATAATGGAGGAGGATT
TCTTTTTTATATCTATCAGGAATGCAAATTAATTAATAATCGAAAATTACTATAA
TTCACAGACTAAGACAAGAAAAGCCATACGATTCTCTCACCAGTTGCAGAAAAAGC
ATATGATAGAATTAACATCTTTTTATGATTTTTTAAAATTATACTTTAAATTCTGGG
ATACATGTGCAGAATGTGTAGGTTTGTACATAGGTATACATGTGCCATGTTGGTTT
GCTGCACCCATCAACT
```


hedeflenmiştir. Bu bandın amplifikasyonunu gerçekleştirecek primerler şekilde gösterilmiştir (Şekil 3.4 ve 3.5, mavi oklar). Böylece amplifiye edilen uzun bant kalıp olarak kullanılıp hedeflenen putatif bölgenin (Şekil 3.4 ve 3.5, sarı ile işaretli alanlar) çoğaltılması hedeflenmiştir. Primer tasarımı PrimerBLAST programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.4. Test bölgesini içeren uzun DNA bandı dizisi ve bu dizinin çoğaltılması için tasarlanan primerler

Uzun test bandının (2607 bp) amplifikasyonu için tasarlanan primerler:

Forward primer: 5' TCTTCCCTGGGCACCCTATAA 3'

Reverse primer: 5' CAAGTGCACCATCCTGTCTGT 3'



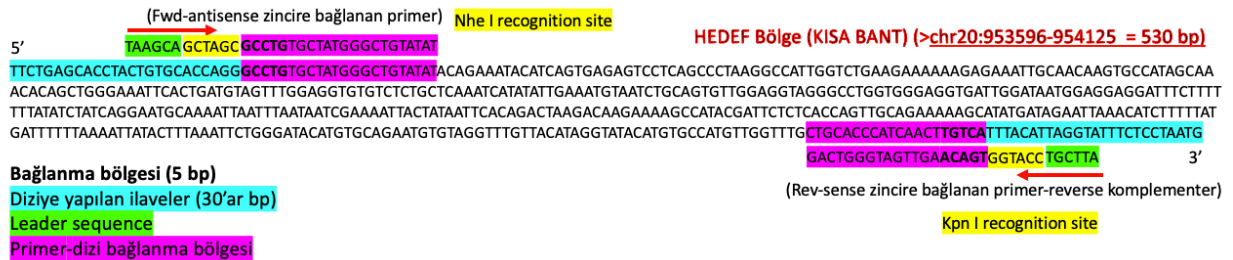
Şekil 3.5. Kontrol bölgesini içeren uzun DNA bandı dizisi ve bu dizinin çoğaltılması için tasarlanan primerler

Uzun kontrol bandının (1070 bp) amplifikasyonu için tasarlanan primerler:

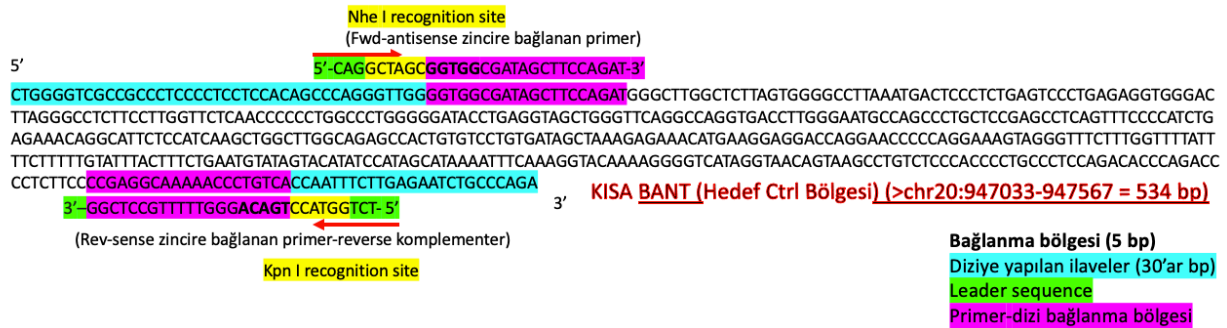
Forward primer: 5' GGCACCTCCAGCCCAATAA 3'

Reverse primer: 5' GCCCATCCTGATTGGTTCAGTT 3'

Kısa bantların amplifikasyonunda ise kalıp DNA olarak uzun bant amplifikasyonuna ait PCR ürünleri kullanılmıştır. Kısa bantları amplifiye edecek primerler dizinin başlangıç bölgesini tanıyacak optimal uzunlukta bir diziden (Şekil 3.6 ve 3.7-mor ile işaretli diziler), seçilen KpnI ve NheI kesim enzimlerinin tanıyabileceği özgül dizilerden (Şekil 3.6 ve 3.7-sarı ile işaretli diziler) ve flanking dizilerden (Şekil 3.6 ve 3.7, yeşil ile işaretli diziler) oluşmuştur.



Şekil 3.6. Test dizisi ve tasarlanan primerler



Şekil 3.7. Kontrol bölge dizisi ve tasarlanan primerler

Kısa test bantının (530 bp) amplifikasyonu için tasarlanan primerler:

Forward primer: 5' TAAGCAGCTAGCGCCTGTGCTATGGGCTGTATAT 3'

Reverse primer: 5' TGCTTAGGTACCTGACAAGTTGATGGGTGCAG 3'

Kısa kontrol bantının (534 bp) amplifikasyonu için tasarlanan primerler:

Forward primer: 5' CAGGCTAGCGGTGGCGATAGCTTCCAGAT 3'

Reverse primer: 5' TCTGGTACCTGACAGGGTTTTTGCCTCGG 3'

3.4 PCR Amplifikasyonu

Tez çalışmasında genomik DNA örneği olarak ticari olarak satın alınmış *Centre d'Etude du Polymorphism Humain* (CEPH) DNA örneği (ThermoFisher, Cat. No: 403062) kullanılmıştır. chr20:953596.954125 lokalizasyonunda yer alan 530 bp'lik putatif dizi (test) ve chr20:947033-947567 lokalizasyonunda yer alan 534 bp'lik kontrol dizisi kodlayan bölgeler değil de düzenleyici bir bölgeler olmaları ve %70'in üzerinde GC bazlarından oluşmaları sebebiyle tasarlanan primerlerin bu bölgeleri genomik DNA içerisinde tarayıp spesifik olarak bağlanması güç olacağı için önce bu bölgeleri içeren daha uzun bir DNA dizisini amplifiye edebilecek primerler tasarlanmıştır. Böylece amplifiye edilen uzun bantlar içerisinde hedeflenen putatif bölgenin ve kontrol bölgesinin çoğaltılmasının mümkün olacağı düşünülmüştür. Bu amaçla test ve kontrol bölgelerine gerek uzun gerek spesifik kısa bantlar uygun *sense* ve *antisense* primerler tasarlanıp genomik DNA'dan Tablo 3.1, 3.2, 3.3 ve 3.4'deki PCR reaksiyonlarıyla çoğaltılmıştır.

Tablo 3.1. Putatif hızlandırıcı bölgeyi içeren uzun bandın PCR koşulları

RXN (50 µl)	(-)	Uzun test
2X PrimeStarGC Buffer (Mg ²⁺ plus)	1X	1X
2.5 mM dNTPs	0,2 mM	0,2 mM
10 µM Fwd Primer (uzun-test)	1 µM	1 µM
10 µM Rev Primer (uzun-test)	1 µM	1 µM
Template DNA	-	200 ng
PrimeStarHS Polymerase	3U	3U
Nuclease-Free Water	50 µl'ye tamamlandı	50 µl'ye tamamlandı

98°C 1 dk

98°C 10 sn

60°C 10 sn x35

72°C 3 dk

72°C 5 dk

4°C ∞

Tablo 3.2. Kontrol bölgesini içeren uzun bandın PCR koşulları

RXN (25 µl)	(-)	Uzun kontrol
10X DreamTaq Buffer	1X	1X
10 mM dNTPs	0,2 mM	0,2 mM
10 µM Fwd Primer (uzun-kontrol)	1 µM	1 µM
10 µM Rev Primer (uzun-kontrol)	1 µM	1 µM
Template DNA	-	200 ng
DreamTaq DNA Polymerase	2,5U	2,5U
Nuclease-Free Water	50 µl'ye tamamlandı	50 µl'ye tamamlandı

95°C 2 dk

95°C 30 sn

55°C 30 sn x35

72°C 60 sn

72°C 10 dk

4°C ∞

Tablo 3.3. Putatif hızlandırıcı bölgeye ait kısa bandın PCR koşulları

RXN (50 µl)	(-)	Kısa test
10X PFU Reaction Buffer	1X	1X
10 mM dNTPs	0,2 mM	0,2 mM
10 µM Fwd Primer (kısa-test)	1 µM	1 µM
10 µM Rev Primer (kısa-test)	1 µM	1 µM
Template DNA	-	200 ng
PFU DNA Polymerase	2,5U	2,5U
Nuclease-Free Water	50 µl'ye tamamlandı	50 µl'ye tamamlandı

95°C 2 dk

95°C 1 dk

54°C 30 sn x35

72°C 1 dk

72°C 5 dk

4°C ∞

Tablo 3.4. Putatif hızlandırıcı bölgeye ait kısa bandın PCR koşulları

RXN (25 µl)	(-)	Kısa kontrol
DreamTaq Buffer	1X	1X
10 mM dNTPs	0,2 mM	0,2 mM
10 µM Fwd Primer (kısa-kontrol)	1 µM	1 µM
10 µM Rev Primer (kısa-kontrol)	1 µM	1 µM
Template DNA	-	200 ng
DreamTaq Polymerase	2,5U	2,5U
DMSO (%1)	2 µl	2 µl
Nuclease-Free Water	25 µl'ye tamamlandı	25 µl'ye tamamlandı

95°C 2 dk

95°C 30 sn

55°C 30 sn x35

72°C 60 sn

72°C 10 dk

4°C ∞

PCR reaksiyonları sonrası elde edilen ürünler agaroz jel elektroforez yöntemiyle aşağıdaki koşullarda yürütülmüştür;

1-%2'lik jel hazırlamak için agaroz; 1X Tris Asetat EDTA ile çözülmüş, polimerleşmenin gerçekleşebilmesi için yaklaşık 5 dk mikrodalga fırında kaynatılmış ve sonrasında 60°C'ye soğutulmuştur.

2-Jelde yürütmeyi görebilmek için üzerine 3-4 µl EtBr eklenmiştir.

3-Çözelti hızlıca karıştırılarak jel tankına dökülmüş ve jelleşme için yaklaşık 30 dk. beklenmiştir. Jel dökülmeden önce örnek yükleme kuyucukları oluşturmak için tank içine elektroforez tarağı yerleştirilmiştir.

4-Jel önceden 1X Tris Asetat EDTA ile dolu elektroforez tankına alınmış ve tankta jeli 4-5 mm üzerini örtecek kadar çözelti olmasına dikkat edilmiştir.

5-Tanktaki jel kuyucuklarına örnekler ile DNA ladder yüklendikten sonra elektroforez kapağı kapatılıp 90-120V'da 30 dk yürütülmüştür.

6- Yürütme sonrası jel UV ışık altında görüntülenmiş ve entegre bilgisayar ile fotoğrafı kaydedilmiştir.

3.5 Elde Edilen Amplikonların Dizi Analizi ile Doğrulanması

Test ve kontrol bölgelerine ait bantların nükleotit dizileri DNA dizi analizi ile kontrol edilmiştir. Bunun için DNA örnekleri aşağıdaki reaksiyon koşulları ile hazırlanmış ve termal siklus cihazı ile Tablo 3.5’de belirtilen koşullarda amplifiye edilip saflaştırılmıştır;

Tablo 3.5. DNA dizi analizi öncesi amplifikasyon PCR koşulları

RXN (10 µl)	Test Fwd	Test Rev	Kontrol Fwd	Kontrol Rev
Sequencing Buffer	5X	5X	5X	5X
BigDye Terminator v3.1	0.5 µl	0.5 µl	0.5 µl	0.5 µl
Primer	3.3 pmol/l	3.3 pmol/l	3.3 pmol/l	3.3 pmol/l
Template DNA	200 ng	200 ng	200 ng	200 ng
Nuclease-Free Water	10 µl’ye tamamlandı	10 µl’ye tamamlandı	10 µl’ye tamamlandı	10 µl’ye tamamlandı

94°C 5 dk

94°C 15 sn

50°C 15 sn x25

60°C 4 dk

60°C 1 dk

4°C ∞

Daha sonra örnekler 96 kuyucuklu plakaya aktarılıp üzeri şeffaf bant ile kapatılmış ve plaka kapiller elektroforez cihazındaki bölmesine yerleştirilerek cihaz kapillerlerinde yürütülmüştür. Cihazdan dizi analiz sonuçları alınıp incelenmiştir.

3.6 PCR Ürünlerinin Saflaştırılması

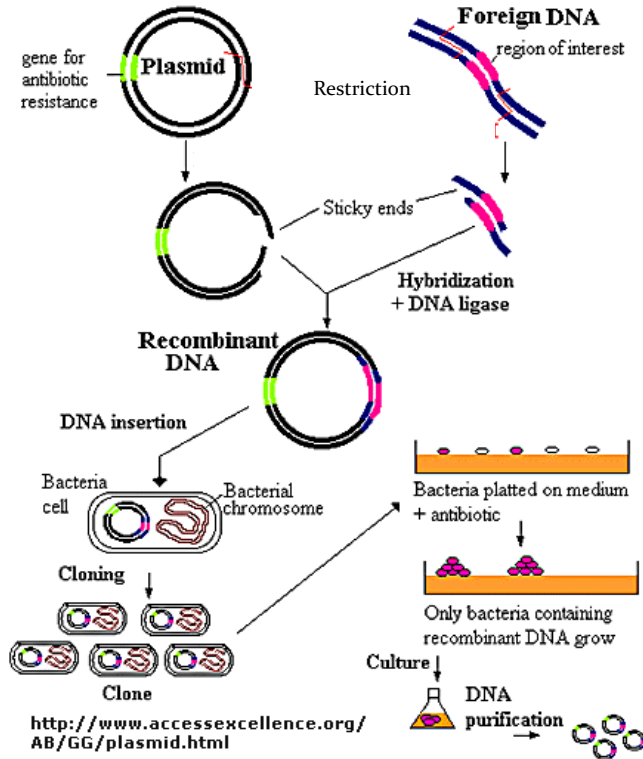
Uygulanan deneylerde PCR ürünlerinin klonlama öncesi kompetan bakterilerde yüksek düzeyde kopyalanması amaçlanmıştır. Bunun için deney protokolünde klonlanması hedeflenen putatif test bölgesi ile kontrol bölgesine ait PCR örneklerinin içerisinde yer alan kısa primer, dNTPler, enzimler, tam amplifiye edilememiş DNA’lar ve tuzları gidermek için örneklerin saflaştırılması işlemine geçilmiştir. Saflaştırma sırasında DNA konsantrasyonunun azalacağı öngörülerek saflaştırma öncesi PCR örnekleri kendi içlerinde birleştirilerek daha yüksek

miktarlara ulaşılmıştır. Saflaştırma için *Qiagen DNA purification kiti* kullanılmıştır. Tavsiye edilen protokole göre;

1. Bir hacim PCR reaksiyonuna 5 hacim Buffer PB eklenmiş ve karıştırılmıştır.
2. DNA'yı bağlamak için örnekler QIAquick kolonu + 2 ml'lik toplama tüpüne aktarılmış ve 17.900g'de 1 dk santrifüj edilmiştir.
3. Kolondan geçen kısım atıldıktan sonra kolona 750 µl Buffer PE eklenmiş ve 17.900g'de 1 dk santrifüj edilmiştir.
5. Kalan yıkama tamponunu uzaklaştırmak için 17.900g'de 1 dk boş santrifüj edilmiştir
6. Sonrasında her bir kolon temiz bir 1.5 ml mikrosantrifüj tüpüne yerleştirilmiştir.
7. DNA'yı ayırmak için, 36 µl Buffer EB eklenip 17.900g'de 1 dk santrifüj edilmiştir.

3.7 Putatif Test ve Kontrol Bölgelerinin *Reporter* Gen Plazmitine Klonlanması

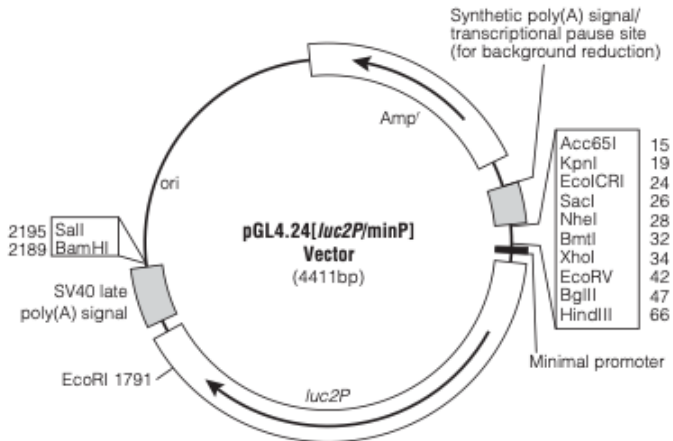
Test ve kontrol DNA'larının klonlama sürecine ait özet gösterim Şekil 3.8'deki gibidir.



Şekil 3.8. Klonlama sürecine ait özet gösterim

3.7.1 Reporter Gen Plazmiti Seçimi

Putatif hızlandırıcı dizinin ve kontrol dizisinin *luciferaz* ifadesine olan etkisini inceleyebilmek için amplifiye edilen DNA'ların *reporter* gen plazmitine klonlanması planlanmıştır. *RSPO4*'ün aşağı yönünde yer alan dizinin promotör bölgeyi doğrudan aktifleştirerek bir gen düzenleyici etkisi oluşturup oluşturmadığını araştırmak için kullanılan *Firefly luciferaz reporter* vektörü (pGL4.24 (promega)) Şekil 3.9'da gösterilmiştir.



Şekil 3.9. Araştırmada kullanılan *Firefly luciferaz reporter* vektörünün yapısı

3.7.2 Enzim Kesimi Reaksiyonu ve Ligasyon

Saflaştırma sonrası örneklerin DNA konsantrasyonları ölçülmüş ve enzim kesimi reaksiyonuna aktarılmıştır. Kesilen DNA fragmanlarının klonlanacağı plazmit pGL 4.24 Dr. Arne Schafer (Charite University of Medicine-Berlin)'den temin edilmiştir. Distile su içeren ortamda test ve kontrol DNA örnekleri, plazmit DNA, 10X Cut Smart enzim kesim tampon solüsyonu, Kpb-HF kesim enzimi ve Nhe-HF kesim enzimi kullanılarak ve gece boyu inkübasyon yoluyla Tablo 3.6'daki reaksiyon koşullarında enzim kesim reaksiyonu gerçekleştirilmiştir.

Tablo 3.6. Enzim kesim reaksiyonu koşulları

RXN (40 µl)	Test (25 ng/µl)	Kontrol (25 ng/µl)	Vektör (484 ng/µl)
Template DNA	200 ng	200 ng	8000 ng
CutSmart	10X	10X	10X
KpnI-HF (NEB #R3142)	1U	1U	2U
NheI-HF (NEB #R3131)	1U	1U	2U
Nuclease-Free Water	40 µl'ye tamamlandı	40 µl'ye tamamlandı	40 µl'ye tamamlandı

37⁰C'de gece boyu inkübasyon

Enzim kesimi sonrası bir kez daha purifikasyon yapıldıktan sonra elde edilen uygun insert ve vektör DNA'ların konsantrasyonları Nanodrop cihazında ölçülüp devamında ligasyon reaksiyonu (oda sıcaklığında 2 saat veya 16⁰C'de gece boyu inkübasyonu) ile bir araya getirilmiştir. Ligasyon ürününü kullanarak Tablo 3.7'deki protokole uygun olarak kompetan bakterilerin transformasyonları yapılmıştır.

Tablo 3.7. Ligasyon reaksiyonu koşulları

RXN (20 µl)	(-)	Test (1:7)	Kontrol (1:7)
T4 DNA ligase buffer (NEB)	10X	10X	10X
Vector DNA	50 ng	50 ng	50 ng
Insert DNA (test/ctrl)	-	350 ng	350 ng
T4 DNA ligase (NEB)	2,5U	2,5U	2,5U
Nuclease-Free Water	20 µl'ye tamamlandı	20 µl'ye tamamlandı	20 µl'ye tamamlandı

18⁰C'de gece boyu inkübasyon

Elde edilen plazmitlerin, ilgilenen bölgeyi taşıyıp taşımadığını kontrol etmek amacıyla boş vektörü 3 noktadan kesen ancak ilgilenen dizide kesim bölgesi olmayan bir tip II restriksiyon endonükleaz olan Avr II enzimi kontrol kesimleri için seçilmiş ve Tablo 3.8'deki koşullarda enzim kesim reaksiyonu oluşturulmuştur. Devamında boş vektör ile klonlama yapılan vektörler arasındaki boyut farkı jel elektroforezde yürütülerek belirlenmiştir.

Tablo 3.8. Klonlama başarısının testi için enzim kesimi reaksiyonu koşulları

RXN (20 µl)	Boş Vektör (484 ng/µl)	T1 (343 ng/µl)	T2	T3	T4	C1 (435 ng/µl)	C2	C3	C4
Template DNA	2400 ng	2000 ng	2000 ng	2000 ng	2000 ng	2000 ng	2000 ng	2000 ng	2000 ng
CutSmart (NEB)	10X	10X	10X	10X	10X	10X	10X	10X	10X
Avr II (NEB #R0174)	1U	1U	1U	1U	1U	1U	1U	1U	1U
N-Free Water	20 µl'ye tamamlandı	20 µl'ye tamamlandı	20 µl'ye tamamlandı	20 µl'ye tamamlandı	20 µl'ye tamamlandı	20 µl'ye tamamlandı	20 µl'ye tamamlandı	20 µl'ye tamamlandı	20 µl'ye tamamlandı

Klonlama sonucu elde edilen DNA'lar Tablo 3.9'daki reaksiyon koşullarında gerçekleştirilen DNA dizi analizi ile de doğrulanmıştır;

Tablo 3.9. Klonlama başarısının testi için dizi analizi reaksiyonu koşulları

RXN (10 µl)	Test Fwd	Test Rev	Kontrol Fwd	Kontrol Rev
Sequencing Buffer	5X	5X	5X	5X
BigDye Terminator v3.1	0.5 µl	0.5 µl	0.5 µl	0.5 µl
Primer	3.3 pmol/l	3.3 pmol/l	3.3 pmol/l	3.3 pmol/l
Template DNA	800 ng	800 ng	800 ng	800 ng
Nuclease-Free Water	10 µl'ye tamamlandı	10 µl'ye tamamlandı	10 µl'ye tamamlandı	10 µl'ye tamamlandı

94°C 5 dk

94°C 15 sn

50°C 15 sn x25

60°C 4 dk

60°C 1 dk

4°C ∞

3.7.3 Transformasyon

Ligasyon ürünlerinin miktarını çoğaltmak ve gelecekte planlanacak hücreye transfeksiyon deneylerinde kullanabilmek için transformasyon deneyleri gerçekleştirilmiştir. Bunun için yüksek transformasyon etkinliği olan *recA1*, *endA1*, *lacZΔM15 knockout DH5α E.coli* suşu kullanılmıştır. Stoktan alınan 20µl'lik kompetan bakteri solüsyonu çözülüp üzerine hacmin %5'ini geçmeyecek kadar (her bir tüp için 0.7 µl) ligasyon ürünü eklenmiştir. Ligasyon ürünü eklenmeden önce 5 dk buz üzerinde inkübe edilmiştir. Elde edilen karışım 37°C'ye alınmış olan bakteri kültür petrilere üzerine boncuklarla yayılarak eklenmiş ve 5 dk 37°C'lik inkübatörde bekletilmiştir. Sonrasında ters çevrilip 16 saat süreyle bekletilmiştir. Süre sonunda petrileredeki koloni sayıları incelenmiştir.

İnkübasyon sonrası büyüyen koloniler içerisinde, diğer kolonilerden uzak olan, koloni morfolojisi düzenli olan ve satellite oluşturmamış, test ve kontrol petrilere ait dörder koloni pipet ucuyla alınarak 2 ml LB solüsyonu + 1x karbenisilin (37°C'de yarı ömrü daha uzun olduğu için ampisilin yerine tercih edilmiştir) içeren 15'lik falkonlara alınmış ve 16 saat süreyle çalkalamalı inkübatörde bekletilmiştir. İnkübasyon sonrası falkon tüplerdeki solüsyonların bulanık renkte olup olmadığı izlenmiştir.

3.7.4 Mini-prep ile Kompetan Bakterilerden DNA İzolasyonu

Klonlama deneyleri sonrasında örnekler 2 ml'lik tüplere alınmış, bir kısmına yaklaşık 500 µl gliserol eklenerek -80°C'de depolanırken diğerleri kompetan bakterilerden DNA izolasyonu amacıyla mini-prep protokolüne alınmıştır. Mini-prep için *Wiz Prep Plazmid DNA Kit* kullanılmıştır. Tavsiye edilen protokole göre;

- 1- Bakterilerin dibe çökmesi için örnekler 7900g'de 5 dk santrifüj edilmiş ve üstte kalan tabaka atılmıştır.
- 2- Üzerine 200 µl Buffer PD1 eklenmiş ve vortekslenerek pellet solüsyon içerisinde dağıtılmıştır.
- 3- Ortamı asidik hale getirip lizisin sağlanması için üzerine 200 µl Buffer PD2 eklenmiş ve tüm DNA tampon ile temas etsin diye 10 kez alt-üst yapılmış, 1 dk beklenmiştir.
- 4- Ortamı nötralize edip lizisi durdurmak için üzerine 300 µl Buffer PD3 eklenmiş ve tüm DNA tampon ile temas etsin diye 10 kez ters yüz edilmiştir.
- 5- Pelleti solüsyondan ayırmak için 13000g'de 10 dk santrifüj edilmiştir.

- 6- Üstte kalan tabaka kolona alınarak 13000g'de 1 dk santrifüj edilmiş ve kolondan geçen kısım atılmıştır.
- 7- Üzerine 600 µl etanol içeren Wash Buffer eklenmiş ve 13000g'de 1 dk santrifüj edilmiştir. Bu işlem iki kez tekrarlanmıştır.
- 8- Etanolü uzaklaştırmak için kolondan geçen kısım atılıp 13000g'de 1 dk boş santrifüj edilmiştir.
- 9- Alttaki hazne atılıp kolonlar 2 ml'lik tüpler üzerine alınmış ve üzerine 50 µl elüsyon tamponu eklenerek 3 dk beklenmiştir.
- 10- 13000g'de 1 dk santrifüj edilmiş ve kolon atıldıktan sonra Nanodrop cihazında DNA konsantrasyonu ölçülmüştür.

3.7.5 Midi-prep ile DNA Konsantrasyonunun Artırılması

Mini-prep sonrası elde edilen DNA konsantrasyonları transfeksiyon deneyleri için düşük miktarda kalabilir düşüncesiyle kompetan bakteriler içerisinde yer alan ve LB'de çoğaltılmış olan DNA örnekleri bu kez midi-prep ile saflaştırılmıştır. Bunun için *Zymo Midi-Prep Kiti* ile aşağıdaki protokol uygulanmıştır:

1. LB'deki 50 ml'lik bakteri kültürü örnekleri, hücre peletini çöktürüp toplamak için 3.400g'de 10 dk santrifüj edilmiştir. Üstte kalan kısım atılmıştır.
2. Üzerine 8 ml ZymoPURE P1 solüsyonu (kırmızı) eklenmiş ve pipetlenip vorteksenerek toplanmıştır.
3. Üzerine 8 ml ZymoPURE P2 (mavi) solüsyonu eklenip alt üst yapılarak karıştırılmış ve 2-3 dk süreyle, hücreler tamamen lizise uğrayıp solüsyon berrak, mor ve visköz hale gelene kadar oda sıcaklığında beklenmiştir.
4. Üzerine 8 ml ZymoPURE P3 (sarı) eklenmiş ve solüsyon sarı renge gelene kadar (5-6 kez) ters çevrilerek karıştırılmıştır. Sarı renk görülünce nötralizasyonun tamamlandığı varsayılmıştır.
5. ZymoPURE Syringe Filter-X'in altına Luer Lock takılarak hazırlanmış ve lizat üzerine eklenip çökelti yüzeye çıkana kadar (5-8 dk) beklenmiştir.
6. Şırınganın altındaki Luer Lock çıkarılmış ve 50 ml'lik bir rezervuar tüpe yerleştirilmiştir. Sonrasında 20 ml lizat şırıngadan bir kerede ve kesintisiz geçecek şekilde solüsyon gönderilmiştir.
7. Üzerine 8 ml ZymoPURE Binding Buffer eklenmiş ve tüp 8 kez alt üst edilerek karıştırılmıştır.

8. Zymo-Spin V-PS Kolon ve destekleyici parçaları üzerindeki rezervuar çıkarılıp Reservoir-X ve Zymo-Spin V-PS Kolon birleştirilip 50 ml'lik tüpe yerleştirilmiştir.

9. Reservoir-X/Zymo-Spin V-PS Kolon Kombinasyonuna 10 ml'lik lizat karışımı eklenip 500g'de 2 dk santrifüj edilmiştir. Sonrasında 50 ml'lik tüp boşaltılıp eldeki tüm lizat bitene kadar bu işlem tekrarlanmıştır.

9. 5 ml ZymoPURE Wash-1, Zymo-Spin V-PS Kolon Kombinasyonuna eklenmiş, 500g'de 2 dk santrifüj edilmiş ve kolondan geçen kısım atılmıştır.

10. Kolon kombinasyonuna bu kez 5 ml ZymoPURE Wash-2 eklenip 500g'de 2 dk santrifüj edilmiştir.

11. Reservoir-X, Zymo-Spin V-PS Kolon Sisteminden çıkarılıp atılmış ve kalan sistem bir toplama tüpüne yerleştirilip kalan yıkama tamponunu uzaklaştırmak için 16,000g'de 1 dk santrifüj edilmiştir.

12. Zymo-Spin V-PS Kolonu 1.5 ml'lik tüpe yerleştirilip üzerine 200 µl ZymoPURE Elution Buffer eklenmiş, oda sıcaklığında 2 dk inkübe edilmiş ve 16,000g'de 1 dk santrifüj edilmiştir.

Midi-prep sonrası Nanodrop cihazı ile DNA konsantrasyonları ölçülmüştür.

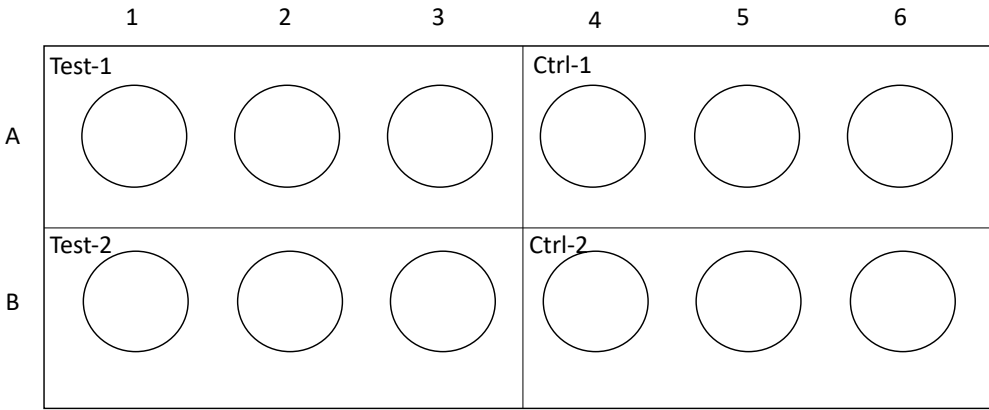
3.8 Osteosarkom Hücre Kültürü

İlgilenilen bölgenin önemli transkripsiyon faktörlerini içermesi ve güçlü *RSPO4* ifadesine sahip olması nedeniyle luminesens ışımalarının değişeceği düşünüldüğünden deneyde Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Öğretim Üyesi Prof. Dr. Kezban Ulubayram'dan temin edilen SaOs-2 insan osteosarkom hücre hattı (ATCC, HTB-85) kullanılmıştır. Hücrelerin kültür kabına ekimi esnasında McCoy 5A hücre kültür ortamı, %10 Fetal Bovine Serum, %1 L-Glutamin, %1 Penisilin-Streptomisin kullanılmış ve 37°C'de %5 CO₂ koşullarındaki inkübatörde idame edilmiştir.

3.9 Transfeksiyon

DNA örnekleri SaOs-2 hücrelerine Lipofectamine 3000 transfeksiyon ajanı kullanılarak transfekte edilmiştir. Transfeksiyonun yapılmadığı bir grup hücre de negatif kontrol olarak

kullanılmıştır. Transfeksiyon deneyi iki biyolojik ve üç teknik tekrar hazırlanarak Şekil 3.10'deki plana göre gerçekleştirilmiştir.



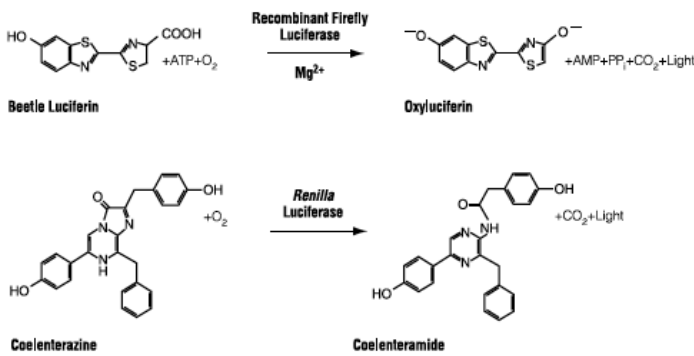
Şekil 3.10. Transfeksiyon deney planı

Transfeksiyon öncesi hücreler 24 kuyucuklu plakalara aktarıldıktan sonra 24 saat beklenip hücrelerin kuyucuk tabanında %70-90 oranında konfluent olmaları sağlanmıştır. Hücreler hazırlandıktan sonra transfeksiyon için gerekli işlemler laminar flow kabini altında gerçekleştirilmiştir. Bunun için önce Lipofectamine, Opti-MEM mediumu içerisinde dilüe edilmiştir (25 µl medium için 0,75 µl Lipofectamine 3000). Transfekte edilecek DNA örneği de Opti-MEM içerisinde dilüe edilip (50 µl medium için 1 µg DNA) üzerine P3000 Reagent eklenmiştir. Üçüncü aşamada ise Opti-MEM içerisinde dilüe edilen Lipofectamine ve DNA örnekleri eşit oranda bir araya getirilmiştir (25 µl dilüe lipofectamine ile 25 µl dilüe DNA). Örnekler DNA konsantrasyonlarının %10'u kadar yeşil fluoresan proteini (GFP) eklenerek transfeksiyonun ışık mikroskopunda da takibi hedeflenmiştir. Oda sıcaklığında 15 dk'lık inkübasyonu takiben 50 µl'lik DNA-lipofectamine karışımı kuyucuklardaki hücrelere verilmiş ve plakalar 37°C'de 48 saat süreyle inkübe edilmiştir. Sonrasında hücreler fluoresan mikroskop altında incelenip transfeksiyon etkinliği değerlendirilmiştir. Transfeksiyon sonrası 48. saatte hücreler lizis tamponu ile toplanmış ve toplanan lizatlar -80°C'de dondurulmuştur.

3.10 Lusiferaz Aktivasyonunun Kantitasyonu

Lusiferaz içeren plazmitler (*Firefly*) ve internal kontrol olarak da Renilla kontrol plazmitleri (*Renilla reniformis* lusiferaz (pRL-TK))'nin transfeksiyonu gerçekleştirildikten sonra lusiferaz deneyi *Dual Reporter Assay* sistemi (Promega, WI, USA) kullanılarak

gerçekleştirilmiştir. *Dual Reporter Assay*'in başlangıcında hücreler pasif lizis tamponu eklenerek hücre lizatları elde edilmiş ve ardından lizatlar üzerine ilk olarak Luciferase Assay Reagent II (LAR II) eklenerek stabil bir luminesens sinyali oluşturulmuştur. Bu sinyal Mg^{2+} varlığında *Firefly* plazmitindeki lusiferaz enziminin hücredeki lusiferin substratını kullanması sonucunda foton emisyonunun artması ile ortaya çıkmaktadır. Bu sinyalin ölçümünü takiben aynı örnekler üzerine Stop & Glo. Reagent eklenerek *Renilla reniformis* lusiferaz için stabil sinyal elde edilmiş ve luminometrede (Spectramax iD3 multi-mode microplate reader, Molecular Devices, LLC, CA, USA) ölçülmüştür. *Renilla reniformis* lusiferaz ise hücredeki coelenterazine substratını coelenteramide dönüştürdüğünde foton emisyonu artmakta ve ışığa vermektedir (Şekil 3.11). Deneyler en az üç teknik tekrarlı iki biyolojik olarak bağımsız deney şeklinde gerçekleştirilmiştir. Deneysel sonucunda gerçekleşen biyoluminesens ışımaya değerinin yüksek ya da düşük olmasına göre putatif düzenleyici dizinin gen ifadesini hızlandırıcı veya repressör etkisi olduğu belirlenmiştir.



Şekil 3.11. Firefly ve Renilla Lusiferazları tarafından katalize edilen reaksiyonlar

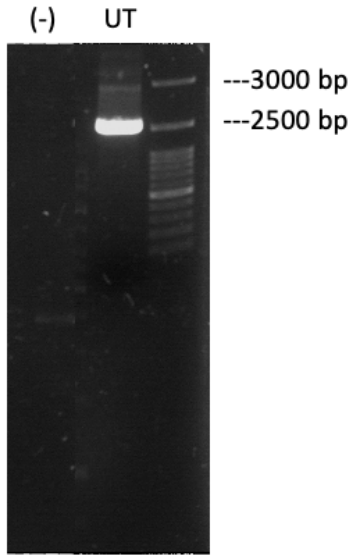
3.11 Verilerin Analizi

Verilerin değerlendirilmesinde istatistik programı olarak *IBM Statistical Package for the Social Sciences (SPSS)* yazılımı kullanılmıştır. Bonferroni düzeltilmeli ANOVA veya eşleşmemiş veriler için student t test kullanılmıştır. 0,05'ten küçük p değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

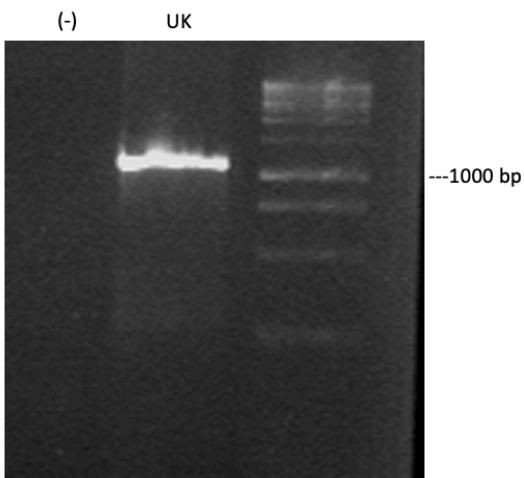
4. BULGULAR

4.1 Putatif Hızlandırıcı Test ve Kontrol Bölgelerinin PCR Amplifikasyonu

Yöntem bölümünde belirtilen reaksiyonlar sonucunda test ve kontrol dizilerini içeren uzun DNA bantlarının PCR amplifikasyonları elektroforez görüntüleri ile doğrulanmıştır (Şekil 4.1 ve 4.2).

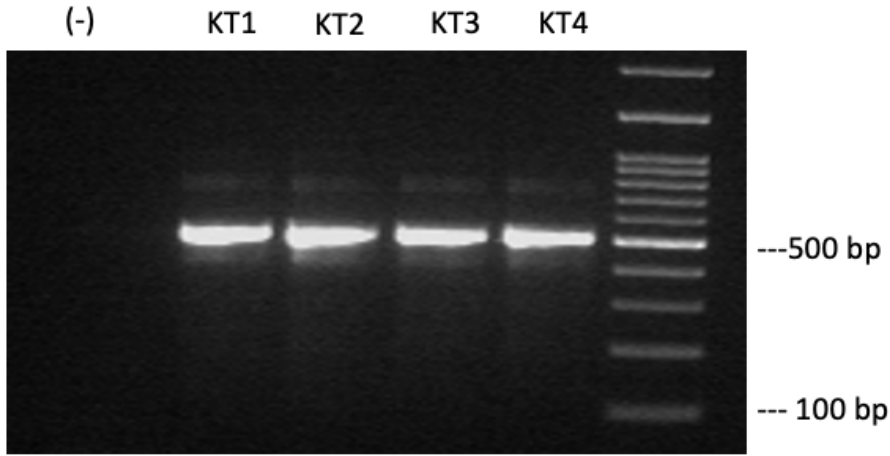


Şekil 4.1. 2607 bp uzunluğunda olduğu bilinen ve putatif test bölgesini içeren uzun bandın PCR sonrası elektroforez görüntüsü

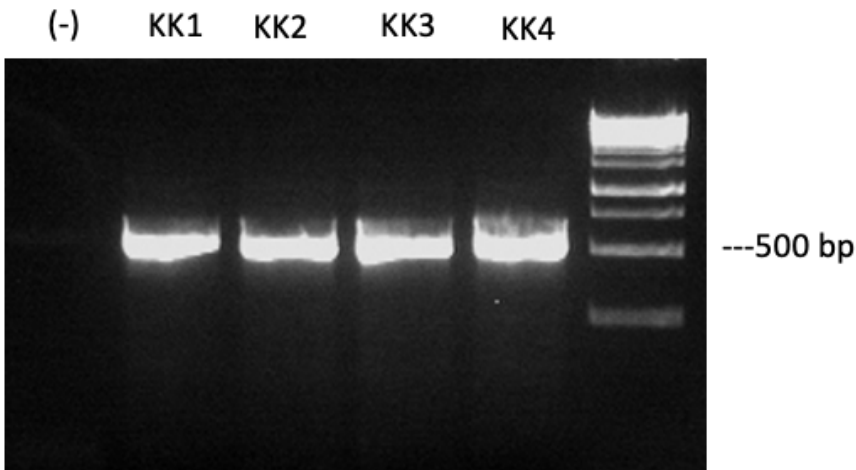


Şekil 4.2. 1070 bp uzunluğunda olduğu bilinen ve kontrol bölgesini içeren uzun bandın PCR sonrası elektroforez görüntüsü

Uygun primerler kullanılarak gerçekleştirilen PCR amplifikasyon reaksiyonu sonucunda putatif bölge ve kontrol bölgesi ile uzunluğu uyumlu olan bantlara sahip sonucu elektroforez ile doğrulanan dörder adet PCR ürünü (T1, T2, T3, T4 ve K1, K2, K3, K4) elde edilmiştir (Şekil 4.3 ve 4.4).



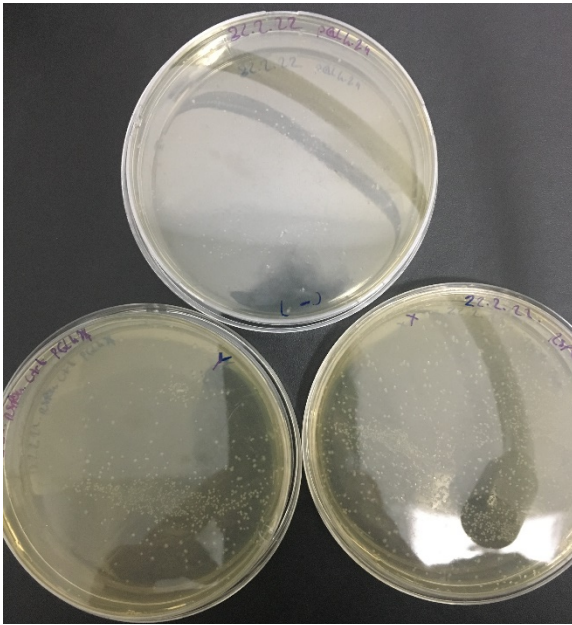
Şekil 4.3. 530 bp uzunluğunda olduğu bilinen, putatif test dizisine ait PCR ürününün elektroforez görüntüsü



Şekil 4.4. 534 bp uzunluğunda olduğu bilinen, kontrol dizisine ait PCR ürününün elektroforez görüntüsü

4.2 PCR Ürünlerinin *Reporter Gen Plazmitine Klonlanması*

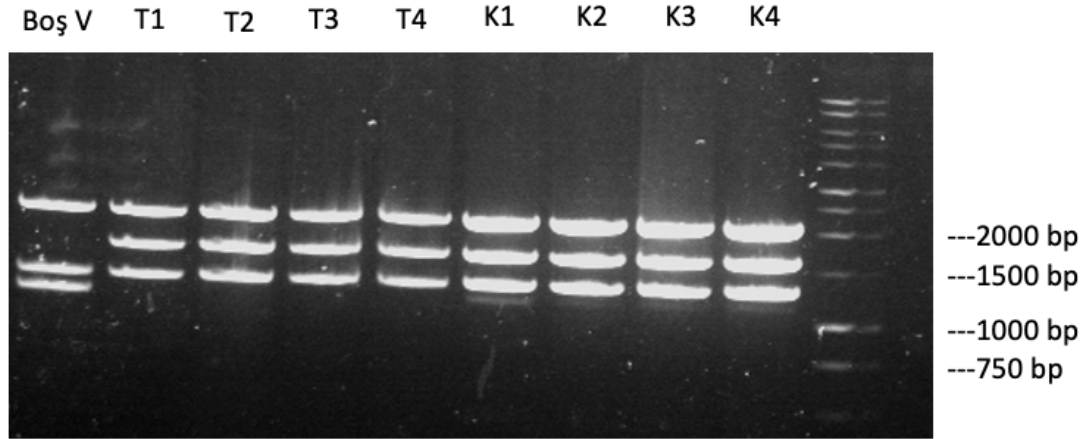
Saflaştırma sonrası test örneği için 25 ng/μl, kontrol örneği için 50 ng/μl konsantrasyonda DNA elde edilmiştir. Bu örneklerin enzim kesimi yapılarak klonlamada kullanımına karar verilmiştir. Kesilen DNA fragmanlarının klonlanacağı plazmit pgL 4.24 Dr. Arne Schafer (Charite University of Medicine-Berlin)'den temin edilmiştir. KpnI ve NheI restriksiyon enzimleri kullanılarak gece boyu inkübasyon yoluyla gerçekleştirilen enzim kesim reaksiyonu sonrası örnekler bir kez daha saflaştırılıp DNA konsantrasyonları ölçülmüş ve test örneği için 25 ng/μl, kontrol örneği için 26 ng/μl ve vektör için 38 ng/μl konsantrasyonlar tespit edilmiştir. Bu örneklerle ligasyon deneylerine geçilmiştir. T4 ligaz protokolü ile 16⁰C'de gece boyu inkübasyonla gerçekleştirilen ligasyon ürünü kompetan bakteri içeren petrilere yayılıp 16 saatlik inkübasyon sonrası petrilere koloni formasyonları gözlenmiştir (Şekil 4.5).



Şekil 4.5. Kompetan bakterilere transformasyon sonrası koloni oluşumu

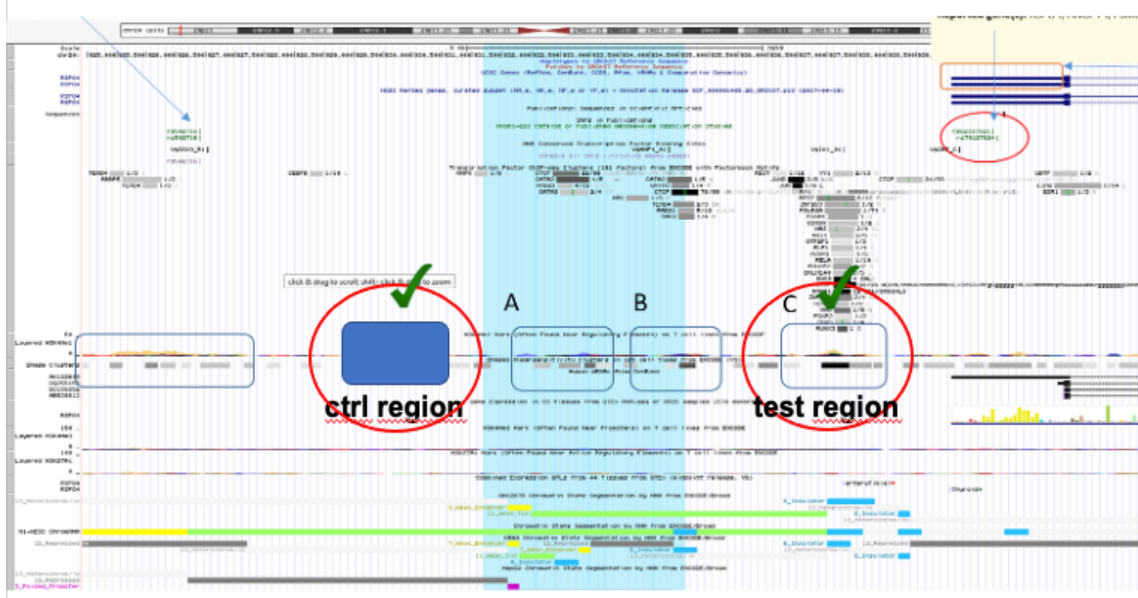
Test ve kontrol petrilere alınmış LB solüsyonu + karbenisilin ile 16 saat süreyle inkübe edilen tüm falkonlardaki solüsyonların bulanık renkte olduğu gözlenmiştir. Klonlama deneyleri sonrasında mini-prep yöntemiyle izole edilen test örneğinde 343 ng/μl, kontrol örneğinde 435 ng/μl DNA konsantrasyonu olduğu tespit edilmiştir. İzole edilen DNA örneklerinden klonlama sürecinin doğrulanması amacıyla Avr II enzimiyle uygulanan enzim kesimi işlemi reaksiyonu

sonunda klonlamanın olduğu örneklerde enzim DNA'yı boş vektörde toplam 2500-2600 bp büyüklükte üç fragmana ayırırken diğer gruplarda toplam fragman büyüklüğünün 3000-3100 bp civarında olduğu görülerek incelenen çembersel DNA'lara klonlamanın gerçekleştiği doğrulanmıştır (Şekil 4.6).



Şekil 4.6. İzole edilen DNA'lardan klonlamanın doğrulanması için yapılan enzim kesimi reaksiyonunun jel elektroforez görüntüsü

Ayrıca örneklerden DNA dizi analizi de yapılmış ve klonlanan bölgelerdeki dizilerin klonlanması hedeflenen fragmanlara ait referans dizilerle uyumlu olduğu görülmüştür. Tüm bu bulgular incelenen test ve kontrol DNA dizilerinin *reporter* gen plazmitine başarı ile klonlandığını göstermiştir. Proje kapsamında klonlanan bölgelerin yer aldığı alanlar özet olarak Şekil 4.7'de gösterilmiştir.

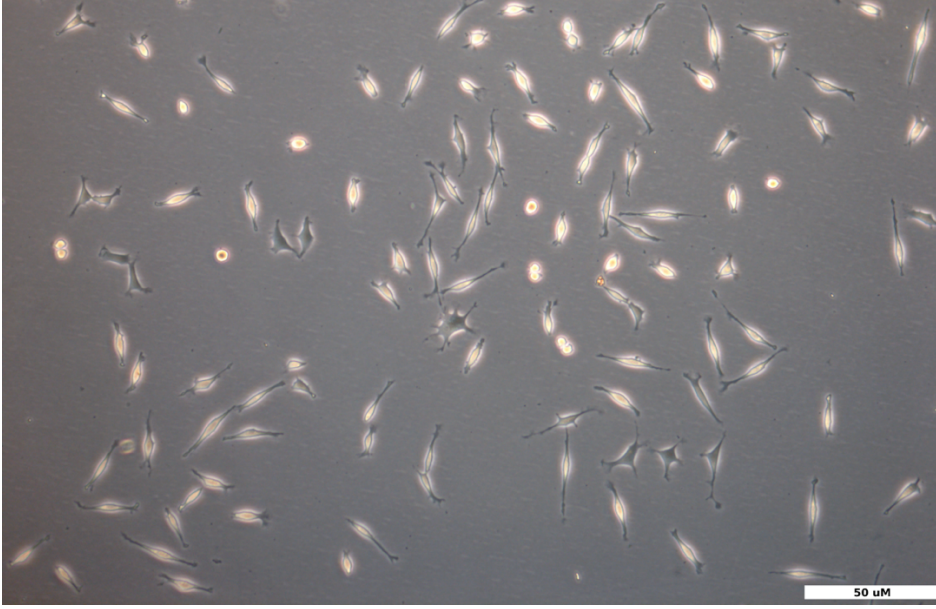


Şekil 4.7. Reporter gen plazmidine klonlaması tamamlanan test ve kontrol bölgeleri

Mini-prep sonrası test örneğinde elde edilen 343 ng/µl ve kontrol örneğinde elde edilen 435 ng/µl DNA konsantrasyonları transfeksiyon deneyleri için düşük miktarda kalacağı için kompetan bakteriler içerisinde yer alan ve LB'de çoğaltılmış olan DNA örnekleri bu kez midi-prep ile saflaştırılmış ve test ve kontrol örnekleri için 753 ng/µl ve 812 ng/µl konsantrasyonda DNA elde edilmiştir.

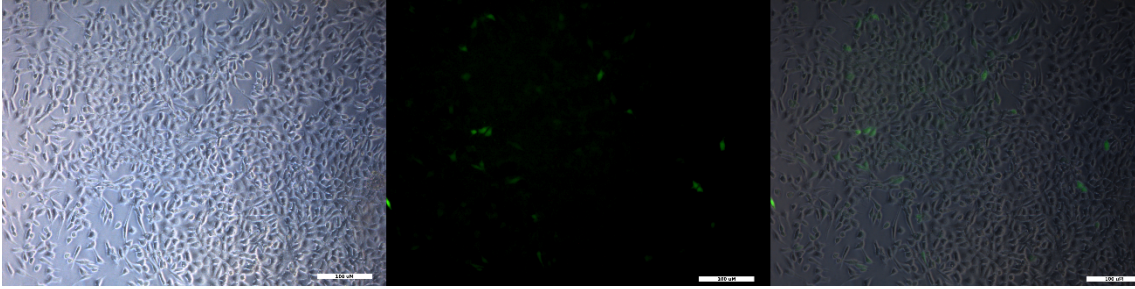
4.3 Hücre Kültürü ve Transfeksiyon

Ekimi yapılan SaOs-2 osteosarkom hücrelerinin kabın tabanına tutunduğu ve çoğaldığı ışık mikroskobu ile doğrulanmıştır (Şekil 4.8). Transfeksiyon öncesi 24-kuyucuklu kültür kaplarının her bir kuyucuğu için hücrelerin %70-90 arasında yoğunluğa ulaştığı gözlenmiştir.

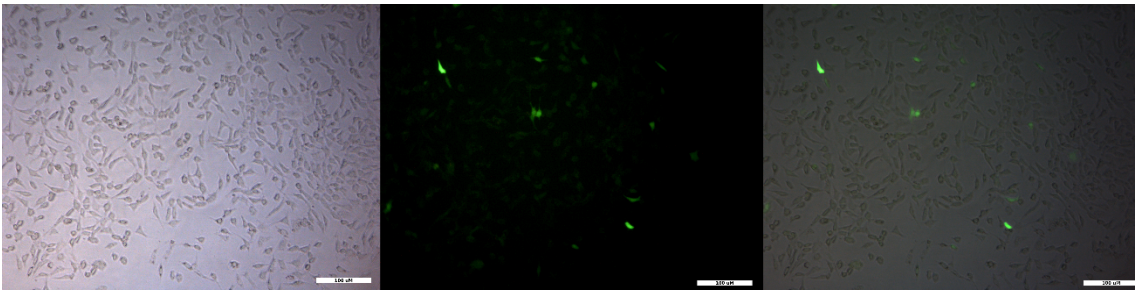


Şekil 4.8. Ekim sonrası kültür kabına tutunan SaOs-2 hücreleri

SaOs-2 hücrelerine Lipofectamine 3000 transfeksiyon ajanı kullanılarak yapılan transfeksiyonun ışık mikroskobu altında incelenen etkinliği hem test hem de kontrol örnekleri için %40 civarında bulunmuştur (Şekil 4.9 ve 4.10).



Şekil 4.9. Test plazmitine ait hücre ve transfeksiyon etkinliği görüntüsü



Şekil 4.10. Kontrol plazmitine ait hücre ve transfeksiyon etkinliği görüntüsü

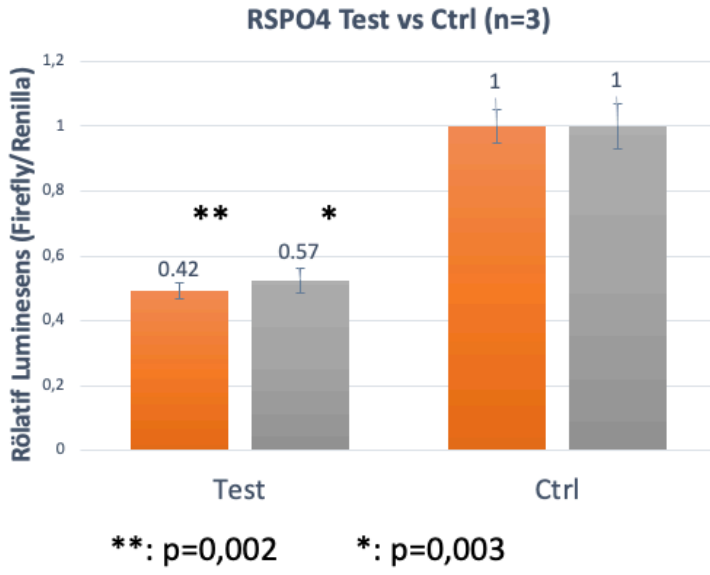
Yapılan tüm biyolojik ve teknik tekrarlarda hem transfeksiyon DNA içeriğinin 1/10'unu içeren renilla hem de 9/10'unu içeren *firefly luciferaz* aktiviteleri tespit edilmiştir. Geçici transfeksiyon ile yapılan bu çalışmada kontrol ve test bölgeleri hem birbirlerine hem de deneysel kontrol olan renilla'ya oranlandığı için bu transfeksiyon etkinliği yeterli bulunmuştur.

4.4 Lusiferaz Aktivasyonunun Kantitasyonu

Lusiferaz içeren plazmitler (*Firefly*) ve Renilla internal kontrol plazmitleri (*Renilla reniformis* lusiferaz (pRL-TK))'nin transfeksiyonu sonrası *Dual Reporter Assay* sistemi kullanılarak gerçekleştirilen lusiferaz aktivasyon deneyi sonucunda putatif test bölgesindeki ışım miktarı (relative luminesans unit) kontrol bölgesine göre yaklaşık ½ oranında daha az ölçülmüştür (Tablo 4.1, Şekil 4.11).

Tablo 4.1. Test ve kontrol gruplarına ait lusiferaz aktivitesi sonuçları

Rölatif luminesans		Firefly/Renilla Oranı	Firefly/Renilla Oranı (Ort.)
Test 1-1	A1	546780	
Test 1-2	A2	7350690	5930690
Test 1-3	A3	4973580	
Kontrol 1-1	A4	16656190	
Kontrol 1-2	A5	13786470	14185080
Kontrol 1-3	A6	12112580	
Test 2-1	B1	7289040	
Test 2-2	B2	5834950	6622490
Test 2-3	B3	6743470	
Kontrol 2-1	B4	10218980	
Kontrol 2-2	B5	11108950	11543620
Kontrol 2-3	B6	13302930	



Şekil 4.11. Test ve kontrol gruplarına ait lusiferaz aktivitesi sonuçları (turuncu ve gri renkler farklı biyolojik tekrarları temsil etmektedir)

5. TARTIŞMA

Genetik ve çevresel faktörler tarafından düzenlenen, immunoinflamatuar bir hastalık olan periodontitise yatkınlıkta rolü olduğu gösterilen *GLT6D1*, *DEFA1A3*, *SIGLEC5*, *NPY*, *PF4/PPBP/CXCL5*, *ANRIL*, *CAMTA1/VAMP3* ve *PLG* gibi çok sayıda gene ait varyant mevcut iken periodontitise direnç ile ilişkili olduğu ifade edilen *MMP20*, *PAPLN*, *FBN2*, *CALB1* ve *RSPO4* gibi genlerde yalnızca birkaç adet varyant bulunmaktadır (6). Varyanta sahip bu genlerden *MMP20*'nin kodladığı Mmp20 proteini periodontal dokularda Tımp-2 ile birlikte kollagen yıkımını azaltıp agrekan gibi bağ dokusuna ait proteoglikanların oluşumunu arttırarak doku kaybını baskılamaktadır (92) ve artmış ifadesi ile azalmış periodontal yıkım arasındaki ilişkiyi gösteren bir aday gen analizi çalışması da mevcuttur (93). *FBN2* tarafından kodlanan fibrillin-2 proteini ise elastik lif oluşumunda görev almakta ve azalmış *FBN2* ifadesi fibrillin-2'nin Mmp-2 tarafından enzimatik yıkımını arttırmaktadır (94). *CALB1* ise dişler aşırı kuvvete maruz kaldığında diş çevresindeki epitelyal hücrelerdeki calbindin proteininin oluşumunu arttırarak periodontal yıkımı azaltmaya çalışmaktadır (95). *RSPO4*'ün ise periodontal hastalıkla ilişkisini açıklayan kısıtlı bilgi mevcuttur. 2007 yılında fare diş gelişimini *mikroarray* yöntemiyle inceleyen bir araştırmada *Rspo4* transkriptlerinin diş gelişimi ile ilişkili olduğu ve dolayısıyla *Rspo4*'ün periodontal dokular üzerinde etkisi olabileceğine dair en erken bulgular rapor edilmiş (90) ve 11 yıl sonra yayınlanan bir tüm ekzom dizileme çalışması da bu bulguyu desteklemiştir (96). Her ne kadar diş gelişiminde hem Wnt hem de beta-catenin yolakları görevli olsa da beta-catenin lokalizasyonunun *Rspo4*'den farklı olması nedeniyle diş gelişimi sırasında oluşan hücre-hücre etkileşiminin dental papilla-iç dental epitel sınırında rolü olduğunu düşündürmüştür (97,98). Ancak bu rolü genin susturulması/aktifleştirilmesi yoluyla veya başka bir mekanizmayla açıklayacak herhangi bir araştırma henüz yapılmamıştır. 2021 yılında de Coo ve ark (10) evre III/IV C dereceli periodontitise sahip İspanyol popülasyonda yaptıkları genom boyu ilişkilendirme çalışmasında, içerisinde *RSPO4*'ün de yer aldığı yedi gendeki (*CNTN2*, *FBXO44*, *APIM2*, *RSPO4*, *KRII*, *BPIFB1* ve *INMT*) varyasyonların periodontitise yatkınlıkta rol oynadığını ortaya koymuştur. Bu sonuç *RSPO4* gen regülasyonunun *P.gingivalis* kaynaklı periodontal yıkıma dirençte rol oynadığını düşündüren çalışmanın (6) sonuçlarından farklı görünmektedir. Bunun sebebi genin hastalığın aktif veya pasif dönemlerinde değişen ifadesi ile ilgili olabilir. Ayrıca de Coo ve ark (10)'nın yaptığı Sekans Kernel Asosiasyon Testi analizi sonuçları *RSPO4*'ün periodontitise olası ilişkisine ait olasılık düzeyinin multiple-test correction düzeyinin altında

kaldığını göstermiştir. Tüm bu bilgiler ışığında *RSPO4*'ün periodontal hastalığa yatkınlıkta veya direnç üzerinde rolü olduğu barizdir ancak hangi yönde etkisi olduğu henüz kanıtlanamamıştır ve rolünün aydınlatılması için daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır. Literatürde *RSPO4* genine ait düzenleyici bölge olarak tarif edilmiş ve çalışılmış bir DNA dizisi bulunmamaktadır. Dolayısıyla mevcut araştırmada seçilen bölge bu açıdan özgün değere sahiptir. Her ne kadar *RSPO4* geninin yakınlarında bu genin regülasyonundan sorumlu olabilecek başka bölgeler bulunsa da bu bölgelerden bazıları araştırmada çalışılan bölge kadar yüksek DNaz I aşırı duyarlılığı olmaması veya periodontal hastalıkta rol potansiyeli düşük genlere yakın olması nedeniyle adı geçen bölge putatif bir düzenleyici olarak seçilmiştir.

Araştırma sonunda periodontal hastalığa dirençte rolü olduğu düşünülen *RSPO4* geni üzerinde düzenleyici rolü olduğu düşünülen DNaz I aşırı duyarlı bölgenin repressör etkisi olduğu bulunmuştur. İlgili bölgede var olan tek nükleotit polimorfizmleri bu bölgenin gen ifadesi üzerindeki etkisi açısından kritik öneme sahiptir. 1000Genome tek nükleotit varyasyon listesi referans alındığında ilgili putatif bölge içerisindeki rs142452567, rs559800918, rs575220304, rs111622683, rs369397354, rs369397354, rs59792907, rs531275, rs531356, rs528516028, rs188848390, rs565098743 lokalizasyonlarında tek nükleotit polimorfizmleri olduğu tespit edilmiştir. Ancak bu polimorfizmlerin birçoğu ile ilgili araştırma sonucu bulunmadığının yanı sıra ClinVar ile yapılan fenotipik etki değerlendirmesinde herhangi bir hastalık ya da klinik durumla ilişkilendirilmiş bir polimorfizm de bulunamamıştır. Dolayısıyla *in vitro* mutagenез ile varyasyonların oluşturulduğu fonksiyonel analizler ve vaka kontrol çalışmaları bu polimorfizmlerin ilgili bölgenin gen ifadesi üzerindeki etkilerinin anlaşılmasına yardımcı olacaktır.

Periodontal hastalığa yatkınlık veya dirençte rolü olan varyantların anlaşılması bu genlerin ve düzenleyici bölgelerini hastalığın tedavisinde birer potansiyel ilaç hedefi haline getirmektedir. Ancak bu konudaki denemeler gerek hastalığın karmaşık patofizyolojisi hem de tedavinin eş zamanlı predispozan faktör eliminasyonu gerektirmesi nedeniyle sınırlı kalmıştır (99). Ancak *RSPO*'ların hedef ilaç olarak kullanımına ilişkin denemeler mevcuttur. *RSPO4* ve diğer tüm *RSPO*'lar Wnt sinyal yolağını aktive etmek için LGR4-6'nın ligandları olarak fonksiyon görmekte ve ligandlara bağlanma sırasında oluşan *RSPO*-LGR4 kompleksi Wnt reseptörlerini yıkıma uğratabilmeleri için ubiquitinleyen iki adet E3 ligaz olan RNF43 ve ZNRF3'ün fonksiyonunu inhibe etmektedir (8,9,100,101). Bu mekanizma sonucunda daha güçlü Wnt reseptör sinyali

oluşmaktadır (102,103). RSPO-LGR5 kompleksi ise Wnt sinyalini farklı bir mekanizma ile artırmakta ve RSPO4 her ne kadar LGR5'e bağlansa da LGR5-aracılı Wnt sinyalini aktifleştirememektedir (104). RSPO'lar üç LGR'ye de yüksek afinite ile bağlandığı için Cui ve ark (105) LGR ile bağlanmanın devamlılığını Wnt sinyalini aktifleştirmeden sağlayan RSPO mutant bir proteine ait ilaç konjügelininin LGR ifadesi olan herhangi bir kanser hücrelerini hedef alarak bu hücrelerin plastisitesini değiştirebileceğini göstermiştir.

Nitekim R4Fu-p.Q65R peptit yapısı hem LGR4 hem de LGR5'i Wnt sinyalini aktifleştirmeden bağlamayı başarmış ve mutant versiyonu da Wnt sinyali için LGR4/5'e ihtiyaç duyan RSPO'ların fonksiyonunu kompetitif olarak inhibe etmiştir (105). Ayrıca LGR4/5 tamamen bağımlı olmayan RSPO2 ve RSPO3'ü kısmen bloke etmiştir. Bu molekül ayrıca RSPO4-Fu peptid-ilaç konjügelini ile LGR ifadesi yüksek olan kanser hücre hatlarının çoğalmasını inhibe etmiştir. *In vivo* ortamda bu peptit yapısı belirgin (%70-80) anti-tümör etki göstermiş ve sağkalımı arttırmıştır. Her ne kadar periodontitis çok faktörlü ve kompleks bir hastalık olsa da bu bilgiler RSPO4'ün gelecekte başka varyantlar ile bir arada periodontitis tedavisi için bir ilaç hedefi olabileceğini düşündürmektedir. Böyle bir durumda araştırmamızda gen ifadesini yavaşlattığı belirlenen bölgenin ifadesi baskılanarak RSPO4 ifadesi artırılabilir. Bu da periodontitise olan direnci artırabilir. Ancak yukarıda bahsedilen araştırmalarda R4Fu-Q65R-MMAE veya -DMSA gibi peptit yapılarının tümör eradikasyonunda başarısız olduğu, tedavi durdurulduğunda yüklenen moleküllerin farmakokinetiği, yetersiz molekül konsantrasyonu ve benzeri sebeplerle tümör yapılarının yeniden oluştuğu göz ardı edilmemelidir.

Tek hücre RNA-dizi analizleri tırnağa özgü mezenkimal ve epitelyal hücre aktivitelerinin *RSPO4* (konjenital anonychia için majör gen) ve *SPINK6* başta olmak üzere *MSX1*, *TWIST1*, *CRABP1*, *WIF1* ve *BMP5* tarafından düzenlendiğini göstermektedir (106). Onikofibroblastlardaki lokalizasyonu in-situ RNA hibridizasyonu ile belirlenen *RSPO4*, *MSX1* ve *WIF1*'in LGR6 membran reseptörü ile etkileşerek Wnt sinyal yolağı aktivasyonu yaptığını teyit etmektedir (106). Bu bulgular *RSPO4*'ün pleiotropik etkilerini bu genlerle etkileşerek gerçekleştirmiş olabileceğini ve mevcut çalışmadaki putatif bölgenin de *RSPO4*'e ek olarak bu genlerin ifadelerini etkileyebileceğini düşündürmektedir. *LEF1*'in *RSPO4*'ün 3' yönünde ve yakın konumunda yer alması da bu düşüncüyü desteklemektedir (106) ancak *RSPO4* ile *LEF1* arasında bir etkileşim olduğuna dair bir kanıt henüz bulunmamaktadır. *RSPO4*'ün onikomatrikoma lezyonundaki fibroblastlarda ve bazal epiteldeki ifadesi yüksek bulunmuştur (106). Benzer şekilde periodontal

dokunun dişeti komponenti de çok katlı yassı epitel ile yüksek fibroblastik aktiviteye sahip bir bağ dokusundan oluşmaktadır (107). Dolayısıyla tırnak dokusu için tarif edilen bulguların dişeti yapısında da görülmesi olasıdır ancak *RSPO4*'n dişeti epitel ve bağ dokusundaki olası etkilerinin incelendiği bir araştırma henüz mevcut değildir.

Araştırmanın başlangıcında test edilen bölgede var olduğu görülen H3K4Me1 ve H3K27Ac histon modifikasyonları, ilgilenen putatif bölgenin hızlandırıcı etkisi olduğunu düşündürmüş ve araştırmanın hipotezi de buna göre kurgulanmıştır. Ancak elde edilen lusiferaz aktivitesi sonuçları ilgili bölgenin repressör aktivitesi olduğunu ortaya koymuştur. İlgili bölgeye ait çeşitli kanser hücre hatlarında gerçekleştirilen Chip-dizileme analizleri bu bölgedeki H3K27Ac modifikasyonunun olası bir poised promotör aktivitesini işaret etmektedir (108). Hızlandırıcı bölge fonksiyonlarını incelemek için amaca yönelik olarak hem genel hem dizi spesifik transkripsiyon faktörlerinin (109,110), H3K4me1, H3K27ac, H3.3, H2Az gibi histon modifikasyonlarının (111), medyatör kompleksinin (112,113), kromatin remodeling komplekslerinin ve kromatin değiştirici enzimlerin (114), integrator kompleksinin (115), steroid reseptör aktivatörleri gibi transkripsiyon faktör düzenleyicilerinin (116); nükleazlara olan hassasiyetin (117); histon post-translasyonel değişimlerini sağlayan proteinlerin (118); RNAPII ve ilişkili enzimlerinin (119); RNA eksozom kompleksi, topoizomerez-1 gibi diğer katalitik enzimlerin (120) ve enhancer RNA gibi kodlamayan RNA'ların analizi (121) gibi çok çeşitli analizler kullanılmaktadır. Mevcut çalışmada putatif bölgenin gerçek bir hızlandırıcı / repressör bölge olduğunu test etmek için bu örneklerin kullanıldığı deneylerde klonlanmış olan putatif dizinin promotör aktivitesine olan etkisi *lusiferaz assay* ile osteosarkom hücrelerinde incelenmiş ve aranan sorunun yanıtını sağlamıştır. STARR-seq ve UMISTARR-seq yöntemleri alternatif olabilecek güncel hızlandırıcı aktivitesi testleridir (122). Bu yöntemlerde kompleks DNA kütüphaneleri (*Illumina adapter flanked candidate fragments*) tarayıcı plasmitin *reporter* transkripsiyon nitesinin 3'UTR bölgesine klonlanmakta ve hücelere transfekte edilmektedir. Aktif hızlandırıcılar *reporter* transkriptlerin bir parçası olarak fonksiyon görüp transkripsiyonları sonrasında bu transkriptler hcesel mRNA'nın bir parçası olarak izole edilmekte ve *reporter*-spesifik RT primerler ile seçici olarak ters transkripsiyonları gerçekleşmektedir. Bu aşamadan sonra STARR-dizileme yönteminde *reporter* cDNA'lar iki aşamalı bir nested-PCR ile *reporter* cDNA'lara özgül olarak bağlanan primerler kullanılarak selektif olarak amplifiye edilmektedir. Sonrasında Illumina indeks primerleri kullanılarak Illumina aday dizileri seq-ready PCR adımı

süresince amplifiye edilip derin sekanslama yapılmaktadır. Daha az kompleks kütüphaneler için kullanılan UMISTARR-seq yönteminde ise *reporter* mRNA'larının hassas sayımını yapabilmek için amplifikasyon öncesi özel moleküler belirleyiciler (*unique molecular identifiers*-UMI) modifiye Illumina primerlerinin kullanıldığı lineer PCR ile verilmekte, bu moleküllere kompetan *reporter* cDNA'ları işleyebilmek için *reporter* spesifik forward primer ile ikinci zincirin sentezi sağlanmakta ve çift iplikli bir *reporter* DNA elde edilmektedir. UMI tanıtlaması ve amplifikasyonu gerçekleşene kadar başka amplifikasyon gerçekleşmemektedir. Derin dizilemede UMI ilk indeks olarak okunmaktadır. Her iki yöntem sonunda yapılan derin dizilemede elde edilen sekans sinyali direkt ve kantitatif olarak okunmaktadır. Bu iki yöntem *enhancer* aktivitesinin detaylı olarak kantite edilmesi istendiğinde tercih edilmektedir.

Mevcut araştırma periodontitise dirençte rolü olduğu düşünülen *RSPO4* geninin 3' yönünde yer alan bir putatif bölgenin gen ifadesini hızlandırıcı etkisi olup olmadığının anlaşılmasını amaçlamıştır. Deneyle sonucunda putatif *enhancer* bölgenin gen ifadesini yavaşlatıcı (repressör) olarak görev yaptığı gösterilmiştir. Bu sonuç ilgili bölgenin gen ifadesini değiştirici etkisini göstererek gelecekte yapılabilecek araştırmalar için ön bilgi kaynağı olacaktır. Yapılan ENSEMBL değerlendirmeleri, incelenen bölgenin *RSPO4* ifadesi üzerinde cis etkisi olduğunu teyit etmektedir (123). Ancak bu bölgenin başka genlerin ifadesini de cis veya trans düzenleyebileceği unutulmamalıdır. Nitekim yapılan araştırmalar *RSPO4*'ün yüksek düzeydeki ifadesinin *GLDN* ve *MUC21* genlerinin ifade artışına yol açtığını ve *RSPO4*'ün en yakınındaki (40 kb 3' yönünde) etkileşebileceği genin anjiyogenezde agonistik fonksiyonu olan *ANGPT4* olduğunu göstermiştir. Nitekim *RSPO4*'ün *ANGPT4* ile benzer fonksiyona sahip *ANGPTL4* ile de doğrudan bir etkileşimi olduğunu bildirilmiştir (10,124). *RSPO4*'e benzer şekilde *ANGPTL4* de Wnt sinyal antagonisti olarak LRP6 ortak reseptörüne bağlanmakta ve Wnt/b-catenin sinyalini düzenlemektedir (125). Bu bağlamda DNaz I aşırı duyarlılığı ve varyasyona yatkınlığı olan bu bölgenin başta *GLDN*, *MUC21*, *ANGPT4* ve *ANGPTL4* başta olmak üzere başka genlerin ifadesi üzerinde de rolü olabileceği göz önünde tutulmalı ve hangi gen(ler)in ifadesini düzenlediği incelenmelidir.

Mevcut araştırmada gen ifadesini yavaşlattığı tespit edilen putatif bölgenin transkripsiyon faktörü bağlanması açısından da incelenmesi genin ve bölgenin fonksiyonlarının daha iyi anlaşılmasını sağlayacaktır. Yapılan araştırmalarda *RSPO4*'ün kodlayan bölgesinin 3' yönündeki rs6056178 bölgesinin GATA transkripsiyon faktörünün bağlanması için fonksiyonel ve putatif

etken bir varyant olduğu hem GATA2 ve GATA3'ün bu lokasyonda kromatine bağlanmasının ChIP-Dizileme ile hem de allel-spesifik GATA1 ve GATA2'nin bağlanmasının EMSA ile gösterilmesi sonucu ortaya konmuştur (122). GATA transkripsiyon faktörleri genelde aynı motife ([A/T]GATA[A/G]) sahiptirler ve GATA1 ve GATA2 teorik olarak SNP'li diziye bağlanma eğilimindedir. Bu yüzden GATA transkripsiyon bağlanmaları *in-vivo* olarak ayırt edilememektedir. GATA1 primer olarak eritrosit ve trombositlerin gelişimine aracılık ederken GATA2 kendi yenilenmesinin (*self-renewal*) devamlılığı ile ilgili birçok genin regülasyonunda görev almakta ve kan, lenfatik ve diğer dokuların oluşumlarıyla ilgili sistemlerin fonksiyonlarını düzenlemektedir (126). Fonksiyonlarının kaybedilmesi ise hematolojik ve immünolojik problemler başta olmak üzere birçok dokuda ciddi problemlere yol açmakta, fırsatçı enfeksiyonlara, akciğer hasarına ve virus kaynaklı kanserlere sebep olmaktadır (127). GATA3 inflamatuvar ve hümmoral immün yanıtta ve endotel fonksiyonlarında bir transkripsiyon faktörüdür (128). Putatif bölgede transkripsiyon faktörleri haricinde bir epigenetik düzenleyici olan *poly comb repressive complex 2 (PRC2)* varlığı de mevcuttur. Bu faktör transkripsiyon faktörlerinin bağlanması ve aktivitesinin düzenlenmesinde rol oynuyor olabilir.

Mevcut araştırmada gen ifadesini yavaşlatıcı etkisi belirlenen putatif bölgenin ve ifadesini düzenlediği gen(ler)in aktiveştirildiği/baskılandığı araştırmalar yapılması, bölge ve genin fonksiyonlarının anlaşılmasına yardımcı olacaktır. Yapılan araştırmalar RSPO4 aktivasyonu ile HeLa hücrelerinde *RSPO4*'ün olası partnerlerinin aktivitesinin belirgin şekilde zenginleştiğini ve bu hücrelerin birçok deney için geçerli bir model hücre olduğunu göstermektedir (123). Ancak *RSPO4* regülasyonunun her bir hücrede aktif olarak bulunan, transkripsiyon faktörleri başta olmak üzere ve transkripsiyonu düzenleyen diğer elemanlar ve diğer birçok faktör tarafından değiştirilebileceği göz ardı edilmemelidir. Bu nedenle *RSPO4*'ün etkilerinin fibroblast, keratinosit, osteoblast, sementoblast ve benzeri periodontal doku ile ilişkili hücrelerde çalışılması bahsi geçen genin periodontal hastalıkla ilişkisinin daha ayrıntılı olarak belirlenmesini sağlayacaktır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Periodontitise dirençte rolü olduğu düşünölen *RSPO4* geninin 3' yönünde etiketlenen ve periodontitis ile ilişkili varyantların yer aldığı putatif bir düzenleyici bölgenin gen ifadesini hızlandırıcı etki gösterdiği hipotezine sahip çalışmanın sonuçları ilgili bölgenin gen ifadesini yavaşlatıcı etkisi olduğunu ortaya koymuştur. Bu sonuç ilgili bölgenin gen ifadesi için güçlü ve önemli bir düzenleyici bölge olduğunu göstermektedir. Gelecekte gen ifadesinin aktifleştirildiği/baskılandığı çalışmaların yanı sıra ilgili bölgede yer alan transkripsiyon faktörü bağlanma bölgelerinin, bölgenin *RSPO4*'ün yanı sıra diğer gen(ler) üzerinde düzenleyici etkilerinin ve bölgedeki varyasyonların etkilerinin incelendiği araştırmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Tezden Üretilen Yayın

Chopra A, Song J, Weiner J 3rd, Keceli HG, Dincer PR, Cruz R, Carracedo A, Blanco J, Dommisch H, Schaefer AS. *RSPO4* is a potential risk gene of stages III-IV, grade C periodontitis through effects on innate immune response and oral barrier integrity. *J Clin Periodontol* 2023;50(4):476-486. doi:10.1111/jcpe.13758. Epub 2022 Dec 15. PMID: 36507580.

7. KAYNAKLAR

1. Schaefer AS. Genetics of periodontitis: Discovery, biology, and clinical impact. *Periodontol* 2000. 2018;78(1):162-73.
2. Lang NP, Schatzle MA, Loe H. Gingivitis as a risk factor in periodontal disease. *J Clin Periodontol* 2009;36(Suppl. 10): 3-8.
3. Page RC. Gingivitis. *J Clin Periodontol* 1986;13:345-59.
4. Ammons WF, Schectman LR, Page RC. Host tissue response in chronic periodontal disease. 1. The normal periodontium and clinical manifestations of dental and periodontal disease in the marmose. *J Periodontal Res* 1972: 7: 131–143.
5. Kurgan S, Kantarci A. Molecular basis for immunohistochemical and inflammatory changes during progression of gingivitis to periodontitis. *Periodontol* 2000. 2018;76: 51–67
6. Nashef, A, Munz M, Weiss E, Loos BG, Jepsen S, Van der Velde N, et al. Translation of mouse model to human gives insights into periodontitis etiology. *Sci Rep* Mar 2020;10(1):4892.
7. Gaur T, Lengner CJ, Hovhannisyanyan H, Bhat RA, Bodine PV, Komm BS, et al. Canonical WNT signaling promotes osteogenesis by directly stimulating Runx2 gene expression. *J Biol Chem* 2005 280(39):33132-40.
8. de Lau W, Barker N, Low TY, Koo BK, Li VS, Teunissen H, et al. Lgr5 homologues associate with Wnt receptors and mediate R-spondin signalling. *Nature* 2011;476(7360):293-7.
9. Glinka A, Dolde C, Kirsch N, Huang YL, Kazanskaya O, Ingelfinger D, et al. LGR4 and LGR5 are R-spondin receptors mediating Wnt/ β -catenin and Wnt/PCP signalling. *EMBO Rep* 2011;12(10):1055-61.
10. de Coo A, Cruz R, Quintela I, Herrera D, Sanz M, Diz P, et al. Genome-wide association study of stage III/IV grade C periodontitis (former aggressive periodontitis) in a Spanish population. *J Clin Periodontol* 2021;48(7):896-906.
11. Kreimer A, Zeng H, Edwards MD, Guo Y, Tian K, Shin S, et al. Predicting gene expression in massively parallel reporter assays: A comparative study. *Hum Mutat* 2017;38(9):1240-50.
12. Kwasnieski JC, Fiore C, Chaudhari HG, Cohen BA. High-throughput functional testing of encode segmentation predictions. *Genome Res* 2014;24(10):1595-602.
13. Lindhe J, Karring T, Lang NP. *Clinical periodontology and implant dentistry: 7th ed* Blackwell; 2022.
14. Newman MG, Klokkevold D, Takei HH, Carranza FA. *Carranza's Clinical Periodontology. 13th ed* Elsevier health sciences; 2019.
15. Yamamoto T, Li M, Liu Z, Guo Y, Hasegawa T, Masuki H, et al. Histological review of the human cellular cementum with special reference to an alternating lamellar pattern. *Odontol* 2010;98(2):102-9.
16. Tonetti MS, Jepsen S, Jin L, Otomo-Corgel J. Impact of the global burden of periodontal diseases on health, nutrition and wellbeing of mankind: A call for global action. *J Clin Periodontol* 2017;44(5):456-62.

17. Tonetti MS, Greenwell H, Kornman KS. Staging and grading of periodontitis: Framework and proposal of a new classification and case definition. *J Clin Periodontol* 2018;45(Suppl 20):149-61.
18. Murakami S, Mealey BL, Mariotti A, Chapple ILC. Dental plaque-induced gingival conditions. *J Periodontol* 2018;89(Suppl 1):17-27.
19. Darveau RP. Periodontitis: a polymicrobial disruption of host homeostasis. *Nat Rev Microbiol* 2010;8(7):481-90.
20. Garcia RI, Henshaw MM, Krall EA. Relationship between periodontal disease and systemic health. *Periodontol 2000*. 2001;25:21-36.
21. Chapple ILC, Mealey BL, Van Dyke TE, Bartold PM, Dommisch H, Eickholz P et al. Periodontal health and gingival diseases and conditions on an intact and a reduced periodontium: Consensus report of workgroup 1 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *J Clin Periodontol* 2018;45:68–77.
22. Ramseier CA, Woelber JP, Kitzmann J, Detzen L, Carra MC, Bouchard P. Impact of risk factor control interventions for smoking cessation and promotion of healthy lifestyles in patients with periodontitis: A systematic review. *J Clin Periodontol* 2020;47(Suppl 22):90-106.
23. Ramseier CA. Potential impact of subject-based risk factor control on periodontitis. *J Clin Periodontol* 2005;32(Suppl 6):283-90.
24. Bartold PM, Van Dyke TE. Periodontitis: A host-mediated disruption of microbial homeostasis. Unlearning learned concepts. *Periodontol 2000* 2013;62:203–217.
25. Lourenço TG, Heller D, Silva-Boghossian CM, Cotton SL, Paster BJ, Colombo AP. Microbial signature profiles of periodontally healthy and diseased patients. *J Clin Periodontol* 2014;41(11):1027-36.
26. Pérez-Chaparro PJ, Gonçalves C, Figueiredo LC, Faveri M, Lobão E, Tamashiro N, et al. Newly identified pathogens associated with periodontitis: a systematic review. *J Dent Res* 2014;93(9):846-58.
27. Pérez-Chaparro PJ, Duarte PM, Shibli JA, Montenegro S, Lacerda Heluy S, Figueiredo LC, et al. The current weight of evidence of the microbiologic profile associated with peri-implantitis: A systematic review. *J Periodontol* 2016;87(11):1295-304.
28. Haubek D, Ennibi OK, Poulsen K, Vaeth M, Poulsen S, Kilian M. Risk of aggressive periodontitis in adolescent carriers of the JP2 clone of *Aggregatibacter* (*Actinobacillus*) *actinomycetemcomitans* in Morocco: a prospective longitudinal cohort study. *Lancet* 2008;371(9608):237-42.
29. Amaliya A, Laine ML, Delanghe JR, Loos BG, Van Wijk AJ, Van der Velden U. Java project on periodontal diseases: periodontal bone loss in relation to environmental and systemic conditions. *J Clin Periodontol* 2015;42(4):325-32.
30. Feres M, Teles F, Teles R, Figueiredo LC, Faveri M. The subgingival periodontal microbiota of the aging mouth. *Periodontol 2000*. 2016;72(1):30-53.
31. Mombelli A, Casagni F, Madianos PN. Can presence or absence of periodontal pathogens distinguish between subjects with chronic and aggressive periodontitis? A systematic review. *J Clin Periodontol* 2002;29(Suppl 3):10-21; discussion 37-8.

32. Coat J, Demoersman J, Beuzit S. Anti-B lymphocyte therapy is associated with improvement of periodontal status in subjects with rheumatoid arthritis. *J Clin Periodontol* 2015;42:817–823.
33. Ohlrich EJ, Cullinan MP, Seymour GJ. The immunopathogenesis of periodontal disease. *Aust Dent J* 2009;54(Suppl 1):2-10.
34. Uttamani JR, Kulkarni V, Valverde A, Naqvi RA, Nares S, Naqvi AR. Dynamic changes in macrophage polarization during the resolution phase of periodontal disease. *bioRxiv* 2023;21:2023.02.20.529313. Preprint
35. Avalla F, Hernández M. Polarization profiles of T lymphocytes and macrophages responses in periodontitis. *Adv Exp Med Biol.* 2022;1373:195-208.
36. Silva N, Abusleme L, Bravo D, Dutzan N, Garcia-Sesnich J, Vernal R, et al. Host response mechanisms in periodontal diseases. *J Appl Oral Sci* 2015;23(3):329-55.
37. Herrmann JM, Meyle J. Neutrophil activation and periodontal tissue injury. *Periodontol* 2000. 2015;69(1):111-27.
38. Yamamoto M, Sugano M, Itabe H. The etiological consideration of oxidized low-density lipoprotein in periodontitis. *J Oral Biosci* 2023;65(1):19-23.
39. Havemose-Poulsen A, Holmstrup P. Factors affecting IL-1-mediated collagen metabolism by fibroblasts and the pathogenesis of periodontal disease: a review of the literature. *Crit Rev Oral Biol Med* 1997;8(2):217-36.
40. Melgar-Rodríguez S, Cafferata EA, Díaz NI, Peña MA, González-Osuna L, Rojas C, Sierra-Cristancho A, et al. Natural Killer T (NKT) Cells and Periodontitis: Potential Regulatory Role of NKT10 Cells. *Mediators Inflamm.* 2021;20;2021:5573937.
41. Jepsen, S., Caton, J.G., Albandar, J.M. et al. Periodontal manifestations of systemic diseases and developmental and acquired conditions: Consensus report of workgroup 3 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *J Clin Periodontol* 2018;45(Suppl 20):219–229.
42. Umeda JE, Demuth DR, Ando ES, Faveri M, Mayer MP. Signaling transduction analysis in gingival epithelial cells after infection with *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *Mol Oral Microbiol* 2012;27(1):23-33.
43. Valen H, Scheie AA. Biofilms and their properties. *Eur J Oral Sci.* 2018;126(Suppl 1):13-18.
44. Richter GM, Kruppa J, Keceli HG, Ataman-Duruel ET, Graetz C, Pischon N, et al. Epigenetic adaptations of the masticatory mucosa to periodontal inflammation. *Clin Epigenetics.* 2021;3;13(1):203.
45. Corey LA, Nance WE, Hofstede P, Schenkein HA. Self-reported periodontal disease in a Virginia twin population. *J Periodontol.* 1993;64(12):1205-8.
46. Michalowicz BS, Diehl SR, Gunsolley JC, et al. Evidence of a substantial genetic basis for risk of adult periodontitis. *J Periodontol* 2000;71(11):1699-1707.
47. Lander ES, Linton LM, Birren B, et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 2001;409(6822):860-921.
48. Venter JC, Adams MD, Myers EW, et al. The sequence of the human genome. *Science* 2001;291(5507):1304-51.

49. Genomes Project C, Abecasis GR, Altshuler D., et al. A map of human genome variation from population-scale sequencing. *Nature* 2010;467(7319):1061-73.
50. Genomes Project C, Auton A, Brooks LD, Durbin RM, Garrison EP, Kang HM, Korbel JO, Marchini JL, McCarthy S, McVean GA, Abecasis GR. A global reference for human genetic variation. *Nature* 2015;526(7571):68-74.
51. Schaefer AS, Van der Velden U, Laine ML, Loos BG. Genetic susceptibility to periodontal disease: new insights and challenges. In Lindhe J, Karring T, Lang NP. *Clinical Periodontology and Implant Dentistry: 7th ed* Blackwell; 2022.
52. Wilkening S, Chen B, Bermejo JL, Canzian F. Is there still a need for candidate gene approaches in the era of genome-wide association studies? *Genomics* 2009;93(5):415-9.
53. Laine ML, Crielaard W, Loos BG. Genetic susceptibility to periodontitis. *Periodontol* 2000. 2012;58(1):37-68.
54. Jostins L, Ripke S, Weersma RK, Duerr RH, McGovern DP, Hui KY, et al. Host-microbe interactions have shaped the genetic architecture of inflammatory bowel disease. *Nature* 2012 1;491(7422):119-24.
55. Saxena R, Elbers CC, Guo Y, Peter I, Gaunt TR, Mega JL, et al. Large-scale gene-centric meta-analysis across 39 studies identifies type 2 diabetes loci. *Am J Hum Genet* 2012;90(3):410-25.
56. Morris AP, Voight BF, Teslovich TM, Ferreira T, Segre AV, Steinthorsdottir V, et al. Large-scale association analysis provides insights into the genetic architecture and pathophysiology of type 2 diabetes. *Nat Genet* 2012;44(9):981-90.
57. Deloukas P, Kanoni S, Willenborg C, Farrall M, Assimes TL, Thompson JR, et al. Large-scale association analysis identifies new risk loci for coronary artery disease. *Nat Genet* 2013;45(1):25-33.
58. Schäfer AS, Jepsen S, Loos BG. Periodontal genetics: a decade of genetic association studies mandates better study designs. *J Clin Periodontol.* 2011;38(2):103-7.
59. Vaithilingam RD, Safii SH, Baharuddin NA, Ng CC, Cheong SC, Bartold PM, et al. Moving into a new era of periodontal genetic studies: relevance of large case-control samples using severe phenotypes for genome-wide association studies. *J Periodontal Res* 2014;49(6):683-95.
60. Schaefer AS, Richter GM, Nothnagel M, Manke T, Dommisch H, Jacobs G, Arlt A, Rosenstiel P, Noack B, Groessner-Schreiber B, Jepsen S, Loos BG, Schreiber S. A genome-wide association study identifies *GLT6D1* as a susceptibility locus for periodontitis. *Hum Mol Genet* 2010;19(3):553-62.
61. Kim KA, Zhao J, Andarmani S, Kakitani M, Oshima T, Binnerts ME et al. R-spondin proteins, a novel link to b-catenin activation. *Cell Cycle* 2006;5:23–6.
62. Kazanskaya O, Glinka A, del BBI, Stannek P, Niehrs C, Wu W. R-spondin 2 is a secreted activator of Wnt/beta-catenin signaling and is required for *Xenopus* myogenesis. *Dev Cell* 2004;7:525–34.
63. Blaydon DC, Philpott MP, Kelsell DP. R-spondins in cutaneous biology: nails and cancer. *Cell Cycle* 2007;6:295–7

64. Logan CY, Nusse R. The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2004;20:781–810.
65. Mulholland DJ, Dedhar S, Coetzee GA, Nelson CC. Interaction of nuclear receptors with the Wnt/beta-catenin/Tcf signaling axis: Wnt you like to know? *Endocr Rev* 2005;26:898–915.
66. Nam JS, Turcotte TJ, Smith PF, Choi S, Yoon JK. Mouse cristin/Rspondin family proteins are novel ligands for the Frizzled 8 and LRP6 receptors and activate beta-catenin-dependent gene expression. *J Biol Chem* 2006;281:13247–57.
67. Katoh M. WNT2B: comparative integromics and clinical applications. *Int J Mol Med* 2005;16:1103–8.
68. Lebensohn AM, Rohatgi R. R-spondins can potentiate WNT signaling without LGRs. *Elife* 2018;6;7:e33126.
69. Baenziger NL, Brodie GN, Majerus PW: A thrombin-sensitive protein of human platelet membranes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1971;68:240-243.
70. Lawler J, Hynes RO. The structure of human thrombospondin, an adhesive glycoprotein with multiple calcium-binding sites and homologies with several different proteins. *J Cell Biol* 1986;103:1635-48.
71. Parma P, Radi O, Vidal V, Chaboissier MC, Dellambra E, Valentini S, et al. R-spondin1 is essential in sex determination, skin differentiation and malignancy. *Nat Genet* 2006;38:1304-9.
72. Bergmann C, Senderek J, Anhof D, Thiel CT, Ekici AB, Poblete-Gutierrez P et al. Mutations in the gene encoding the Wnt-signaling component R-spondin 4 (RSPO4) cause autosomal recessive anonychia. *Am J Hum Genet* 2006;79:1105-9.
73. Bruchle NO, Frank J, Frank V, Senderek J, Akar A, Koc E et al. RSPO4 is the major gene in autosomal-recessive anonychia and mutations cluster in the furin-like cysteine-rich domains of the Wnt signaling ligand R-spondin 4. *J Invest Dermatol* 2008;128:791-6.
74. Ishii Y, Wajid M, Bazzi H, Fantauzzo KA, Barber AG, Blaydon DC et al. Mutations in R-spondin 4 (RSPO4) underlie inherited anonychia. *J Invest Dermatol* 2008;128:867-70.
75. Li SJ, Yen TY, Endo Y, Klauzinska M, Baljinnyam B, Macher B et al. Loss-of-function point mutations and two-furin domain derivatives provide insights about R-spondin2 structure and function. *Cell Signal* 2009;21:916-25.
76. Kurth I, Klopocki E, Stricker S, van Oosterwijk J, Vanek S, Altmann J, et al. Duplications of noncoding elements 5' of SOX9 are associated with brachydactyly-anonychia. *Nat Genet* 2009;41:862-3.
77. Akram KM, Kulkarni NS, Brook A, Wyles MD, Anumba DOC. Transcriptomic analysis of the human placenta reveals trophoblast dysfunction and augmented Wnt signalling associated with spontaneous preterm birth. *Front Cell Dev Biol* 2022;10:987740.
78. Leger PD, Johnson DH, Robbins GK, Shafer RW, Clifford DB, Li J et al. Genome-wide association study of peripheral neuropathy with D-drug-containing regimens in AIDS Clinical Trials Group protocol 384. *J Neurovirol* 2014;20(3):304-8.
79. Bell SM, Schreiner CM, Hess KA, Anderson KP, Scott WJ. Asymmetric limb malformations in a new transgene insertional mutant, footless. *Mech Dev* 2003;120:597–605.

80. Gong Y, Slee RB, Fukai N, Rawadi G, Roman-Roman S, Reginato AM et al. LDL receptor-related protein 5 (LRP5) affects bone accrual and eye development. *Cell* 2001;107, 513–523.
81. Neufeld S, Rosin JM, Ambasta A, Hui K, Shaneman V, Crowder R et al. A conditional allele of *Rspo3* reveals redundant function of R-spondins during mouse limb development. *Genesis* 2012;50:741–9.
82. Hankenson KD, Sweetwyne MT, Shitaye H, Posey KL. Thrombospondins and novel TSR-containing proteins, R-spondins, regulate bone formation and remodeling. *Curr Osteoporos Rep* 2010;8:68–76.
83. Lu W, Kim KA, Liu J, Abo A, Feng X, Cao X et al. R-spondin1 synergizes with Wnt3A in inducing osteoblast differentiation and osteoprotegerin expression. *FEBS Lett* 2008;582:643–50.
84. Friedman MS, Oyserman SM, Hankenson KD. Wnt11 promotes osteoblast maturation and mineralization through R-spondin 2. *J Biol Chem* 2009;284:14117–25.
85. Sharma AR, Choi BS, Park JM, Lee DH, Lee JE, Kim HS et al. *Rspo 1* promotes osteoblast differentiation via Wnt signaling pathway. *Indian J Biochem Biophys* 2013;50:19–25.
86. Wang H, Brennan TA, Russell E, Kim JH, Egan KP, Chen Q. R-Spondin 1 promotes vibration-induced bone formation in mouse models of osteoporosis *Mol Med (Berl)* 2013;91(12):1421-9.
87. Luo J, Zhou W, Zhou X, Li D, Weng J, Yi Z et al. Regulation of bone formation and remodeling by G-protein-coupled receptor 48. *Development* 2009;136(16):2747–56.
88. Krönke G, Uderhardt S, Kim KA, Stock M, Scholtysek C, Zaiss MM et al. R-spondin 1 protects against inflammatory bone damage during murine arthritis by modulating the Wnt pathway. *Arthritis Rheum* 2010;62:2303–12.
89. Abed É, Chan TF, Delalandre A, Martel-Pelletier J, Pelletier JP, Lajeunesse D. R-spondins are newly recognized players in osteoarthritis that regulate Wnt signaling in osteoblasts. *Arthritis Rheum* 2011;63: 3865–75.
90. Pemberton TJ, Li FY, Oka S, Mendoza-Fandino GA, Hsu YH, Bringas P Jr et al. Identification of novel genes expressed during mouse tooth development by microarray gene expression analysis. *Dev Dyn* 2007;236(8):2245-57.
91. Munz M, Willenborg C, Richter GM, Jockel-Schneider Y, Graetz C, Staufenbiel I et al. A genome-wide association study identifies nucleotide variants at *SIGLEC5* and *DEFA1A3* as risk loci for periodontitis. *Hum Mol Genet.* 2017 Jul 1;26(13):2577-2588.
92. Boelen GJ, Boute L, d'Hoop J, EzEldeen M, Lambrichts I, Opdenakker G. Matrix metalloproteinases and inhibitors in dentistry. *Clin Oral Investig* 2019;23(7):2823-35.
93. Becerik S, Cogulu D, Emingil G, Han T, Hart PS, Hart TC. Exclusion of candidate genes in seven Turkish families with autosomal recessive amelogenesis imperfecta. *Am J Med Genet A* 2009;149A(7):1392-8.
94. Tsuruga E, Irie K, Yajima T. Fibrillin-2 degradation by matrix metalloproteinase-2 in periodontium. *J Dent Res* 2007;86(4):352-6.
95. Onishi T, Ooshima T, Sobue S, Tabata MJ, Maeda T, Kurisu K et al. Immunohistochemical localization of calbindin D28k during root formation of rat molar teeth. *Cell Tissue Res* 1999;297(3):503-12.

96. Barbato E, Traversa A, Guarnieri R, Giovannetti A, Genovesi ML, Magliozzi MR et al. Whole exome sequencing in an Italian family with isolated maxillary canine agenesis and canine eruption anomalies. *Arch Oral Biol* 2018;91:96-102.
97. Sarkar L, Sharpe PT. Expression of Wnt signalling pathway genes during tooth development. *Mech Dev* 1999;85(1-2):197-200.
98. Obara N, Suzuki Y, Takeda M. Gene expression of beta-catenin is up-regulated in inner dental epithelium and enamel knots during molar tooth morphogenesis in the mouse. *Cell Tissue Res* 2006;325(1):197-201.
99. Kikuchi T, Hayashi JI, Mitani A. Next-Generation Examination, Diagnosis, and Personalized Medicine in Periodontal Disease. *J Pers Med* 2022;20;12(10):1743.
100. Carmon KS, Gong X, Lin Q, Thomas A, Liu Q. R-spondins function as ligands of the orphan receptors LGR4 and LGR5 to regulate Wnt/beta-catenin signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011;108:11452–7.
101. Gong X, Carmon KS, Lin Q, Thomas A, Yi J, Liu Q. LGR6 Is a high affinity receptor of R-Spondins and potentially functions as a tumor suppressor. *PLoS One* 2012;7:e37137.
102. Hao HX, Xie Y, Zhang Y, Charlat O, Oster E, Avello M, et al. ZNRF3 promotes Wnt receptor turnover in an R-spondin-sensitive manner. *Nature* 2012;485:195–200.
103. Koo BK, Spit M, Jordens I, Low TY, Stange DE, van de Wetering M, et al. Tumour suppressor RNF43 is a stem-cell E3 ligase that induces endocytosis of Wnt receptors. *Nature* 2012;488:665–9.
104. Park S, Wu L, Tu J, Yu W, Toh Y, Carmon KS, et al. Unlike LGR4, LGR5 potentiates Wnt-beta-catenin signaling without sequestering E3 ligases. *Sci Signal* 2020;13:eaaz4051.
105. Cui J, Toh Y, Park S, Yu W, Tu J, Wu L, et al. Drug Conjugates of Antagonistic R-Spondin 4 Mutant for Simultaneous Targeting of Leucine-Rich Repeat-Containing G Protein-Coupled Receptors 4/5/6 for Cancer Treatment. *J Med Chem.* 2021;64(17):12572-81.
106. Kim HJ, Shim JH, Park JH, Shin HT, Shim JS, Jang KT, Park WY, Lee KH, Kwon EJ, Jang HS, Yang H, Lee JH, Yang JM, Lee D. Single-cell RNA sequencing of human nail unit defines RSPO4 onychofibroblasts and SPINK6 nail epithelium. *Commun Biol* 2021;4(1):692.
107. Bosshardt DD, Lindhe J, Lang NP, Araújo M. Anatomy and histology of periodontal tissues. In Lindhe J, Karring T, Lang NP. *Clinical Periodontology and Implant Dentistry*, 7th ed, Blackwell, 2022.
108. Creighton MP, Cheng AW, Welstead GG, Kooistra T, Carey BW, Steine EJ, et al. Histone H3K27ac separates active from poised enhancers and predicts developmental state. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2010 14;107(50):21931-6
109. Yan J, Enge M, Whittington T, Dave K, Liu J, Sur I, Schmierer B et al. Transcription factor binding in human cells occurs in dense clusters formed around cohesin anchor sites. *Cell* 2013;154:801–13.
110. Liu Z, Merkurjev D, Yang F, Li W, Oh S, Friedman MJ, et al. Enhancer activation requires trans-recruitment of a mega transcription factor complex. *Cell.* 2014;159:358–73.

111. Calo E, Wysocka J. Modification of enhancer chromatin: what, how, and why? *Mol Cell* 2013;49:825–37.
112. Kagey MH, Newman JJ, Bilodeau S, Zhan Y, Orlando DA, van Berkum NL, et al. Mediator and cohesin connect gene expression and chromatin architecture. *Nature* 2010;467:430–5.
113. Soutourina J. Transcription regulation by the Mediator complex. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2018;19:262–74.
114. Nakagawa T, Yoneda M, Higashi M, Ohkuma Y, Ito T. Enhancer function regulated by combinations of transcription factors and cofactors. *Genes Cells* 2018;23:808–21.
115. Lai F, Gardini A, Zhang A, Shiekhattar R. Integrator mediates the biogenesis of enhancer RNAs. *Nature*. 2015;525:399–403.
116. Murakami S, Nagari A, Kraus WL. Dynamic assembly and activation of estrogen receptor alpha enhancers through coregulator switching. *Genes Dev* 2017;31:1535–48.
117. Gross DS, Garrard WT. Nuclease hypersensitive sites in chromatin. *Annu Rev Biochem* 1988;57:159–97.
118. Taverna SD, Li H, Ruthenburg AJ, Allis CD, Patel DJ. How chromatin-binding modules interpret histone modifications: lessons from professional pocket pickers. *Nat Struct Mol Biol* 2007;14:1025–40.
119. Schier AC, Taatjes DJ. Structure and mechanism of the RNA polymerase II transcription machinery. *Genes Dev*. 2020;34:465–88.
120. Puc J, Kozbial P, Li W, Tan Y, Liu Z, Suter T, et al. Ligand-dependent enhancer activation regulated by topoisomerase-I activity. *Cell*. 2015;160:367–80.
121. Foulds CE, Panigrahi AK, Coarfa C, Lanz RB, O'Malley BW. Long noncoding RNAs as targets and regulators of nuclear receptors. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2016;394:143–76.
122. Neumayr C, Pagani M, Stark A, Arnold CD. STARR-seq and UMI-STARR-seq: Assessing Enhancer Activities for Genome-Wide-, High-, and Low-Complexity Candidate Libraries. *Curr Protoc Mol Biol* 2019;128(1):e105.
123. Chopra A, Song J, Weiner J 3rd, Keceli HG, Dincer PR, Cruz R, Carracedo A, Blanco J, Dommisch H, Schaefer AS. RSPO4 is a potential risk gene of stages III-IV, grade C periodontitis through effects on innate immune response and oral barrier integrity. *J Clin Periodontol* 2023;50(4):476-86.
124. Kirsch N, Chang LS, Koch S, Glinka A, Dolde C, Colozza G, et al. Angiopoietin-like 4 Is a Wnt Signaling Antagonist that Promotes LRP6 Turnover. *Dev Cell* 2017;43(1):71-82.
125. Szenker-Ravi E, Altunoglu U, Leushacke M, Bosso-Lefèvre C, Khatoo M, Thi Tran H, et al. RSPO2 inhibition of RNF43 and ZNRF3 governs limb development independently of LGR4/5/6. *Nature*. 2018;557(7706):564-9.
126. Liu J, Cui Z, Wang F, Yao Y, Yu G, Liu J, et al. Lrp5 and Lrp6 are required for maintaining self-renewal and differentiation of hematopoietic stem cells. *FASEB J* 2019;33(4):5615-25.
127. Rajput RV, Arnold DE. GATA2 Deficiency: Predisposition to Myeloid Malignancy and Hematopoietic Cell Transplantation. *Curr Hematol Malig Rep* 2023;18(4):89-97.

128. Zhu J, Yamane H, Cote-Sierra J, Guo L, Paul WE. GATA-3 promotes Th2 responses through three different mechanisms: induction of Th2 cytokine production, selective growth of Th2 cells and inhibition of Th1 cell-specific factors. *Cell Res.* 2006;16(1):3-10.

8. EKLER

Ek-1. Etik kurul onay belgesi



T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu

Sayı : 16969557-1931

Konu :

20.10.2020

Prof. Dr. Pervin Rukiye DİNÇER
Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı
Öğretim Üyesi

Sayın Prof. Dr. DİNÇER,

Kurulumuza değerlendirilmek üzere sunduğunuz GO 20/939 kayıt numaralı ve "*Periodontitise Yatkınlıkta Rol Oynadığı Düşünülen RSPO4 Genine Ait Putatif Bir Düzenleyici Bölgenin Gen İfadesini Hızlandırıcı Etkisinin Gösterilmesi*" başlıklı proje Kurulumuzun 20.10.2020 tarihli toplantısında değerlendirilmiş olup, çalışmanın satın alınmış ticari hücre hatları üzerinde tamamlanacağı görülmüştür. Gönüllü insanlar üzerinde gerçekleştirilecek nitelikte olmayan bu tip çalışmalar Etik Kurulların kapsamı dışında kalmaktadır.

Bu yazı ilgili protokolün etik açıdan incelendiğini belirtmek için Etik Kurul kararına yerine geçmek üzere hazırlanmıştır.

Prof. Dr. Aýşe Lale DOĞAN
Başkan

EK _____ :
Toplantı Katılım Tutanağı.

Ek-2. Orjinallik ekran çıktısı

Turnitin - Orjinallik Raporu - PERİODONTİTİSE YATKINLIKTA ROL ...İCİ BÖLGENİN GEN İFADESİNİ HIZLANDIRICI ETKİSİNİN GÖSTERİLMESİ 7.07.2023 10:13

Benzerlik Endeksi	Kaynağa göre Benzerlik
%5	İnternet Sources: %5 Yayınlar: %1 Öğrenci Ödevleri: %1

Turnitin Orjinallik Raporu

İşleme kodu: 07-Tem-2023 09:59 +03
NUMARA: 2127609745
Kelime Sayısı: 10532
Gönderildi: 1

PERİODONTİTİSE YATKINLIKTA ROL OYNADIĞI DÜŞÜNÜLEN RSP04 GENİNE AİT PUTATİF BİR DÜZENLEYİCİ BÖLGENİN GEN İFADESİNİ HIZLANDIRICI ETKİSİNİN GÖSTERİLMESİ H.
Gencay Keçeli tarafından

1% match (22-Ara-2022 tarihli internet)
<http://openaccess.hacettepe.edu.tr:8080/xmlui/bitstream/handle/11655/26007/FARKLI%20E%49e%4c4%b0T%4c4%b0M%20D%4c3%9cZEYLEisAllowed=y&sequence=2>

1% match (01-Nis-2023 tarihli internet)
<http://openaccess.ogu.edu.tr:8080/xmlui/bitstream/handle/11684/4128/163D.pdf?isAllowed=y&sequence=3>

< 1% match (28-Eyl-2022 tarihli internet)
<https://ddd.uab.cat/pub/tesis/2002/tx-0507103-195651/gda4de7.pdf>

< 1% match (03-Eki-2022 tarihli internet)
https://acikbilim.yok.gov.tr/bitstream/handle/20.500.12812/495310/yokAcikBilim_151008.pdf?isAllowed=y&sequence=-1

< 1% match (25-Eyl-2022 tarihli internet)
https://acikbilim.yok.gov.tr/bitstream/handle/20.500.12812/355787/yokAcikBilim_10018779.pdf?isAllowed=y&sequence=-1

< 1% match (24-Eyl-2022 tarihli internet)
https://acikbilim.yok.gov.tr/bitstream/handle/20.500.12812/260167/yokAcikBilim_10251451.pdf?isAllowed=y&sequence=-1

< 1% match (14-Şub-2014 tarihli internet)
http://edoc.ub.uni-muenchen.de/4094/1/Roth_Erik.pdf

< 1% match (16-Ara-2022 tarihli internet)
<http://www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080/xmlui/bitstream/handle/11655/23535/Zeynep%20C%87%C4%B0NAR%20Y%C3%BCksek%20CD.pdf?sequence=1>

< 1% match (22-May-2021 tarihli internet)
<http://www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080/xmlui/bitstream/handle/11655/22172/26-Bar%C4%B1%C5%9F%20Demir%20-%20Y%C3%BCksek%20Lisans%20Tezi..pdf?isAllowed=y&sequence=4>

< 1% match (27-Kas-2020 tarihli öğrenci ödevleri)
Submitted to Hacettepe University on 2020-11-27

< 1% match (12-Ara-2021 tarihli internet)
<https://docplayer.biz.tr/184913641-Periodontal-hastalıkların-siniflandırılması-prof-dr-burcu-cetinkaya.html>

< 1% match (31-Oca-2022 tarihli internet)
<http://docplayer.biz.tr/37152423-Tarihli-yonetim-kurulu-toplantisi-karara-baglanan-gundem-ve-ek-gundem-maddeleri.html>

< 1% match (10-Ağu-2017 tarihli internet)
<http://123doc.org/document/1871421-tien-viet-nam.htm>

< 1% match (02-Tem-2021 tarihli öğrenci ödevleri)
Submitted to Mersin Üniversitesi on 2021-07-02

< 1% match (13-Kas-2021 tarihli internet)
<http://www.btc.org.ly/new-btc/annual-reports/annual-report-2016.pdf>

< 1% match (17-Oca-2023 tarihli internet)
<https://www.mdpi.com/1999-4923/15/1/98/htm>

< 1% match (08-Eki-2022 tarihli internet)
<https://fjfsdata01prod.blob.core.windows.net/articles/files/832348/pubmed-zip/.versions/1/.package-entries/fcell-10-832348/fcell-10-832348.pdf?rscd=attachment%3B+filename%2A%3DUTF-8%27%27fcell-10-832348.pdf&se=2022-10-08T11%3A35%3A57Z&sig=sBDo03xq5Ik2kgBPRNz%2BLgJpyT3sCZGz1xLftZfWv4%3D&sp=r&sr=b&sv=2018-03-28>

< 1% match (19-Haz-2017 tarihli internet)
<http://orca.cf.ac.uk/54393/1/U584494.pdf>


< 1% match (19-Oca-2023 tarihli internet)
<https://patents.google.com/patent/ES2545209T3/en>

< 1% match ()
<http://www.ndsu.nodak.edu/instruct/juell/cs724s98/foils/BP-NN/demo.c>

< 1% match (31-May-2023 tarihli internet)
<http://acikerisim.nevsehir.edu.tr/handle/20.500.11787/374?locale-attribute=tr>

< 1% match (26-Ara-2022 tarihli internet)

Ek-3. Dijital makbuz




Dijital Makbuz

Bu makbuz ödevinizin Turnitin'e ulaştığını bildirmektedir. Gönderiminize dair bilgiler şöyledir:

Gönderinizin ilk sayfası aşağıda gönderilmektedir.

Gönderen:	H. Gencay Keçeli
Ödev başlığı:	PERIODONTİTİSE YATKINLIKTA ROL OYNADIĞI DÜŞÜNÜLEN R...
Gönderi Başlığı:	PERIODONTİTİSE YATKINLIKTA ROL OYNADIĞI DÜŞÜNÜLEN R...
Dosya adı:	TURNITIN_H_Gencay_Keceli_YukseK_Lisans_Tezi_2.docx
Dosya boyutu:	6.81M
Sayfa sayısı:	50
Kelime sayısı:	10,532
Karakter sayısı:	73,748
Gönderim Tarihi:	07-Tem-2023 09:59ÖÖ (UTC+0300)
Gönderim Numarası:	2127609745



Copyright 2023 Turnitin. Tüm hakları saklıdır.

9. ÖZGEÇMİŞ

Uluslararası Yayınlar

1. Chopra A, Song J, Weiner J 3rd, Keceli HG, Dincer PR, Cruz R, Carracedo A, Blanco J, Dommisch H, Schaefer AS. RSPO4 is a potential risk gene of stages III- IV, grade C periodontitis through effects on innate immune response and oral barrier integrity. *J Clin Periodontol*. 2023 Apr;50(4):476-486. doi: 10.1111/jcpe.13758. Epub 2022 Dec 15. PMID: 36507580.
2. Parlak HM, Durmaz MH, Bayrak H, Yilmaz BT, Keceli HG. Cyanoacrylate and hyaluronic acid combination on palatal donor site management after de-epithelialized graft harvesting. *J Periodontol*. 2023 Apr;94(4):519-528. doi:10.1002/JPER.22-0409. Epub 2022 Nov 30. PMID: 36369975.
3. Ozcan Bulut S, Ilhan D, Karabulut E, Caglayan F, Keceli HG. Efficacy of platelet-rich fibrin and connective tissue graft in papilla reconstruction. *J Esthet Restor Dent*. 2022 Oct;34(7):1096-1104. doi: 10.1111/jerd.12937. Epub 2022 Jun 22. PMID: 35731089.
4. Yilmaz BT, Comerdiv E, Kutuk C, Nart J, Keceli HG. Modified coronally advanced tunnel versus epithelialized free gingival graft technique in gingival phenotype modification: a comparative randomized controlled clinical trial. *Clin Oral Investig*. 2022 Oct;26(10):6283-6293. doi: 10.1007/s00784-022-04580-0. Epub 2022 Jun 16. PMID: 35708779.
5. Evginer MS, Olgun E, Parlak HM, Dolgun AB, Keceli HG. Comparison of two techniques in gingival recession treatment: A randomized one-year clinical follow-up study. *Dent Med Probl*. 2022 Jan-Mar;59(1):121-130. doi: 10.17219/dmp/137621. PMID: 35394710.
6. Richter GM, Kruppa J, Keceli HG, Ataman-Duruel ET, Graetz C, Pischon N, Wagner G, Rendenbach C, Jockel-Schneider Y, Martins O, Bruckmann C, Staufenbiel I, Franke A, Nohutcu RM, Jepsen S, Dommisch H, Schaefer AS. Epigenetic adaptations of the masticatory mucosa to periodontal inflammation. *Clin Epigenetics*. 2021 Nov 3;13(1):203. doi: 10.1186/s13148-021-01190-7. PMID:34732256; PMCID: PMC8567676.
7. Mueller R, Bajric D, Keceli HG, Keller A, Dommisch H, Elsharawy A, Schaefer AS. hsa-miR-374b-5p regulates expression of the gene U2AF homology motif (UHM)kinase 1. *J Periodontal Res*. 2021 Dec;56(6):1028-1036. doi: 10.1111/jre.12913. Epub 2021 Jun 23. PMID: 34160076.
8. Parlak HM, Akman AC, Comerdiv E, Kosemehmetoglu K, Inkaya AC, Keceli HG. An Unusual Case of Early Dental Implant Failure in an Otherwise-Healthy Patient due to Actinomycosis. *J Oral Implantol*. 2022 Jun 1;48(3):226-236. doi: 10.1563/aaid-joi-D-20-00301. PMID: 34091675.
9. Keceli HG, Bayram C, Celik E, Ercan N, Demirbilek M, Nohutcu RM. Dual delivery of platelet-derived growth factor and bone morphogenetic factor-6 on titanium surface to enhance the early period of implant osseointegration. *J Periodontal Res*. 2020 Oct;55(5):694-704. doi: 10.1111/jre.12756. Epub 2020 Aug 9. PMID: 32776328.

10. Keceli HG, Ercan N, Karsiyaka Hendek M, Kisa U, Mesut B, Olgun E. The effect of the systemic folic acid intake as an adjunct to scaling and root planing on clinical parameters and homocysteine and C-reactive protein levels in gingival crevicular fluid of periodontitis patients: A randomized placebo-controlled clinical trial. *J Clin Periodontol*. 2020 May;47(5):602-613. doi: 10.1111/jcpe.13276. Epub 2020 Mar 16. PMID: 32109317.
11. Ozdemir Y, Keceli HG, Helvacı N, Erbas T, Nohutcu RM. The tendency of reduced periodontal destruction in acromegalic patients showing similar inflammatory status with periodontitis patients. *Endocrine*. 2019 Dec;66(3):622-633. doi: 10.1007/s12020-019-02060-2. Epub 2019 Sep 2. PMID: 31478163.
12. Dursun E, Keceli HG, Dolgun A, Velasco-Torres M, Olculer M, Ghoreishi R, Sinjab K, Sinacola RA, Kubilius M, Tözüm MD, Galindo-Moreno P, Yilmaz HG, Wang HL, Juodzbaly G, Tözüm TF. Maxillary Sinus and Surrounding Bone Anatomy With Cone Beam Computed Tomography After Multiple Teeth Loss: A Retrospective Multicenter Clinical Study. *Implant Dent*. 2019 Jun;28(3):226-236. doi:10.1097/ID.0000000000000862. PMID: 31124819.
13. Munz M, Willenborg C, Richter GM, Jockel-Schneider Y, Graetz C, Staufienbiel I, Wellmann J, Berger K, Krone B, Hoffmann P, van der Velde N, Uitterlinden AG, de Groot LCPGM, Sawalha AH, Direskeneli H, Saruhan-Direskeneli G, Guzeldemir- Akcakanat E, Keceli HG, Laudes M, Noack B, Teumer A, Holtfreter B, Kocher T, Eickholz P, Meyle J, Doerfer C, Bruckmann C, Lieb W, Franke A, Schreiber S, Nohutcu RM, Erdmann J, Loos BG, Jepsen S, Dommisch H, Schaefer AS. A genome-wide association study identifies nucleotide variants at SIGLEC5 and DEFA1A3 as risk loci for periodontitis. *Hum Mol Genet*. 2018 Mar 1;27(5):941-942. doi: 10.1093/hmg/ddy015. Erratum for: *Hum Mol Genet*. 2017 Jul 1;26(13):2577-2588. PMID: 29346566.
14. Keceli HG, Dursun E, Dolgun A, Velasco-Torres M, Karaogullari S, Ghoreishi R, Sinjab K, Sheridan RA, Kubilius M, Tözüm MD, Galindo-Moreno P, Yilmaz HG, Wang HL, Juodzbaly G, Tözüm TF. Evaluation of Single Tooth Loss to Maxillary Sinus and Surrounding Bone Anatomy With Cone-Beam Computed Tomography: A Multicenter Study. *Implant Dent*. 2017 Oct;26(5):690-699. doi: 10.1097/ID.0000000000000652. PMID: 28885316.
15. Munz M, Willenborg C, Richter GM, Jockel-Schneider Y, Graetz C, Staufienbiel I, Wellmann J, Berger K, Krone B, Hoffmann P, van der Velde N, Uitterlinden AG, de Groot LCPGM, Sawalha AH, Direskeneli H, Saruhan-Direskeneli G, Guzeldemir- Akcakanat E, Keceli HG, Laudes M, Noack B, Teumer A, Holtfreter B, Kocher T, Eickholz P, Meyle J, Doerfer C, Bruckmann C, Lieb W, Franke A, Schreiber S, Nohutcu RM, Erdmann J, Loos BG, Jepsen S, Dommisch H, Schaefer AS. A genome-wide association study identifies nucleotide variants at SIGLEC5 and DEFA1A3 as risk loci for periodontitis. *Hum Mol Genet*. 2017 Jul 1;26(13):2577-2588. doi: 10.1093/hmg/ddx151. Erratum in: *Hum Mol Genet*. 2018 Mar 1;27(5):941-942. PMID:28449029.
16. Keceli HG, Dolgun A, Aydemir Turkal H. Letter to the editor. *J Clin Periodontol*. 2017 Jun;44(6):632-634. doi: 10.1111/jcpe.12703. Epub 2017 Mar 6. PMID: 28261850.

17. Cavdar FH, Keceli HG, Hatipoglu H, Demiralp B, Caglayan F. Evaluation of Extraction Site Dimensions and Density Using Computed Tomography Treated With Different Graft Materials: A Preliminary Study. *Implant Dent.* 2017 Apr;26(2):270-274. doi: 10.1097/ID.0000000000000567. PMID: 28240608.
18. Aydemir Turkal H, Demirer S, Dolgun A, Keceli HG. Evaluation of the adjunctive effect of platelet-rich fibrin to enamel matrix derivative in the treatment of intrabony defects. Six-month results of a randomized, split-mouth, controlled clinical study. *J Clin Periodontol.* 2016 Nov;43(11):955-964. doi: 10.1111/jcpe.12598. Epub 2016 Sep 13. PMID: 27396428.
19. Dursun E, Keceli HG, Uysal S, Güngör H, Muhtarogullari M, Tözüm TF. Management of Limited Vertical Bone Height in the Posterior Mandible: Short Dental Implants Versus Nerve Lateralization With Standard Length Implants. *J Craniofac Surg.* 2016 May;27(3):578-85. doi: 10.1097/SCS.0000000000002459. PMID:26999693.
20. Keceli HG, Kamak G, Erdemir EO, Evginer MS, Dolgun A. The Adjunctive Effect of Platelet-Rich Fibrin to Connective Tissue Graft in the Treatment of Buccal Recession Defects: Results of a Randomized, Parallel-Group Controlled Trial. *J Periodontol.* 2015 Nov;86(11):1221-30. doi: 10.1902/jop.2015.150015. Epub 2015 Jul 16. PMID: 26177630.
21. Keceli HG, Aylikci BU, Koseoglu S, Dolgun A. Evaluation of palatal donor site haemostasis and wound healing after free gingival graft surgery. *J Clin Periodontol.* 2015 Jun;42(6):582-9. doi: 10.1111/jcpe.12404. Epub 2015 May 19. PMID: 25892528.
22. Erdemir EO, Hendek MK, Keceli HG, Apan TZ. Crevicular fluid levels of interleukin-8, interleukin-17 and soluble intercellular adhesion molecule-1 after regenerative periodontal therapy. *Eur J Dent.* 2015 Jan-Mar;9(1):60-65. doi: 10.4103/1305-7456.149644. PMID: 25713486; PMCID: PMC4319302.
23. Keceli HG, Hendek MK. Fifteen months follow-up of a hopeless tooth treated with two-step procedure involving intentional replantation and free gingival graft. *Eur J Dent.* 2014 Oct;8(4):559-562. doi: 10.4103/1305-7456.143644. PMID: 25512741; PMCID: PMC4253116.
24. Keceli HG, Guncu MB, Atalay Z, Evginer MS. Forced eruption and implant site development in the aesthetic zone: A case report. *Eur J Dent.* 2014 Apr;8(2):269-275. doi: 10.4103/1305-7456.130635. PMID: 24966782; PMCID: PMC4054062.
25. Tözüm TF, Keçeli HG. Treatment of peri-implant defect with modified sandwich bone augmentation. Case report and follow-up. *N Y State Dent J.* 2008 Jun-Jul;74(4):52-7. PMID: 18788182.
26. Keceli HG, Sengun D, Berberoğlu A, Karabulut E. Use of platelet gel with connective tissue grafts for root coverage: a randomized-controlled trial. *J Clin Periodontol.* 2008 Mar;35(3):255-62. doi: 10.1111/j.1600-051X.2007.01181.x. Epub 2008 Jan 5. PMID: 18190557.

27. Demiralp B, Keçeli HG, Kökat AM, Muhtarogullari M, Tuncel B, Eratalay K. Multidisciplinary approach for the treatment of an oblique root fracture: a case report. Dent Traumatol. 2007 Jun;23(3):167-72. doi: 10.1111/j.1600-9657.2005.00401.x. PMID: 17511838.
28. Hatipoğlu H, Keçeli HG, Güncü GN, Sengün D, Tözüm TF. Vertical and horizontal dimensional evaluation of free gingival grafts in the anterior mandible: a case report series. Clin Oral Investig. 2007 Jun;11(2):107-13. doi: 10.1007/s00784-006-0084-x. Epub 2007 Feb 9. PMID: 17294229.
29. Tözüm TF, Keçeli HG, Serper A, Tuncel B. Intentional replantation for a periodontally involved hopeless incisor by using autologous platelet-rich plasma. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2006 Jun;101(6):e119-24. doi: 10.1016/j.tripleo.2005.10.043. Epub 2006 Mar 24. PMID:16731375.
30. Tözüm TF, Keçeli HG, Güncü GN, Hatipoğlu H, Sengün D. Treatment of gingival recession: comparison of two techniques of subepithelial connective tissue graft. J Periodontol. 2005 Nov;76(11):1842-8. doi:10.1902/jop.2005.76.11.1842. PMID: 16274302.
31. Demiralp B, Keçeli HG, Muhtarogullar M, Serper A, Demiralp B, Eratalay K. Treatment of periapical inflammatory lesion with the combination of platelet- rich plasma and tricalcium phosphate: a case report. J Endod. 2004 Nov;30(11):796-800. doi: 10.1097/01.don.0000136211.98434.66. PMID: 15505514