



T.C.

ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

VBY-YL-2014-

**KÖPEKLERDE TELOMERAZ mRNA (dogTERT)
EKSPRESYONUNUN BELİRLENMESİ**

Nurten KURT

DANIŞMAN

Prof. Dr. Funda KIRAL

AYDIN-2014

T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
VBY-YL-2014-

KÖPEKLER DE TELOMERAZ mRNA (dogTERT)
EKSPRESYONUNUN BELİRLENMESİ

Nurten KURT

DANIŞMAN
Prof. Dr. Funda KIRAL

AYDIN-2014

T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE
AYDIN

Biyokimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı öğrencisi Nurten KURT tarafından hazırlanan **“Köpeklerde Telomeraz mRNA (dogTERT) Ekspresyonunun Belirlenmesi ”** başlıklı tez, 10/01/2014 tarihinde yapılan savunma sonucunda aşağıda isimleri bulunan jüri üyelerince kabul edilmiştir.

Ünvanı, Adı ve Soyadı :

1- Prof. Dr. Funda KIRAL

2- Prof. Dr. Ayşegül Günay BİLDİK

3- Doç. Dr. Hasret YARDİBİ

Üniversitesi :

Adnan Menderes Üniversitesi

Adnan Menderes Üniversitesi

İstanbul Üniversitesi

İmzası:



Jüri üyeleri tarafından kabul edilen bu Yüksek Lisans Tezi Enstitü Yönetim Kurulunun..... Sayılı kararıyla tarihinde onaylanmıştır.

Prof.Dr.Sacide KARAKAŞ

Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

Bu çalışmada Veteriner Fakültesi Kliniklerine aşı amacıyla getirilen ve özel köpek çiftliklerinde bakılan parazit muayeneleri yapılmış klinik olarak sağlıklı farklı yaşlarda 38 köpekten alınan kanlar kullanıldı. Bu kanlardan RNA izolasyonu ve ardından cDNA elde edip, telomeraz revers transkriptaz'ın mRNA ekspresyon düzeyleri karşılaştırıldı. DogTERT primerinin ekspresyonları değerlendirilerek, köpeklerde yaşa bağlı telomeraz enzim ekspresyon değişiklikleri incelendi.

Deney grubumuz; grup 1 (2,5-18 ay arası) ve grup 2 (3-6 yaş arası) olarak iki gruba ayrılmaktadır. Köpeklerin 15'i grup 1 ve 13'ü grup 2'yi oluşturmaktadır. Bu iki grup arasında ya da grupların kendi aralarındaki telomeraz enziminin mRNA ekspresyon düzeyindeki değişimleri Light Cycler Nano Real Time PCR (Roche) cihazı kullanılarak, eş zamanlı olarak ekspresyon düzeyleri izlendi ve sonuçlar kantitatif olarak değerlendirildi.

Araştırma, 'köpeklerde telomeraz mRNA (dogTERT) ekspresyonunun belirlenmesi' isimli ve VTF-14029 kodlu proje olarak, Adnan Menderes Üniversitesi BAP komisyonu tarafından desteklenerek gerçekleştirilmiştir.

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	ii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	iv
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	v
ŞEKİLER DİZİNİ.....	vi
1. GİRİŞ.....	1
1.1. TELOMERLER.....	1
1.1.1. Telomeraz Enziminin Yapısı ve Alt Birimleri	4
1.1.1.1. Telomeraz RNA Alt Birimi (TR):	5
1.1.1.2. Telomerazın katalitik alt birimi (TERT):	6
1.1.1.3. Telomeraz protein komponenti (TP 1):	7
1.1.2. Telomere Bağlanan Faktörler:	7
1.1.3. Telomerlerin Fonksiyonu	8
1.1.4. Telomeraz Enzimini Ölçüm Yöntemleri:	10
1.1.5. Telomeraz ve Kanser:	11
1.1.6. Telomeraz İnhibitörleri ve Kanser Tedavisi:	16
1.1.7. Telomer Uzunluğu ve Telomer Kaybı.....	16
1.1.8. Telomer ve Yaşlanma.....	20
1.2. PCR VE REAL TIME PCR	22
1.2.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonunun (PCR) Oluşum Mekanizması.....	22
1.2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonunun Temel Bileşenleri.....	22
1.2.3. PCR'nin İşleyişi.....	24
1.2.4. Real Time PCR.....	26
1.2.5. Real-time PCR'da Kullanılan Metodlar	27
1.2.6. Komperatif Cq (Threshold Siklus, Ct) Metodu	28

1.2.7. Revers Transkriptaz PCR	29
1.2.8. Gen ekspresyonu	29
2. GEREÇ VE YÖNTEM.....	31
2.1. Gereç.....	31
2.1.1. Kullanılan Cihazlar.....	31
2.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	31
2.1.3. Primerler	32
2.2. Yöntem.....	32
2.2.1. Total Kan RNA izolasyonu	32
2.2.2. cDNA kütüphanesinin oluşturulması.....	34
2.2.3. Real Time PCR ile Telomeraz mRNA Ekspresyonunun Kantitatif Olarak Belirlenmesi.....	34
2.2.4. PCR ürününün agaroz jel elektroforezinde kontrolü	35
3. BULGULAR	36
3.1. Grupların $\Delta\Delta Cq$ Değerleri.....	36
3.2. Telomeraz Reverse Transkriptaz (dogTERT) Geninin mRNA Ekspresyonu	39
3.3. Melting Point (T_m) Analizi	42
3.4. PCR Ürünlerinin Agaroz Jelinde Kontrolü	44
3.5. RNA'nın Kantitatif Tayini.....	45
4. TARTIŞMA.....	47
5. SONUÇ.....	53
ÖZET.....	54
ABSTRACT	55
KAYNAKLAR.....	56
ÖZGEÇMİŞ.....	67
TEŞEKKÜR	68

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AZT	Azidotimidin
cDNA	Komplementer DNA
ddG	Dideoksiguanin
dNTP	Deoksiribonükleozid Trifosfat
hTERT	İnsan Telomeraz Revers Transkriptaz
M1 Evresi	Mortalite 1
MgCl ₂	Magnezyum Klorür
mRNA	Mesajcı RNA
p53	Tümör Protein 53
PBMC	Periferik Kan Mononükleer Hücresi
PBS	Fosfat Salin Tablet
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PD	Population Doubling,
PNA	Peptid Nükleik Asit
qRT PCR	Kantitatif Real Time Polimeraz Zincir Reaksiyonu
Rb/p16	Retinoblastoma Protein
RT PCR	Revers Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu
TA	Telomeraz Aktivitesi
Taq DNA	<i>Thermus aquaticus</i> DNA
TMA/HPA	Transcription-Mediated Amplification and Hybridization Protection Assay
TP 1	Telomeraz Protein Komponenti
TPE	Telomer Pozisyon Etkisi
TR	Telomeraz RNA Alt Birimi
TRAP	Telomeric Repeat Amplification Protocol
TRF	Telomeraz Restriction Fragment
TL	Telomer Uzunluğu

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Primer dizilimi tablo.....	32
Çizelge 2.2. PCR Karışımı.....	35
Çizelge 2.3. Real Time PCR döngü koşulları.....	36

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. DNA replikasyonu.....	2
Şekil 1.2. Subtelomerik ve esas telomerik bölgeler.....	3
Şekil 1.3. Telomer replikasyonu.....	5
Şekil 1.4. Telomerde halka yapısına katılan proteinler.....	8
Şekil 1.5. Telomerazın Fonksiyonu.....	9
Şekil 1.6. Normal Hücrelerde ve Kanser Hücrelerinde Telomeraz Enzimi Tarafından Telomer Uzunluğunun Düzenlenmesi.....	12
Şekil 1.7. Normal ve kanserli hücrelerde telomer dinamiği	13
Şekil 1.8. Çeşitli hücrelerdeki telomer uzunluğunun zamana bağlı grafığı.....	21
Şekil 1.9. PCR işleyişi.....	25
Şekil 1.10. Kantitatif RT-PCR Amplifikasyonu.....	29
Şekil 3.1. 2,5-18 aylık köpeklerin qRT-PCR'den alınan ekspresyon değerlerinin grafığı.....	39
Şekil 3.2. 3-6 yaş arası (grup 2) köpeklerin qRT-PCR'den alınan ekspresyon değerlerinin grafığı.....	39
Şekil 3.3. Grup 1 ve 2'deki köpeklerin $\Delta\Delta Cq$ değerleri.....	40
Şekil 3.4. Grup 1 ve 2'deki köpeklere ait TERT ekspresyon düzeylerinin grafiksel karşılaştırılması.....	41
Şekil 3.5. Grup 1'deki köpeklere ait dogTERT ve dogGAPDH'in qRT-PCR'den elde edilen amplifikasyonun eşzamanlı ekspresyon görüntüsü.....	42
Şekil 3.6. Grup 2'deki köpeklere ait dogTERT ve dogGAPDH'in qRT-PCR'den elde edilen amplifikasyonun eşzamanlı ekspresyon görüntüsü.....	42
Şekil 3.7. Grup 1 ve 2'deki köpeklere ait dogTERT ve dogGAPDH'in real time pcr'da elde edilen amplifikasyonun eşzamanlı ekspresyon görüntüsü.....	43
Şekil 3.8. Grup 1 ve 2'deki köpeklere ait TERT mRNA ekspresyonunun melting point (Tm) grafikleri.....	44

Şekil 3.9. Grup 1 ve 2'deki köpeklere ait GAPDH mRNA ekspresyonunun melting point (Tm) grafikleri.....	44
Şekil 3.10. Grup 1'den rastgele seçilmiş PCR ürünlerinin %2'lik agaroz jel görüntüleri.....	45
Şekil 3.11. Grup 2'den rastgele seçilmiş PCR ürünlerinin %2'lik agaroz jel görüntüleri.....	46
Şekil 3.12. Grup 1 ve 2'deki köpeklerde RNA'nın kantitatif ölçümünün grafiksel gösterimi.....	47

TABLolar DİZİNİ

Tablo 3.1. TERT ekspresyon düzeyleri.1-23 arası 2,5-18 ay (grup 1), 24-38 arası 3-6 yaş (grup 2) arası köpeklerin değerleri.....	38
Tablo 3.5.1. RNA'nın kantitatif tayini.....	46
Tablo 3.5.2. Grup 1 ve 2'deki köpeklerin RNA yoğunluklarının ortalamaları.....	47

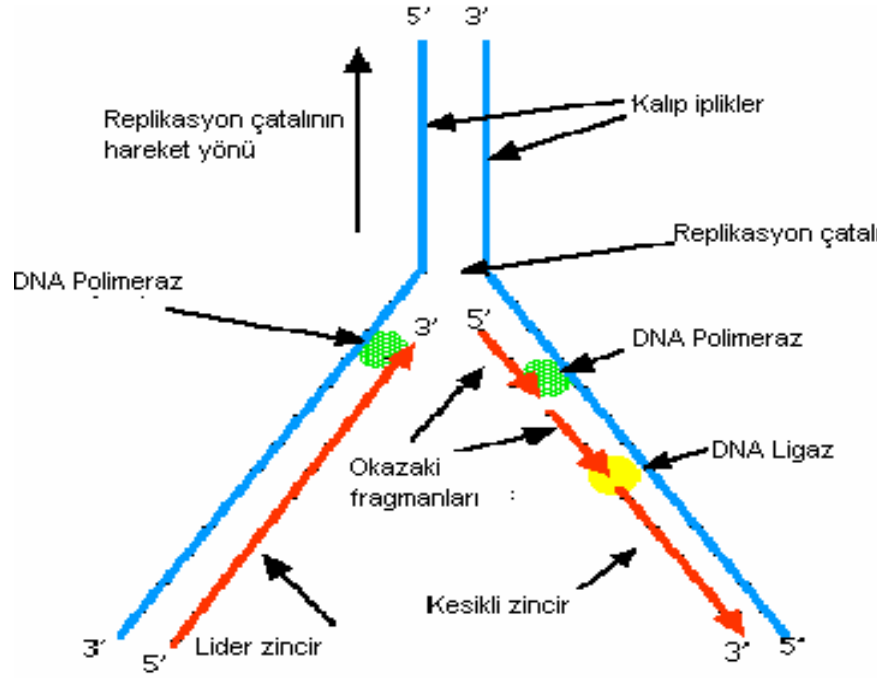
1. GİRİŞ

1.1. TELOMERLER

Ökaryotik hücrelerdeki DNA yapısı lineerdir. DNA'nın replikasyonu sırasında hem kesintisiz sentezlenen dizide hem de kesintili sentezlenen dizide polimerizasyonun başlaması için bir RNA primerine ihtiyaç vardır. Kesintisiz dizide bir tane primer yeterli olurken, kesintili dizide sentezlenen her DNA parçası için bir primere ihtiyaç vardır. Kesintili dizideki DNA-primer yapısının her birine “okazaki parçacığı“ denir (He ve ark. 2004).

Kesintili sentez, okazaki parçacıklarının DNA ligazla biraraya getirilmesi ile sonlanır. Kesintisiz sentezlenen dizide bir sorun olmaksızın replikasyon tamamlanırken; kesintili sentezlenen dizide, son okazaki parçacığı ile kromozomun sonu arasındaki bölgeyi doldurabilecek bir DNA parçası yoktur. Bu yüzden kromozomun uç kısmı replike olamaz ve telomer bölgeleri kısalır. Bu problem “replikasyon sonu problemi” olarak adlandırılır (Riethman ve ark. 2004).

Ökaryotik kromozomların sonlarında bulunan ve özel bilgi içermeyen telomerik DNA ile bu sorun çözümlenmiştir. Uçlarında telomerik DNA bulunan kromozomlara “telomerler“ adı verilmektedir. Telomerler hücrelerin çoğalma kapasitesini ve yaşlanmalarını kontrol eden moleküler bir saat gibi fonksiyon görmektedir (Kalmbach ve ark. 2013).



Şekil1.1. DNA replikasyonu (users.rcn.com)

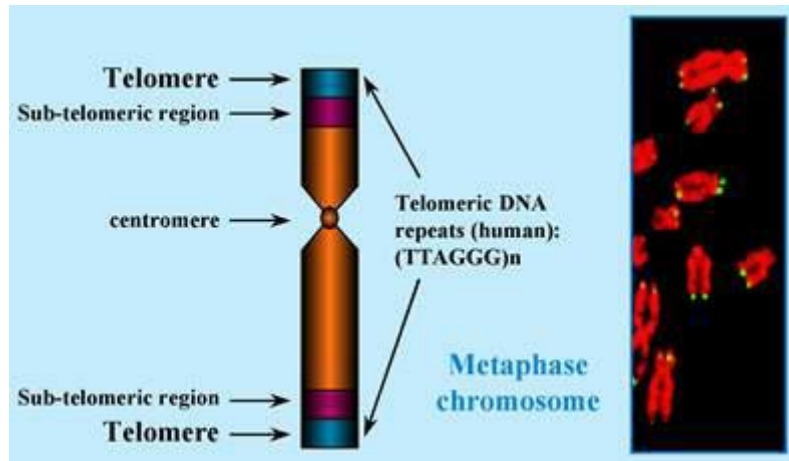
Telomerler ilk defa 1938'de Muller tarafından tanımlanmıştır. Ökaryotik kromozomların uçlarında yer alan ve çok sayıda "TTAGGG" dizi tekrarı içeren heterokromatik yapılar olan telomerler ekzonükleazlara ve ligazlara dirençlidirler. Telomerler kromozomları parçalanma, füzyon, rekombinasyon gibi olaylardan koruyarak kromozom bütünlüğünün sürdürülmesini sağlarlar (Metzger ve ark. 2009).

Telomer dinamik bir yapıya sahiptir ve uzunluğu farklı orjinden kaynaklanan hücre veya organizmalar arasında değişir. Örneğin insanda uzunluğu 3-20 kb arasında değişirken, farelerde 150 kb' a kadar uzun olabilir (Long ve ark. 2005).

Telomer DNA'sı subtelomerik ve esas telomerik bölge olmak üzere iki kısımdan meydana gelir. Subtelomerik bölge, çift dal halinde olup, heterojen yapıda DNA tekrarları içerir. İnsan telomerlerinde bu bölge 40-60 kb uzunluğundadır ve bu bölge 5' uçtan 3' uca doğru TTGGG ve TGAGGG tekrarlarından oluşan 30-45 kb'lık uzun bloktan oluşur. Devamında ise TTAGGG tekrarı olan bir ara blok ve 10-15 kb uzunluğunda TTGGGG ve TGAGGG tekrarı içeren bir kısa bloktan oluşur. Esas telomerik bölge ise subtelomerik bölgeden sonra gelir ve kromozomun ucunu oluşturan bölgedir. Önce çift sonra tek dal

halinde devam eder. Esas telomerik bölge 5' uçtan 3' uca doğru TTAGGG tekrarları içerir. İnsan telomerlerinde 5-15 kb uzunluğundadır (Nelson ve Cox 2005). Memeli telomer ve subtelomerleri, sekans birleşimi ve gen içeriği açısından perisentromerik bölgeye benzerler. İkisi de yüksek DNA tekrar içeriği ile karakterizedir. Telomerler gen içermezken, subtelomerik bölge perisentromerik bölgeye benzer şekilde genden fakirdir (Lundblad ve Wright 1996).

Son çalışmalar, fare telomer ve subtelomerik kromatinlerinin histon modifikasyonları içerdiğini ve subtelomerik DNA'nın metillenebildiğini göstermiştir. Telomerik kromatindeki histon modifikasyonları veya subtelomerik DNA metilasyonundaki değişiklikler telomer uzunluğundaki düzensizlik ile ilişkili bulunmuştur (Blackburn 1991). Memeli telomerleri de mayalarda olduğu gibi telomer pozisyon etkisi (TPE) nedeniyle subtelomerik genleri susturma yeteneğine sahiptir (Coşan 2006).



Şekil 1.2. Subtelomerik ve esas telomerik bölgeler (Miroğlu 2011)

Telomerik DNA'nın hücre siklusuna bağlı olarak kaybı ve yeniden kazanılması olayına “telomer dinamiği” denmektedir. Telomerler bu özelliğiyle kromozomun geri kalan kısımlarından ayrılırlar. Her hücre siklusunda kaybedilen telomerik DNA miktarı, yeniden sentezlenen telomerik DNA miktarından fazla olduğundan insan somatik hücrelerinde telomer dinamiği negatiftir. Replikasyon sonu problemini kompanse edecek moleküler mekanizmaların yokluğunda, normal somatik insan hücrelerinde her hücre bölünmesinde 50-200 nükleotidlik kayıp izlenmekte ve hücreler 40-70 PD (population doubling, hücre bölünmesi) sonrasında yaşlanmaktadır (Cong ve ark. 2002).

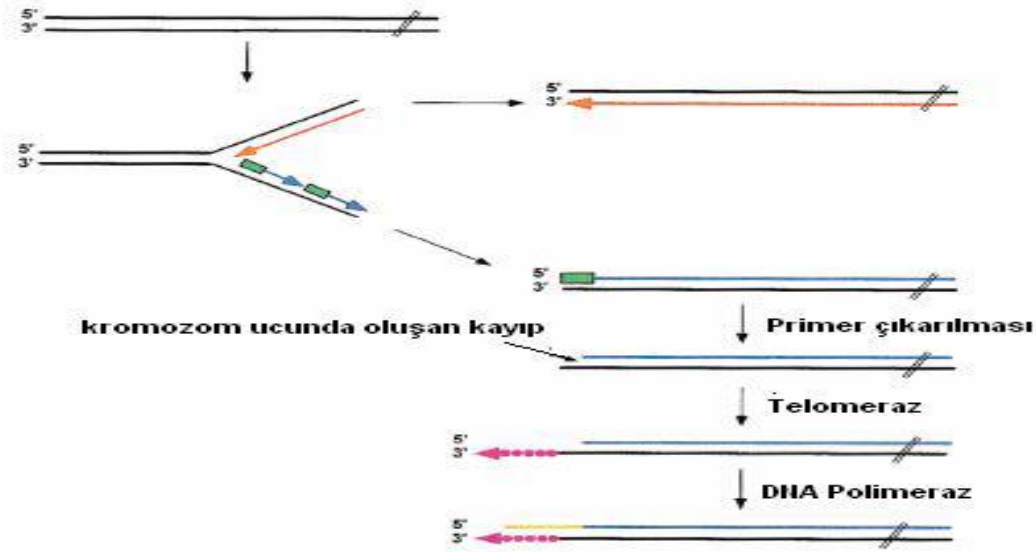
1.1.1. Telomeraz Enziminin Yapısı ve Alt Birimleri

Telomeraz veya diğerk bir adlandırmayla telomer terminal transferaz, kendi RNA alt birimini kalıp olarak kullanarak sentezlediğı hekzamerik tekrarları (TTAGGG) telomer uçlarına ekleyen ribonükleoprotein yapıda bir ters transkriptazdır (Long ve ark. 2005).

İlk defa Greider ve Blackburn (1985) tarafından *Tetrahymena*'da tanımlanan telomeraz enzimi, daha sonraları insanlarda Morin (1989) tarafından HeLa hücrelerinde de gösterilmiştir. Embriyonik hücreler ve erişkin kök hücrelerinde aktif olan bu enzim, normal somatik hücrelerde belirlenememiş, immortal kanser hücrelerinde ise reaktif olduğı görülmüştür (Koutroumba ve ark. 2003).

Elizabeth Blackburn ve Jack Szostak, kromozomları yıkımdan koruyan telomerlerde, benzeri olmayan DNA dizisini keşfettiler. Carol Greider ve Elizabeth Blackburn, telomer DNA'sını meydana getiren telomeraz enzimini belirledi. Bu keşifler kromozom uçlarının telomerlerle nasıl korunduğunu ve telomerazlarla nasıl yapıldıklarını açıkladı. Amerikalı bu üç bilim adamı işbirliğinin verimli sonuçlarını alarak "Kromozomların Telomerler ve Telomeraz Enzimi İle Nasıl Korundukları" konulu çalışmalarıyla 2009 yılı fizyoloji/tıp alanında Nobel ödölüne layık görüldüler (<http://www.thd.org.tr>).

DNA polimerazlar, primerleri sadece 5'den 3' yönünde uzattıkları için doğrusal DNA moleküllerinin uç dizilerinin replikasyonu için özel mekanizmalara ihtiyaç vardır. Bu diziler (telomerler), basit DNA dizisi ardışık tekrarlarını içerirler. Bunlar sentezlerini DNA kalıbı olmaksızın katalizleyerek telomerleri koruyan, telomeraz olarak adlandırılan nadir bir enzim sayesinde replike olurlar. Telomerazın, uç tekrar dizilerine tamamlayıcısı olan kendi kalıp RNA'sını, enzim kompleksinin bir parçası olarak taşıması önemlidir. Bu RNA'nın kalıp olarak kullanılmasıyla telomeraz, uç tekrar dizilerin çoklu kopyasını oluşturabilmekte ve böylelikle bir DNA kalıbı kullanmadan telomerleri korumaktadır (Edo ve Andres 2005).



Şekil 1.3. Telomer replikasyonu: Kromozomun bir ucunun replikasyonu şekilde gösterilmektedir (www.readcube.com)

Telomeraz enziminin bilinen 3 bileşeni mevcuttur. Bunlar:

1. Telomeraz RNA alt birimi (TR)
2. Telomerazın katalitik alt birimi (TERT)
3. Telomeraz protein komponenti (TP 1)

1.1.1.1. Telomeraz RNA Alt Birimi (TR):

Telomeraz RNA alt birimi kendi RNA alt birimini kalıp olarak kullandığından dolayı diğer ters transkriptaz enzimlerden ayrılır. TR, RNA polimeraz II tarafından transkripsiyona uğratılmakta ve 5' ucuna yakın olan bölgede telomer DNA'sına tutunma ve revers transkripsiyon için kalıp olarak kullanılmaktadır. Bu nedenle antitelomeraz tedavi için uygun bir hedeftir (Angelopoulou ve ark. 2008).

İnsanlarda telomeraz RNA alt birimi hTR olarak gösterilmektedir. Yapılan çalışmalarda hTR mRNA ekspresyonuna hem kanserli, hem de normal dokularda rastlanmıştır. hTR ekspresyonu, kanser hücrelerine göre daha düşük olmakla birlikte tüm somatik hücrelerde mevcuttur ve telomeraz ekspresyonu olmayan hücrelerde hTR'nin rolü kesin olarak bilinmemektedir. hTR geni 3 nolu kromozomun uzun kolunda tek kopya olarak bulunmaktadır (Rojas ve ark. 2012).

1.1.1.2. Telomerazın katalitik alt birimi (TERT):

TERT (Telomeraz Revers Transkriptaz), telomerazın ters transkriptaz aktiviteli kısmıdır. TR'in kalıp kısmı telomere bağlanırken komplementer bazlar kalıba uygun olarak TERT tarafından eklenir ve telomerin uzaması sağlanır (Edo ve Andres 2005).

TERT, genelde tüm canlılarda benzer olmakla beraber aralarında bazı farklılıklarında olduğu görülmektedir. Telomerazın katalitik alt birimi ilk olarak *Euplotes aediculatus*'den p123 şeklinde saflaştırılmıştır (Jarstfer ve Cech 2002). İnsanlarda da hTERT (Thewissen ve ark. 2005) ismini alırken köpeklerde dogTERT (Nasir 2004), farelerde rTERT (Long ve ark. 2005), tavuklarda chTERT (Delany ve Daniels 2004) olarak adlandırılmaktadır.

hTERT, 127 kDa'luk büyük bir proteindir. İnsan hTERT geni 16 ekson ve 15 intron içermekte olup, yaklaşık 40 kb'dır. İnsan diploid hücrelerinde hTERT geni tek kopya olarak 5. kromozom üzerinde bulunmaktadır. Telomeraz aktivitesi ile "hTERT"i kodlayan genin ekspresyon düzeyi arasında güçlü bir korelasyon saptanması, telomeraz aktivitesi regülasyonundan "hTERT" in sorumlu olduğunu düşündürmektedir (Rojas ve ark. 2012).

Canin familiaris (köpek)'den katalitik alt birimli telomerazın izolasyonu ve sekans karakterizasyonu ile ilgili çalışmalar dogTERT ile hTERT in büyük oranda yapısal benzerlik gösterdiğine işaret etmektedir (Angelopoulou ve ark. 2008).

Telomerazın katalitik bölgesinde ters transkriptaz aktivitesinden sorumlu yedi bölge olduğu bilinmektedir. Ters transkriptaz ünitesi proteinin karboksi ucunda, telomeraza özgül bölge olan "T-domain" ise amino ucunun hemen yanında yer almaktadır. N-ucu oldukça iyi korunmuş olup, "domain I, II ve III"ü içerir ki bu domainlerin tümü telomerlerin uzatılması için gereklidir (Dikmen ve ark. 2006).

1.1.1.3. Telomeraz protein komponenti (TP 1):

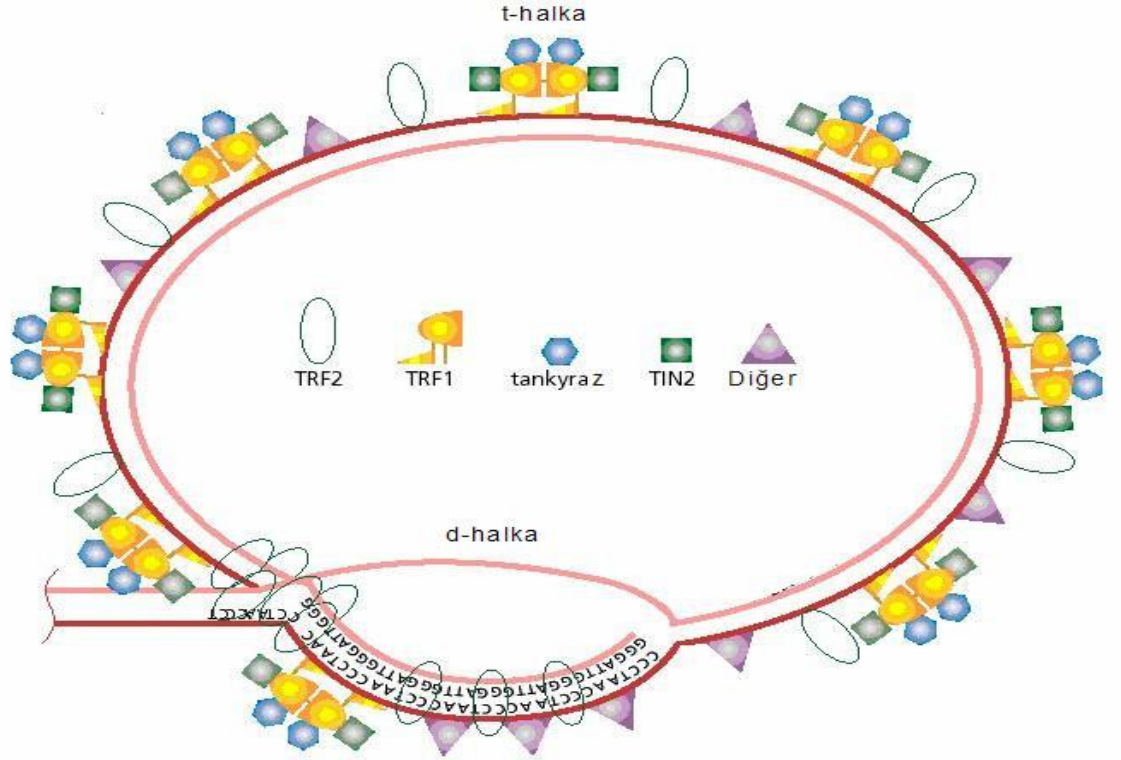
Telomeraz protein kompleksi telomeraz enziminin regülatör bileşeni olup, spesifik olarak telomerazın RNA alt birimini bağlar. RT-PCR ile yapılan çalışmalarda, hem telomeraz (+) hem telomeraz (-) hücrelerde TP1 mRNA ekspresyonuna rastlanmıştır. Bu yüzden bu bileşenin telomeraz enzim aktivitesinin kontrolünde etkin olmadığı düşünülmektedir. Ancak Nakayama ve ark. (1998) TP1 proteininin post-translasyonel modifikasyonunun, enzimatik aktivitenin düzenlenmesinde rolü olabileceğini bildirmişlerdir.

1.1.2. Telomere Bağlanan Faktörler:

Telomerik DNA tekrarlarına tutunan dizi spesifik olan proteinler, telomere bağlanan faktörler olarak adlandırılır. Bu proteinler telomer uzunluklarının düzenlenmesine ve telomerik stabilitenin sağlanmasına aracılık ederler. 1997'de Lange ve ark. , in vitro insan hücrelerinde "TTAGGG" dizisine spesifik olarak bağlanan "TRF1" ve "TRF2" proteinlerini tanımlamışlardır (Cherif ve ark. 2003). "TRF1", çift zincirli DNA'daki telomerik tekrarlara bağlanır ve telomerazın telomerlere bağlanmasını düzenleme ile telomer uzunluğu kontrolü yapar. Memeli telomerlerindeki TTAGGG dizilerini spesifik olarak tanıdığından dolayı TRF1, "TTAGGG tekrarına bağlanan faktör" olarak da bilinmektedir (Cherif ve ark. 2003).

"TRF2", amino ucunda "TRF1"e oranla daha fazla sayıda bazik aminoasit içermekte ve guanince zengin telomerik tek iplikçığı degradasyondan korumaktadır. Aynı zamanda DNA tamir aktivitelerinden de bu bölgeyi korur. Böylece kromozomların ucuca yapışmasını engelleyerek telomerlerin yapısını korumaktadır (Cherif ve ark. 2003).

Tamir yollarında rol alan DNA tamir proteinleri telomerlere komşu olacak şekilde bulunur. Bu DNA tamir proteinlerinin doğrudan TRF-2 kompleksi ile etkileştikleri düşünülmektedir (Iwama ve ark. 1998). Telomerlerin telomer bağlayıcı proteinler ve "TTAGGG" dizi tekrarlarından oluşan kısmı 'telezom' olarak adlandırılmaktadır.



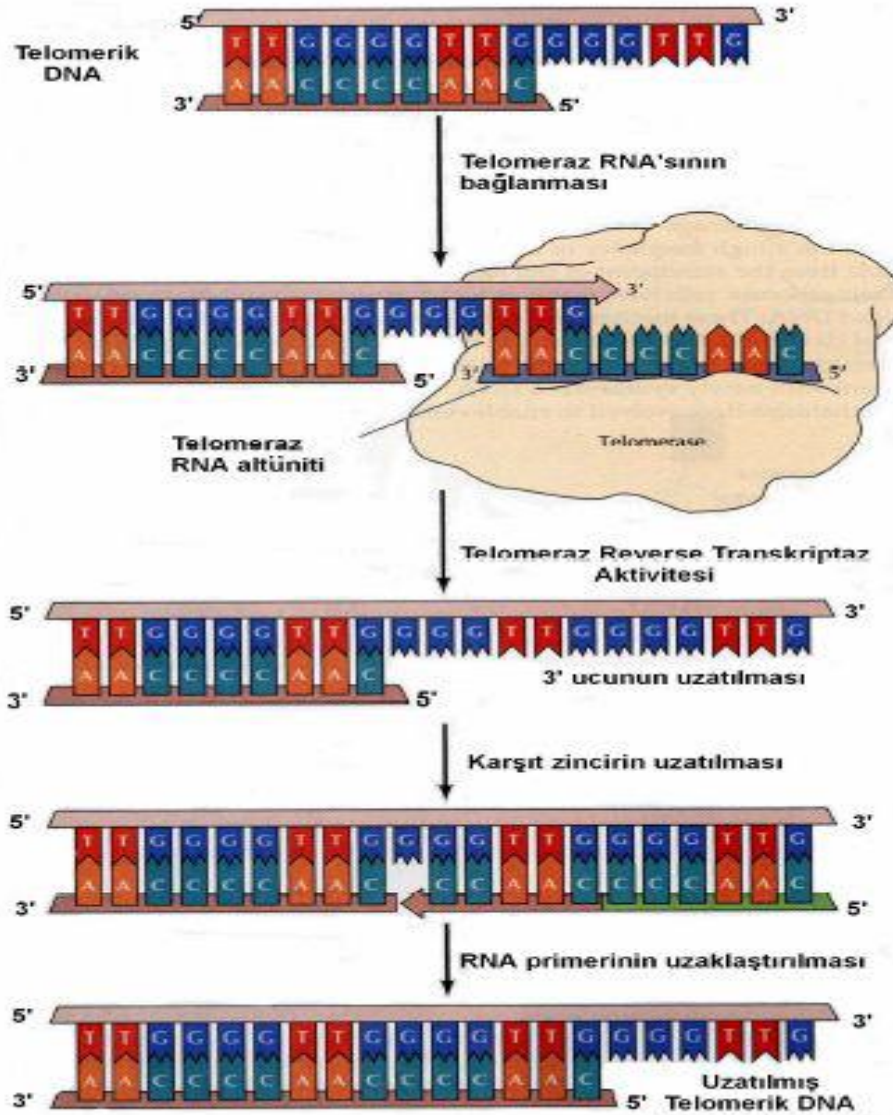
Şekil 1.4. Telomerde halka yapısına katılan proteinler (Miroğlu, 2011).

1.1.3. Telomerlerin Fonksiyonu

Telomerazlar genel olarak germ line hücreler (üreme hücreleri, yumurta ya da sperm hücreleri), embriyonik kök hücreler, tek hücreli ökaryotlar ve kanser hücrelerinde bulunurlar (Long ve ark. 2005). Telomeraz enziminin aktivitesini somatik hücrelerde kaybetmiş olması evrimsel bir avantaj sağlayarak hücreleri kanser hücrelerine transforme olma ve aşırı proliferasyona bağlı bozukluklardan korumaktadır (Lledo ve ark. 2003).

Telomerazın etki mekanizması ile ilgili ilk çalışmalar protozoa *Tetrahymena* üzerinde yapılmıştır. *Tetrahymena* telomerazı 3'-AACCCCAAC-5' dizisini barındıran 159 nükleotid uzunluğunda bir RNA ile kompleks yapmıştır. Bu dizi, *Tetrahymena* uç tekrarının 5'-TTAGGG-3' tamamlayıcısıdır ve telomerik DNA'nın sentezi için kalıp olarak görev yapmaktadır. Telomeraz bu RNA'yı kalıp olarak kullanır ve kromozomal DNA'nın 3' ucunu orijinal uzunluğunun bir birim ötesine uzatır. Sonrasında tamamlayıcı iplik, polimeraz- α primaz kompleksi tarafından RNA primeri kullanılarak sentezlenebilir. RNA primerin uzaklaştırılması kromozomal DNA'da çıkıntılı bir 3' ucu bırakır. Bu uç ökaryotik kromozomların uçlarında halkalar oluşturur (Edo ve Andres 2005).

Telomerlerin 3' ucunda bulunan guanin ve timince zengin 12-16 nükleotidlik kısımları telomer uzamasında kalıp görevi görür. TERT ise bu diziyeye tamamlayıcısı olan "GGTTAG" dizi tekrarlarını sentezler ve guanince zengin olan 3' ucuna ekler. RNA kalıbı yeni sentezlenen telomerik dizinin 3' ucuna doğru kayar. DNA polimeraz, telomerazın sentezlediği bu diziyi kalıp olarak kullanarak zinciri tamamlar (Yamada ve ark. 1995).



Şekil 1.5. Telomerazın Fonksiyonu (Ferreira ve ark. 2006)

1.1.4. Telomeraz Enzimini Ölçüm Yöntemleri:

Telomeraz aktivitesini saptamak amacıyla birçok yöntem geliştirilmiştir. Geliştirilen ilk yöntem telomerik tekrarların PCR ile çoğaltılması esasına dayanan TRAP (Telomeric Repeat Amplification Protocol) yöntemidir. Bu yöntem 1994’de Kim ve arkadaşları tarafından geliştirilmiştir. Fakat yöntemde miktar saptaması çok hassas değildir. Aktiviteyi nicel olarak saptamak zor olduğundan ve güvenilir sonuçlar vermediğinden, sonuçlar kalitatif olarak negatif veya pozitif olarak değerlendirilemektedir. TRAP’da karşılaşılan zorlukları aşabilmekve uygulamayı kolaylaştırmak için TRAP-eze ve TRAP-eze-Elisa kitleri geliştirilmiştir (McKevitt TP. 2002).

Aldous ve Grabill (1997) telomeraz aktivitesini saptamak için Floresan-TRAP yöntemini (F-TRAP) kullanmışlardır. Bu yöntemde radyoizotopların kullanımını elimine etmek için floresans işaretli primerler kullanılmaktadır.

Tatematsu ve arkadaşları (1996) TRAP’ı biraz daha geliştirip özel olarak dizayn edilmiş primerler kullanarak stretch-PCR yöntemi üzerine çalışmışlardır.

Hirose ve arkadaşları 1998 yılında Transcription-Mediated Amplification and Hybridization Protection Assay (TMA/HPA) yöntemini önermişlerdir. Bu yöntemin uygulaması kolay ve hızlıdır. Ayrıca klinik örneklerden gelebilecek TRAP inhibitörlerinden çok az etkilenmektedir. Telomeraz ürününün transkripsiyon yoluyla amplifikasyonu hızlı olduğundan ve tek bir kalıptan bir saat içinde milyarlarca RNA ampikonu oluşturulabildiğinden transkripsiyon basamağında su banyosu kullanılabilir. Bu yöntem RNA’larla hibridize olmuş ve olmamış problemlerin farklı hidroliz olmalarına ve telomeraz tarafından uzatılacak primere promotor eklenmesi esasına dayanır.

Gelmini ve arkadaşları 1998’de hızlı, miktara bağlı ve nonizotopik bir yöntem olan PicoGreen yöntemini geliştirmişlerdir. Bu yöntemde telomeraz ürününün çoğaltılmasında “stretch-PCR” yöntemi uygulanır. Yöntem floresan bir boya olan PicoGreen’in seçici olarak çift zincirli DNA’ya bağlanması esasına dayanır. Spektroflorometre kullanılarak floresans değeri okunur. DNA konsantrasyonu, kontrol DNA kullanılarak hazırlanan standart eğrisinden hesaplanır. Telomeraz aktivitesini belirleyen DNA miktarı ise; saptanan DNA miktarından, negatif kontrolde saptanan DNA’nın çıkarılması ile hesaplanır. RNaz ile muamele edilmiş hücre ya da doku homojenatı negatif kontrol olarak kullanılır.

Sonuçlar protein miktarı saptanmış her örnek için ngDNA/ μ g protein olarak verilir (Durusoy 2003).

Ohyashiki ve arkadaşları (1997) tümör hücrelerinde telomeraz enziminin varlığını TRAP yönteminin modifikasyonu olan *in situ* PCR yöntemi ile göstermişlerdir. Böylece hücre düzeyinde telomeraz aktivitesinin araştırılmasına olanak sağlanmıştır.

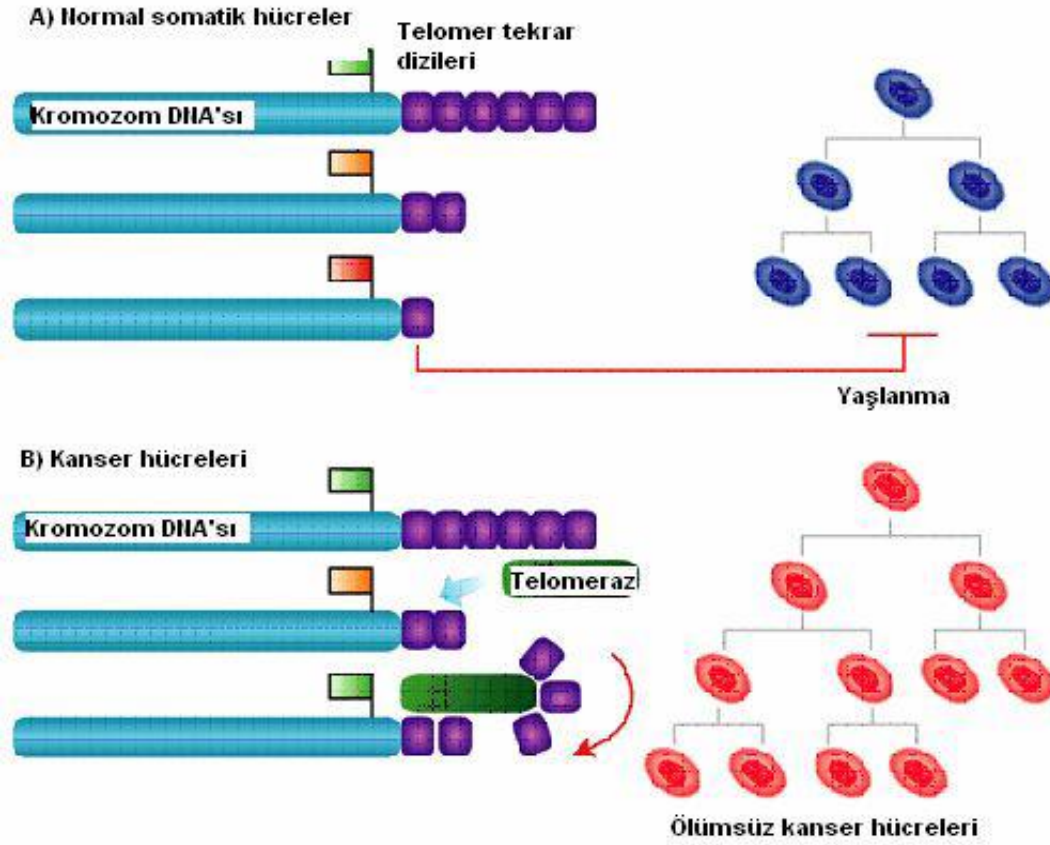
Yajima ve arkadaşları (1998) yılında TERT'in ekspresyon düzeyini saptamak için revers transkripsiyon PCR (RT-PCR) yöntemini geliştirmişlerdir. Bu metotta spesifik PCR ürününün değerlendirilmesinde DNA polimerazın 5'→3' ekzonükleaz aktivitesinden yararlanılmaktadır.

Fletcher ve arkadaşları 1999'da primerin parçalanmamış çekirdek içerisinde uzatıldığı bir sistem kullanmışlardır. Bu yöntem telomeraz aktivitesinin doğal ortamında araştırılması, enzimin fonksiyonun belirlenmesine ve yeni telomeraz inhibitörlerinin değerlendirilmesine kullanışlı bir metot oluşturmuştur.

Son yıllarda yapılan çalışmalar sonucunda, Telomeric Repeat Amplification Protocol (TRAP) yöntemi kullanılacaksa PicoGreen ile "stretch-PCR" yönteminin uygulanması, RT-PCR yöntemi kullanılacaksa TERT'in ifade edilme düzeyinin saptanmasının tercih edilebileceği düşünülmektedir (Zavlaris ve ark. 2009).

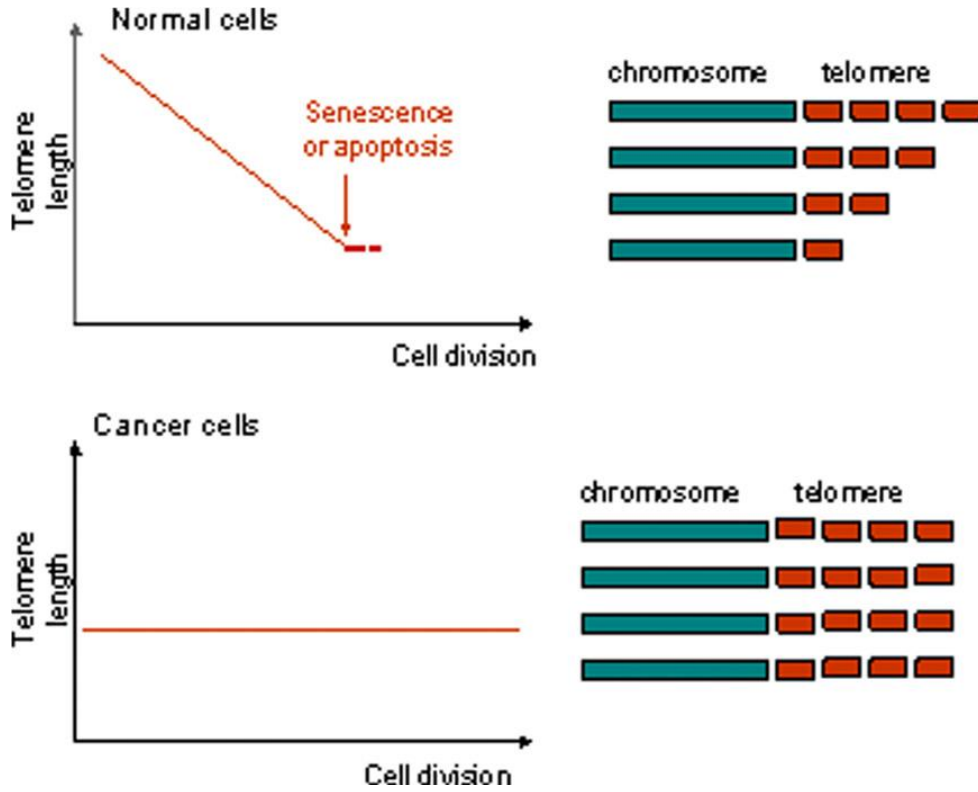
1.1.5. Telomeraz ve Kanser:

Replikasyon sonu problemine bağlı olarak; çok fazla bölünen hücreler (lenfositler, çok fonksiyonel doku hücreleri ve fibroblastik hücreler), telomerlerin boylarındaki kısalmadan en fazla etkilenen hücrelerdir (Long ve ark. 2005). İlerleyen yaşla birlikte mitotik replikasyona bağlı olarak telomerlerde izlenen ilerleyici kısalma, bu hücrelerde hücre yaşlanmaya yol açmaktadır (Yamada ve ark. 1995). Proliferasyon gösteren hücrelerde izlenen düşük düzeydeki telomeraz ekspresyonunun, kök hücre popülasyonunun yenilenmesi için gerekli olduğu düşünülmektedir. Telomer hipotezi ile uyumlu olarak, yaşlanmadan kaçarak ölümsüz olma özelliği kazanan tümör hücreleri, genetik kararlılığın ve telomer uzunluğunun sağlanabilmesi için telomeraz aktivitesine ihtiyaç duymaktadır (Kalmbach ve ark. 2013).



Şekil 1.6. Normal hücrelerde ve kanser hücrelerinde telomeraz enzimi tarafından telomer uzunluğunun düzenlenmesi (Tozkır 2008)

Telomer kısalması ile hücresel yaşlanma arasındaki mekanizmalar henüz tam olarak açıklanamamış olmasına rağmen tümör supresör genler ve hücre siklusu kontrol genleri (p53 ve Rb/p16) bununla ilişkili olabilir. Hücrelerin malignleşmesi için tek bir mutasyondan başka daha fazla sayıda mutasyon olması gerektiği ön görüşü hakimdir (Lin ve Elledge 2003; Nasir 2004). Mutasyonlar, telomerazı aktive eden telomeraz kontrol yolağında oluşmaktadır. Kanser hücrelerindeki telomeraz aktivitesi telomer uzunluğu ve hücresel ölümsüzlük ile doğru orantılıdır. Telomeraz aktivitesi veya telomer yapısını koruyan mekanizma, hücrelerin çoğalmasının devamı için gerekli ve kanser yayılmasında belkide hız kısıtlayıcı önemli bir basamaktır (Huh ve ark. 2005; Boldrini ve ark. 2006).



Şekil 1.7. Normal ve kanserli hücrelerde telomer dinamiği (Nasir 2008)

Kanser multifaktöryel bir hastalıktır ve bugüne kadar incelenen farklı tip tümörlerin %85'inden fazlasında telomeraz aktivitesinin tespit edilmesi, kanser hücrelerinde telomerazın reaktif olduğunu göstermektedir (Granger ve ark. 2002).

Ito ve ark (1998) mesane kanseri üzerine yaptıkları çalışmada, 33 mesane kanserli, 26 sağlıklı bireyi ve ayrıca 3 tane kanser hücre serisini (T24, RT4, KK47) çalışmalarına dahil etmişler ve hem kanserli hücre hatlarında hem de klinik olarak belirlenmiş kanserli dokularda telomeraz seviyelerinde ve hTERT ekspresyonunda artış gözlemlemişler. Sonuç olarak telomeraz aktivitesi ile kanserli dokulardaki hTERT ekspresyonu arasında korelasyon olduğunu bildirmişlerdir.

Lehner ve ark (2001) 26 endometrioid adenokarsinom ve 20 normal endometrioid dokudan total RNA ekstraksiyonu yaparak, TRAP metodu ile telomeraz aktivitesini ve qRT-PCR ile hTERT mRNA ekspresyon seviyelerini incelemişler. hTERT mRNA ve telomeraz aktivitesi arasında lineer bir ilişki olduğunu göstermişlerdir. Ayrıca tümör seviyesi ve benign endometriyum proliferasyon seviyelerinin de hTERT mRNA'sı ve telomeraz aktivitesi ile olan ilişkisini inceleyerek hem telomeraz aktivitesinin hem de

hTERT mRNA seviyesinin, endometriyal kanserli (44 relatif unit (RU), 179 pg/ng) dokularda normal (15 RU, 45 pg/ng) dokulara göre oldukça yüksek olduğunu tespit etmişlerdir.

Wang ve ark. (2002), 18 bireyin prostat sıvı örneklerinde (9'u prostat kanserli (PCa), 9'u sağlıklı bireyde) yapılan çalışmada, kanserli hücrelerde telomeraz aktivitesinin ($24,5 \pm 28,4$ U) sağlıklı bireylerden alınan hücrelerdekine göre ($7,2 \pm 2,2$ U) anlamlı bir artış gösterdiği prostat iğne biyopsi ile 48 bireyden (32 tanesi patolojik olarak kanserli olduğu belirlenmiş, 16 tanesi histolojik olarak belirlenmiş) alınan örneklerde telomeraz aktivitesi incelendiğinde ise patolojik olarak kanser tespit edilen bireylerdeki telomeraz aktivitesinin %95, diğer grubun ise %69 olduğunu bildirmişlerdir.

Lledo ve ark. (2004) yaptıkları çalışmada 50 sağlıklı, 50 kolorektal cerrahi kanserli bireyde plazma hTERT ekspresyonunu periferik kanda, qRT-PCR kullanarak saptamışlar ve kanserli hastalarda hTERT mRNA gen ekspresyonunun (0,23-47,67 ng) sağlıklı bireylerden (0,00-4,63 ng) daha fazla olduğunu gözlemişlerdir. Kanserli hastalar ile kontrol grubundaki 40 yaş üstü bireyler karşılaştırıldığında hTERT ekspresyonunda belirgin bir fark olduğunu bulmuşlar (kanserli ve sağlıklı bireylerde sırasıyla ortalama değerleri 11,52 ng ve 0,66 ng). Kadın ve erkek kanserli bireylerin hTERT ekspresyon düzeyleri karşılaştırıldığında ise kadınlar da hTERT ekspresyon düzeyi ortalama 13,62 ng iken erkeklerde 11,52 ng olarak bildirilmiştir.

Miura ve ark. (2005) 64 hepatoselüler karsinomalı (HCC), 20'si siroz, 20'si kronik hepatit ve 50 sağlıklı bireyde, serumda hTERT mRNA ve klinik HCC tanısının kantitatif olarak belirlenmesini geliştirmek amacıyla yaptıkları çalışmada serum hTERT mRNA ekspresyon seviyesinin HCC'li hastalarda oldukça yüksek olduğunu bildirmişlerdir. hTERT mRNA ekspresyonunun klinik çeşitlilikler (tümör büyüklüğü, sayısı ve derecesi) ile bağımsız korelasyona sahip olduğunu ve HCC teşhisinde hTERT mRNA ve α -fetoprotein (AFP) mRNA'nın düzeyinin duyarlılık/özgülük oranı hTERT için % 88,2/%70 iken, AFP için %71,6/%67,5 olarak bulunmuş serumdaki hTERT mRNA'nın düzeylerinin HCC dokuları ile ilişkili olduğu sonucuna varmışlardır.

Boldrini ve ark. (2006) glial tümörde telomeraz ekspresyonunun prognostik ve terapötik önemi açıklamak amaçlı yaptıkları bir çalışmada Gliomalarda %50 oranında

yüksek telomeraz aktivitesi belirleyerek Telomeraz mRNA ve enzim aktivitesi seviyeleri arasında önemli bir korelasyon olduğunu bildirmişlerdir.

Zavlaris ve ark. (2009) köpek (5-15 yaş arasında 50 dişi, 4 tanesi klinik olarak sağlıklı) meme dokularında dogTERT mRNA ekspresyonlarını incelemişler ve sonuçta dogTERT mRNA ekspresyonunu gerek qRT-PCR gerekse immunhistokimyasal yöntemler kullanarak; malign dokuda %96 oranında, bitişik normal dokularda %88 ve sağlıklı dokuda %50 oranında saptamışlardır.

Metzger ve ark. (2009) akciğer kanseri teşhisi konulmuş hastalarda doku hTERT mRNA ekspresyonunu qRT-PCR ve telomeraz aktivitesini de TRAP metoduyla analiz edilerek numunelerde hTERT mRNA ekspresyonunu %89,9 oranında belirlemişlerdir. Bu çalışma tümörlü hastalarda yüksek hTERT mRNA ekspresyonunun sağkalım avantajını göstermesi açısından bir ilk niteliğindedir.

Qi ve ark. (2011) immün trombositopenili (ITP) bireylerde, PBMC hücrelerinde qRT-PCR metoduyla telomeraz aktivitesini ölçmüşler, CD4+, CD8+, CD19+ lenfositlerinin, ITP'li hastalarda kontrol grubu bireylerin lenfositlerine göre telomeraz aktivitesinin daha fazla olduğu ve CD19+ hücre tipinde ise diğer iki lenfositlere göre telomeraz aktivitesi daha yüksek bulunduğu saptamışlardır. Çalışma ITP'de yüksek telomeraz aktivitesi ve kısa telomer uzunluğu açısından yapılmış ilk çalışmadır.

Rahmati-Yamchi ve ark. (2011) meme kanserli obez ve obez olmayan kadınlarda leptin seviyesi ile hTERT mRNA ekspresyonu arasında korelasyon olduğunu rapor etmişlerdir.

Akut myelojenik lösemi (AML) hastalarında yapılan bir çalışmada, hTERT mRNA ekspresyon düzeylerinin prognoz ve klinik bulgularla olan ilişkisi qRT-PCR metoduyla araştırılmış. 21 AML'li hastadan 54 kemik iliği örneği alınmış. Hem TRAP metodunda (%73-100) hem de qRT-PCR metodunda (%73-80) hTERT mRNA ekspresyonu seviyelerinin yakın olduğunu bildirmişler. Yüksek hTERT mRNA ekspresyonu olan hastalarda CR (complete remission)(%33) oranının düşük olduğunu belirlemişler (Huh ve ark. 2005).

1.1.6. Telomeraz İnhibitörleri ve Kanser Tedavisi:

Henüz spesifik inhibitörleri bulunmamış olmakla beraber, telomerazın DNA ile bağlantısını sağlayan kısmın bloke edilmesi kanser tedavisinde yeni bir umut kaynağı olarak düşünülmektedir. Telomeraz inhibitörleri, dirençli kanser hücrelerinin yeniden çoğalmasını önlemek için diğer tedavilerle bir arada veya onları takiben kullanılabilir. Ancak tedavi sırasında özellikle telomeraz aktivitesi gösteren hücrelerde (hematopoetik hücreler, üreme hücreleri, aktive T ve B lenfositler, proliferatif hücreler) yan etkileri olabileceği göz önünde bulundurulmalıdır (Rojas ve ark. 2012).

Telomeraz inhibisyonu; TR veya TERT'nin transkripsiyonu engellenerek, TR veya TERT mRNA'sı parçalanarak, TERT'nin sentezi ve sentez sonrası modifikasyonları önlenerek, enzimin aktif bölgesi bloke edilerek, TR ile TERT'nin birleşmesi; enzim kompleksinin çekirdeğe transfer olması veya substratı olan telomerlere tutunması engellenerek sağlanabilir (Tükün ve ark. 2006).

Telomerleri kendi RNA'sını kalıp olarak kullanarak sentezlediğinden dolayı telomeraz enzimi, RNA kalıbının fiziksel blokajıyla inhibe edilebilir. "Peptid nükleik asit" (PNA) bu amaçla kullanılabilir. Çünkü PNA telomeraz enziminin TR alt biriminin tamamlayıcısı olan diziyi içerir. Ayrıca PNA, negatif yüklü deoksiriboz fosfat birimi yerine nötral N-glisin içerir. PNA'lar, nükleazlarla veya proteazlarla parçalanmaya dirençlidirler ve in vitro şartlarda efektif inhibisyon yaparlar (Lichtsteiner 1999).

Telomerazın nükleotid bağlayıcı kısmının blokajı, telomeraz inhibisyonunda diğer bir hedeftir. Dideoksiguanin (ddG) ve azidotimidin (AZT) gibi ajanlar, spesifik olarak bu bölgeyi inhibe ederler (Rojas ve ark. 2012).

1.1.7. Telomer Uzunluğu ve Telomer Kaybı

Normal dokulardaki telomerin uzatılmasından sorumlu sistemler bölünme sırasında etkinliklerini sürdürmezler. Bu nedenle telomerler hücre bölünmesi sırasında kısalırlar. Telomer uzunluğu (TL) hücrelerin replikatif yaşama süresini belirler. Telomerler kritik uzunluğa kadar kısaldıklarında yaşlanma programı aktive olur. Bundan sonra hücre bölünmesi durur. Fakat hücre yaşamaya ve fonksiyon görmeye devam eder (Jesus ve ark. 2013).

Telomer uzunluğunu etkileyen değişik birçok genetik ve fizyolojik faktör vardır. Yarı korumalı (semikonservatif) DNA replikasyonu dengeleyici bir mekanizma ile kromozomları giderek uç kısımlarından kısalıktan kurtarır. Hücre kültüründeki hücelere ait telomerlerin pasaj başına kısalabildiği bildirilmektedir (Nasir 2001). Nasir (2001) kültüre edilmiş dermal fibroblastlarda TRF uzunluğunu ilk pasajda 20,5 kb, 16. pasajda ise 17,5 kb olarak tespit etmiştir.

Eşey hücreleri yavru hücelere, uzunluğu tam olan kromozomları transfer etmek zorundadırlar. Fakat telomer hipotezi somatik dokularda yaşlanmayla telomer uzunluğunun azaldığını ileri sürmektedir (Long ve ark. 2005). Sperm hücreleri uzun telomer dizilerine sahiptir ve telomer uzunluğu istikrarlı bir biçimde korunmaktadır. Buna karşın kan hücrelerinde telomer uzunluğunun yaşlanma ile azaldığı anlaşılmıştır. Bu sonuçlar, eşey hücrelerinin telomer bütünlüğünü sağladığını fakat somatik dokuların bunu yapamadıklarını göstermektedir (Long ve ark. 2005).

Hücre bölünmesi sırasında meydana gelen telomerik zincirlerin kaybı kromozomal anomalilere sebep olabilir. Örneğin mayadaki “est1” mutasyonu ile meydana gelen telomer uzunluğunun kısalması, kromozom kaybına ve ölümüne sebep olmaktadır (Lundblad ve Blackburn 1993; Muntoni ve Reddel 2005).

İlk defa 1973 yılında Olovnikov adlı bir araştırmacı, telomer kısalmasının ileride ölümüne yol açabileceğini, somatik hücrelerde çoğalmayı sınırlayıp hücre yaşlanmasına neden olabileceğini bildirmiştir. Daha sonra yapılan araştırmalar Olovnikov’un bulgularını destekler niteliktedir (Oeseburg ve ark. 2010).

Rodent telomerleri genelde insanlardan uzundur ve rodentlerle çalışılması teknik olarak zordur. Bu nedenle rodentlerde doku spesifik telomer uzunlukları iyi anlaşılamamış ve telomerlerin heterojen uzunlukta olduğu rapor edilmiştir (Kipling ve Cooke 1990).

Hosting ve ark. 2004 yılında yenidoğan rat karaciğer, beyin, kalp, böbrek ve akciğer dokularında ortalama TRF uzunluklarını birbirine yakın yaklaşık 60-65 kb olarak bulmuşlardır. Yenidoğan fare dokularının ortalama TRF uzunluğu benzerken, yetişkin fare dokuları arasında fark gözlenmiştir. Örneğin yetişkin fare testis telomeri, böbrek ve beyin telomerlerinden 2-3 kb, karaciğer telomeri ise 1 kb daha uzun bulunmuştur (Prowse ve

Greider 1995). Fare telomerleri insan telomerlerinin 5-10 katıdır ve yaşlı ile genç farelerin telomerleri arasında dikkate değer bir farklılık yoktur (Long ve ark 2005).

Ratlarda TRF uzunluğu 20-100 kb olarak bildirilmektedir (Golubovskoya ve ark. 1999, Jennings ve ark. 1999). Okuyucu ve ark. 2011 yılında rat dokularında (karaciğer, pankreas, ince bağırsak) ve lenfositlerde qRT-PCR kullanarak yaptıkları çalışmada ortalama telomer uzunluklarını sırasıyla 61,5kb, 93kb, 110kb, 190kb olarak saptamışlardır.

Yaşları 1-17 arasında değişen 30 kedide yapılan bir çalışmada, lökositlerde TRF uzunluklarının 4,7-26,3 kbp olduğu ve yaşla beraber telomer uzunluklarının anlamlı bir şekilde azaldığı ve genç kedilere oranla yaşlı kedilerin de daha kısa telomerlere sahipler olduğu bildirilmiştir (McKevitt 2003).

Brümmendorf ve ark. (2002) yenidoğan, 2 ve 10 yaşlarındaki kedilerin granülosit ve lenfositlerinde telomer uzunluklarını ölçerek kedilerdeki ortalama telomer uzunluğunun insanlara göre 5-10 kat daha uzun olduğu, fakat telomer kısalma oranının çok daha hızlı olduğu sonucuna varmışlardır. Aynı zamanda bu çalışma ile genç kedilerin lenfositlerindeki telomer uzunluğunun granülositlere göre anlamlı derecede uzun olduğu yaşla beraber hem granülosit hem de lenfositlerdeki telomer uzunluklarının azaldığı, yenidoğanlardaki telomer kısalmasının her iki kan hücrelerinde de çok hızlı olduğu gösterilmiştir.

Baerlocher ve ark. (2007) yenidoğan babunlarda, lenfosit ve granülositlerde telomer uzunluklarını 1 yaşına kadar takip ettikleri çalışmanın sonucunda yeni doğduklarında telomer uzunluklarının fazla olmasına rağmen, telomer kaybının daha fazla olduğunu bildirmişlerdir.

Cadile ve ark. (1998) köpeklerle ait normal (nonneoplastik; dalak, oral mukoza, akciğer, lenfosit, lenf nodülü)ve malignant dokularda (splenic hemangiosarkoma, bronşogenik karsinoma, oral skuamöz hücre karsinoma, lenfoma, fibrosarkoma)telomer uzunluklarını ölçmüşler ve neoplastik dokularda normal dokulara göre TRF uzunluğunun azaldığını, lenfomada ise arttığını rapor etmişlerdir.

McKevitt ve ark. (2002) farklı köpek ırklarında (Labrador Retriever, Miniature Schnouzer ve Beagle) periferik kan mononükleer hücrelerinde TRF uzunluklarının 9,7-22,3 kb arasında değiştiğini ve yaşa bağlı olarak TRF uzunluğunun azaldığını ve ırklar

arasında da uzunlukların farklı olduğunu saptamışlardır. 2001 yılında Yazawa ve ark. 27 meme tümörlü köpekte yaptıkları çalışmada, TRF uzunluğunu 14,5kb olarak belirlemişlerken, normal meme dokularında 18kb olarak bulmuşlardır.

Fick ve ark. (2012) 15 farklı köpek ırkında, toplam 175 köpekte, PBMC hücrelerinde telomer uzunluğuna bakmışlar ve köpeklerde telomerik DNA kaybının yılda 360 bp, buna karşın insanlarda 20-40 bp azalma olduğu ve insanlardan 10 kat daha hızlı gerçekleştiğini göstermişlerdir. Aynı zamanda erkek köpeklerde telomer kısalmasının dişi köpeklerle göre daha hızlı olduğu ve kısa telomer uzunluğuna sahip köpek ırklarında, kısa telomer uzunluğuna sahip insanlarla karşılaştırıldığında kardiyovasküler hastalıklarda ölümlerde artış olduğunu rapor etmişlerdir.

Iwama ve ark. (1997) yaşları 4-95 arasında değişen 124 sağlıklı bireyde PBMC hücrelerinde TRF uzunluklarını araştırdıkları çalışmaları sonucunda 4-39 yaş arasındaki bireylerde TRF uzunluğunda yılda yaklaşık 84 baz kısalma, 40 yaşından sonra ise 41 baz kadar kısalma olduğunu göstermişlerdir. Ayrıca sonuçlar değerlendirildiğinde 4-39 yaş arası bireylerde telomeraz aktivitesi düşükken, 40 yaş üzerinde olan bireylerde %65'inde çok daha düşük, 40 yaş üstü kalan bireylerde hiç telomeraz aktivitesine rastlamamışlardır.

Cawthon ve ark. (2003) 60 yaş üstü 143 bireyde telomer uzunluğu ve mortalite arasındaki ilişkiyi inceledikleri çalışmalarında kadın telomer uzunluklarını erkek telomer uzunluklarına göre daha fazla bulurken kısa telomere sahip olan bireylerin daha zayıf ömre sahip olduğu ve 3,18 kat kalp hastalıklarında, 8,54 kat enfeksiyöz hastalıklarda ölüm oranının fazla olduğunu bildirmişlerdir. Yaşlı insanlarda telomer uzunluğunun; telomeraz aktivitesi, hücre bölünme hızı, oksidatif stres miktarı, çevresel faktörler ve genetikten kaynaklanan koşullardan etkilenebileceği sonucuna varmışlardır.

Shervington ve ark. (2008) glioma kanser hücreleri ve normal hücrelerde yaptıkları çalışmada genç bireylerde (20-39 yaş) telomeraz mRNA ekspresyonunun %100, daha yaşlı bireylerde (40-70 yaş) ise %25 eksprese olduğunu bulmuşlar. Telomer uzunlukları incelendiğinde ise genç kanserli bireylerde 11,5-16,3 kbp ve daha yaşlı kanserli bireylerde 6,1-10,1 kbp, sağlıklı bireylerde de 7,4-9-5 kbp olduğunu bildirmişlerdir.

Xu ve ark. (2009) 34-75 yaş arası 586 kadında (2004'ten 2009 yılına kadar) yaptıkları çalışmada sigara içmeyen, günlük multivitamin kullanan bireylerde

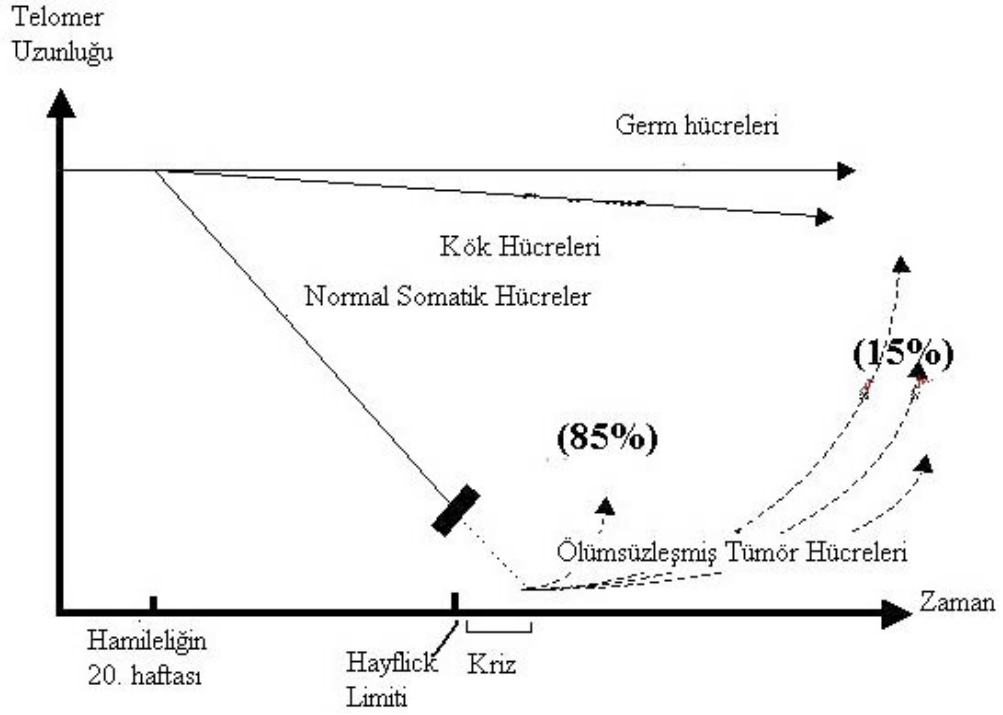
kullanmayanlara göre, lökosit DNA'sının relatif telomer uzunluğunu ortalama %5,1 daha uzun olarak ölçmüşlerdir. Özellikle uzun telomere sahip kişilerin vitamin B ve C açısından zengin olan gıdalarla besinlendiği sonucuna varılmış. Bu çalışma kadınlar arasında telomer uzunluğuyla multivitamin kullanımı arasındaki ilişkiyi gösteren ilk epidomiyolojik çalışmadır.

2013 yılında; fransa'da ortalama yaşları 56 olan, 193 bireyde (120 erkek, 73 kadın) beyaz kan hücrelerinde telomer uzunluklarını araştıran bir çalışmada kadınların (8,67 kbp) erkeklere (8,37 kbp) oranla daha uzun telomerlere sahip oldukları ve her iki cinstede telomer uzunluğuyla yaş arasında korelasyon bulunduğu bildirilmiştir. Bu çalışmadaki daha kısa telomer uzunluğuna sahip erkeklerde, arteriyal sertlik ve nabız basıncı (PP) artışı gibi bulgular erkeklerle kadınlar arasındaki kardiyovasküler yaşlanma farklılıklarını göstermektedir (Benatos ve ark. 2013).

Yamada ve ark. (2013), 50-60 yaş arası donörlerden alınan normal kan hücrelerinde telomer uzunluğunu 8,5-9 kbp arasında, 12 lökemi hastasında ise tedavi öncesi lökemik hücrelerde telomer uzunlukları 4,7 kb, tedavi sonrasında 8,2 kb olarak belirlemişlerdir.

1.1.8. Telomer ve Yaşlanma

Hücrelerdeki yaşlanma ve ölüm evreleri incelendiğinde ilk evre “Mortalite 1 Evresi” olarak adlandırılır. Bu evrede telomerlerin kısalması ile kromozomlar kritik boya ulaşırlar. Kritik nokta Hayflick and Moorhead tarafından “Hayflick Limiti (Proliferasyon Limiti)” olarak adlandırılmıştır. Bu olay hücre döngüsünü durdurur ve yaşlılık programını başlatır. M1 noktası replikatif hayat uzunluğunu temsil eder. Eğer bir hücre bu noktayı atlarsa, özellikle onkogenik transformasyonla telomerleri M2 noktasına kadar kısalırlar (Tükün ve ark. 2006)



Şekil 1.8. Çeşitli hücrelerdeki telomer uzunluğunun zamana bağlı grafiği (www.hindawi.com)

İkinci evre olan M2 Evresi ise “kriz noktası” olarak adlandırılır. M2 noktasında büyük hücre ölümü meydana gelir. Bu, zayıflayan telomer fonksiyonuna bağlı olarak kromozom ölümünden dolayı olabilir. Bu krizi aşmak için telomerase aktivitesine ihtiyaç vardır. Böylelikle telomer uzunluğu ve yapısı yeniden sağlanabilir ve devam ettirilebilir. M2 noktasında ortaya çıkan hücreler sınırsız şekilde bölünebilir. Normal somatik dokular ya da hücreler sadece senesens durumuna ulaşabilirler; yalnızca eşey hücreleri ya da dönüşüm yapabilen hücreler limitsiz hücre bölünme yeteneğine sahiptirler (Tükün ve ark. 2006).

1.2. PCR VE REAL TIME PCR

1.2.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonunun (PCR) Oluşum Mekanizması

PCR, çift sarmal bir DNA molekülünde bulunan hedef dizilere in vitro koşullarda iki oligonükleotid primerin bağlanması ve uzaması esasına dayanan tepkimelere verilen isimdir. Kalıp DNA molekülü yüksek sıcaklık derecelerinde denatüre edildikten sonra, oligonükleotid primerler tek iplikli DNA molekülleri üzerinde kendilerine tamamlayıcı olan bölgelerle bağlanırlar. Oligonükleotid primerlerin spesifik olarak hedef dizilerine bağlanması düşük sıcaklık derecelerinde gerçekleşir. DNA polimeraz enzimi, uygun tampon ve dört çeşit deoksiribonükleozid trifosfat (dNTP) varlığında primerin 3'hidroksil ucundan uzamasını sağlar. Böylece kalıp DNA ipliğine tamamlayıcı olan yeni DNA molekülünün sentezi gerçekleşmiş olur (Mcpherson, 2006).

PCR döngüsü denatürasyon, primerin bağlanması (annealing) ve uzama (elongasyon) olmak üzere üç basamaktan oluşur. Art arda tekrarlanan denatürasyon, primerlerin bağlanması ve primerlerin uzaması evreleriyle DNA parçaları eksponansiyel olarak artar. Bu artışın nedeni, bir döngü sonucu sentezlenen ürünün, ardışık döngüde diğer primerler için kalıp görevi yapmasıdır. Böylece her PCR döngüsü DNA molekülü üzerinde istenilen bölgenin iki katına çıkması ile sonuçlanır. Böylece başlangıçtaki az miktarda kalıp DNA'dan yeterli miktarda DNA elde edilmesi sağlanır. Örneğin 30 döngü boyunca amplifiye edilen tek bir DNA molekülünden, teorik olarak 230 adet (yaklaşık 1 milyar) yeni molekül elde edilebilir (<http://irc.igd.cornell.edu/MolecularMarkers/PCR>).

1.2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonunun Temel Bileşenleri

PCR'nin temel bileşenleri, kalıp olarak kullanılan DNA molekülü, DNA polimeraz enzimi, primerler, dNTP karışımı, tampon ve $MgCl_2$ 'dür.

a) Kalıp DNA: PCR'da genomik DNA'lar, plazmid ve faj DNA'ları, çeşitli genler ve hatta herhangi bir DNA parçası kalıp olarak kullanılabilir. PCR'da kalıp olarak tek ya da çift iplikli DNA'nın yanı sıra RNA' da kullanılabilir. Kalıp olarak RNA kullanılacaksa total RNA' dan önce klasik yolla cDNA elde edilir. Genomik DNA ve cDNA örneğinin elde edildiği RNA saf olarak izole edilmeli, proteinden ve alkolden çok iyi bir şekilde arındırılmış olmalıdır (McPherson, 2006).

b) Polimerazlar: DNA polimeraz enzimleri, orjinal kalıp DNA zincirindeki baz bilgisini kullanarak dört çeşit deoksiribonükleozid trifosfattan tamamlayıcısı olan DNA zincirinin sentezini kataliz eder. Bu enzimler, sentezi başlatmak için kalıp molekülündeki tamamlayıcı diziye bağlanan kısa DNA parçalarına (primerler) ihtiyaç duyarlar. Sentezin yönü 5' uçtan 3' uca doğru olup, primerin serbest 3' hidroksil ucuna ortamdaki dNTP'lerin nükleofilik etki yapmalarıyla fosfodiester bağlarının katalizive yeni DNA ipliğinin polimerizasyonu sağlanır (McPherson, 2006).

Termostabil DNA polimerazlardan PCR'da en yaygın olarak kullanılanı *Thermus aquaticus*'dan elde edilen Taq DNA polimeraz'dır. Taq DNA polimerazın polimerizasyon oranı (nükleotid/saniye) enzim için en uygun sıcaklık olan 70-80 °C'de (optimum 72°C) 35-100 dür. Enzimin reaksiyondaki konsantrasyonunda önemlidir. 100 µL'lik bir reaksiyonda polimeraz enzim konsantrasyonu 1-5 ünite arasında olmalıdır. Bu miktarlar hedef ve kalıba göre değişim gösterir (McPherson, 2006).

c) Primerler: Genellikle kimyasal olarak sentezlenen, 15-20 bazlık DNA oligonükleotid dizileridir. Tamamlayıcı DNA ipliklerinden karşıt yönlerde DNA sentezini başlatabilmek için iki adet primer kullanılır. Primer tasarımı yapılırken hedef DNA dizisinin iki ucundaki dizisi bilinen kısımlar dikkate alınır. Bu bölgelere tamamlayıcı olan primerler tasarlanır (McPherson, 2006).

d) dNTP karışımı: Deoksiribonükleozid trifosfatlar (dATP, dGTP, dTTP, dCTP) yüksek saflıkta ya tek tek ya da dörtlü karışım halinde ticari olarak sağlanır. Taq DNA polimeraz düşük dNTP konsantrasyonlarında (10-100 µM) kalıba uygun doğru bazları seçmede daha başarılı olmakla birlikte, normal koşullarda PCR 100 µM dNTP konsantrasyonu ile gerçekleştirilir. Ayrıca dört dNTP nin eşit konsantrasyonda kullanılması önemlidir (McPherson, 2006).

e) Tamponlar ve MgCl₂: PCR'de kullanılan çeşitli tamponlar arasında en çok kullanılanı Taq/Amplitaq enzimlerine özgü olan 10-50 mM derişiminde 20 °C'de pH=8,3-8,8 arasında olan tris-HCl tamponudur. Ancak hedef dizi ve amaca uygun olarak farklı tamponlarda kullanılabilir. Tampon içeriğinde bulunan KCl'nin 50 mM'a kadar olan konsantrasyonları primer yapışmasını arttırır. Ancak 50 mM üzerindeki KCl konsantrasyonlarının Taq polimeraz enzimini engellediği unutulmamalıdır. MgCl₂'nin

reaksiyon karışımındaki sonkonsantrasyonu değişebilmekle birlikte genellikle 0,5-5,0mM'lık değerler arasında çalışılır (McPherson, 2006).

1.2.3. PCR'nin İşleyişi

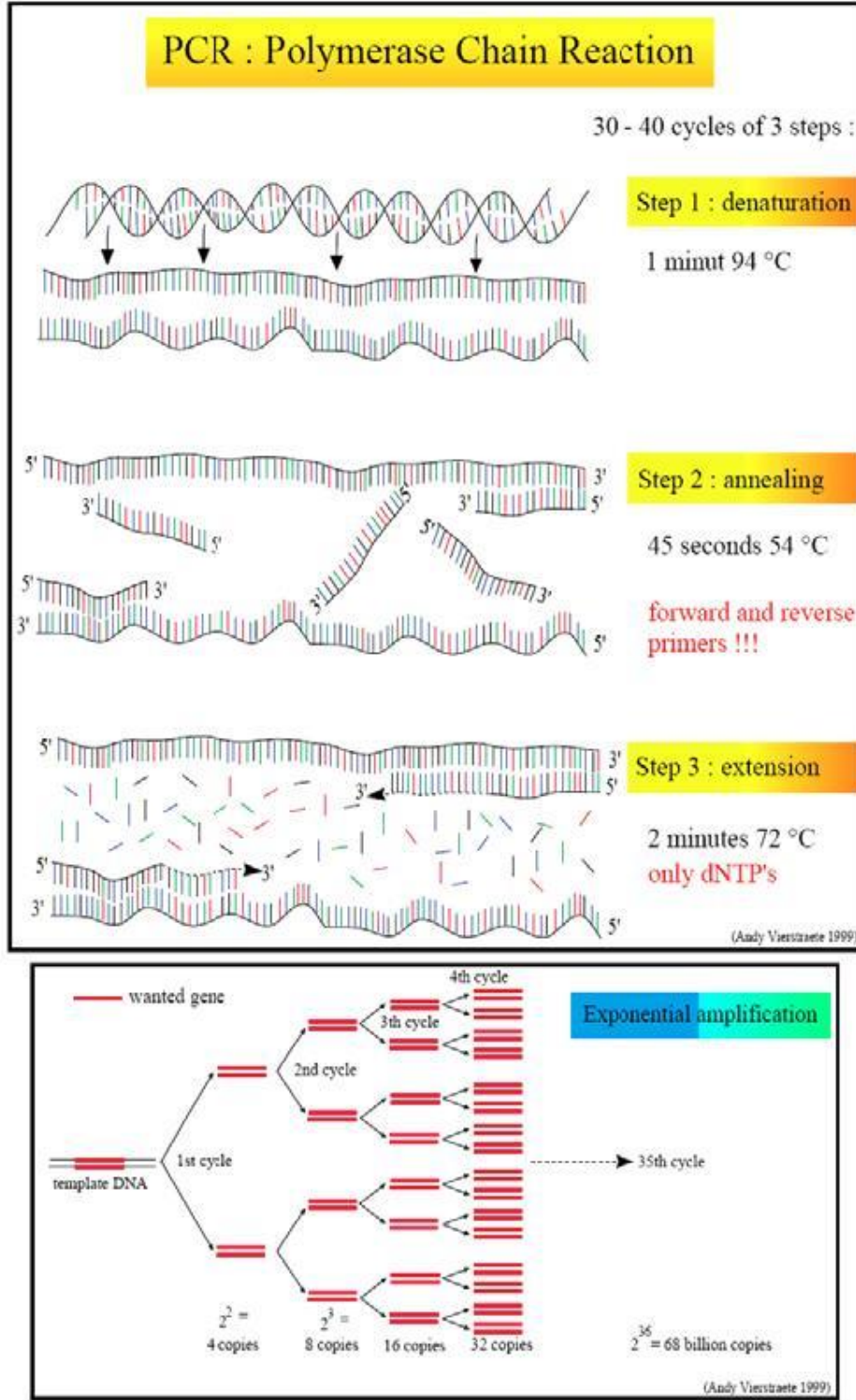
Günümüzde PCR'ın verimi ve kullanımında önemli gelişmelerin yaşanmasının nedeni, termostabil DNA polimerazların ve farklı sıcaklık derecelerini istenilen süreler için otomatik olarak ayarlayabilen PCR cihazlarının (thermal cycler) kullanıma sunulmasıdır. Verimli bir PCR için; denatürasyon, primerlerin bağlanması, primerlerin uzaması, döngü sayısı ve PCR makinesinin sıcaklık iniş ve çıkış süreleri önemlidir (McPherson, 2006).

a) Denatürasyon: Başlangıç denatürasyonu için genomik DNA gibi kompleks kalıpların denatüre olmasını sağlamak üzere yüksek sıcaklıklar (95-100 °C) kullanılır. Ancak PCR sırasında genellikle en etkin denaturasyon sıcaklığının 92-95 °C olduğu saptanmıştır. Denatürasyonun tam olarak gerçekleşmesi önemlidir. Tamamlanmamış denatürasyon DNA zincirlerinde kopmalara neden olarak ürün verimini azaltır. Ayrıca Taq DNA polimerazın yarı ömründe dikkate alınmalıdır. Taq DNA polimeraz enzimi 92,5 °C 'de 2 saatten fazla, 95°C 'de 40 dakika ve 97°C'de ise 5 dakika yarı ömre sahiptir (McPherson, 2006).

b) Primer Yapışması (Annealing): Primer yapışması için gerekli zamanın uzunluğu ve sıcaklığı primerlerin uzunluğuna, baz içeriğine ve konsantrasyonuna bağlı olarak değişir. Denatürasyonu takiben primerin bağlanması aşamasındaki T_m/bağlanma sıcaklığı oranının saptanması, PCR reaksiyonunun gerçekleşebilmesi açısından önemlidir. 55-72 °C arası yapışma sıcaklıklarında elde edilebilir (McPherson, 2006).

c) Primer Uzaması (Extensiyon): Uzama zamanı hedef dizinin uzunluğuna, konsantrasyonuna ve sıcaklığa bağlıdır. Primerlerin uzaması aşamasında genellikle Taq/Amplitaq DNA polimerazların polimerizasyon aktivitesi için en uygun sıcaklık derecesi olan 72 °C kullanılır. Uzama aşaması için çoğu zaman 2 dakika yeterli olmaktadır, ancak uzun ampikonlar çoğaltılıyorsa süre arttırılır. PCR ürünü olan tüm moleküllerde reaksiyonun tamamlanmasını garanti altına almak için son döngünün uzama süresi çoğunlukla uzun (10-15 dakika) tutulur. En uygun döngü sayısı hedef DNA başlangıç

konsantrasyonuna bağı olarak değışkenlik göstermekle beraber, ideal döngü sayısı genellikle 25-35 arasındadır (McPherson, 2006).



Şekil1.9. PCR işleyişi; (<http://fmel.ifas.ufl.edu/buzz/csPCR.shtml>)

1.2.4. Real Time PCR

1988 yılında “*thermus aquaticus*” bakterisinden saflaştırılan, ısıya dayanıklı polimerazın (Taq Polimeraz) kullanımı ile birlikte polimeraz zincir reaksiyonları için otomatize termal siklüs cihazları geliştirilmesi ve floresan ışımaya tekniklerinin de kullanıma girmesiyle kinetik revers transkriptaz-PCR (RT-PCR)’de yapılan araştırmaların sayısı artmıştır. Bu sayede tümör hücrelerinin ilaç dirençlerinden kemoterapi taramalarına ve tümör evrelerinin moleküler saptanmasına kadar uzanan birçok farklı alanda gen anlatımını sayısal bir değer olarak ölçmek mümkün olmaktadır. Bu gelişim sayesinde gen kopya ürünlerinin düzeylerini sayısal değerlere dönüştürerek ölçmek, devam eden PCR reaksiyonunu ekranda izleyerek ‘Real Time’ (eş zamanlı) olarak reaksiyonun gidişine müdahale etmek ve PCR döngülerinin sayısı ile oynayabilmek de mümkündür (Zhang 2013).

RT-PCR, PCR amplifikasyonunu görünür hale getirir ve moniterize eder. PCR sonuçlarına ulaşmak için harcanan zamanı azaltır. Sistemin özellikleri tek bir reaksiyondan elde edilen bilginin miktarını en üst seviyeye çıkarabilmek üzere geliştirilmiştir. Sistem gen ekspresyonunun miktarını belirleme ve tek nükleotid polimorfizminin saptanması olanaklarını sağlayarak polimeraz zincir reaksiyonunun kısa sürede tanımlamak için yeni bir hızlı sıcaklık döngüsü kullanılır (Pfaffl 2001).

RT-PCR üstün kopyalama yeteneği ve hassasiyet performansı sağlar ve PCR uygulamalarında optimum performansa ulaşabilmek için geliştirilmiştir. Floresan işaretli probalar veya interkalatör boyalar kullanılır. Oluşan DNA ile doğru orantılı floresan ışımaya meydana gelir. Hızlı (1 saat) sonuç verir. Günlük numune çalışma sayısı yüksektir (~200 numune/gün). Düşük kontaminasyon riski vardır. Sensitivite yüksektir (< 5 kopya). Tekrarlanabilirliği oldukça iyidir (CV<%2.0). PCR sonuçları kantite edilebilir. PCR sonrası elektroforez gibi ilave tekniklere ihtiyaç yoktur. Multiplex PCR kullanımına uygundur. Bu nedenlerle, kantitatif RT-PCR analizi ile minimal rezidüel hastalıklarla bağlantılı özgün gen düzeylerinin saptanması kliniklere büyük katkı sağlayacak potansiyeldedir (Günel ve ark. 2009; Zhang 2013).

1.2.5. Real-time PCR’da Kullanılan Metodlar

Real-time PCR’da kullanılan metodlar spesifik ve spesifik olmayan metodlar olarak 2 ana başlık altında incelenebilir. Spesifik metodlar her PCR ölçümü için bir veya daha fazla floresan probun sentez ve dizaynını gerektirir ve FRET teknolojisinin kullanıldığı tekniklerdir. TaqMan veya hidroliz prob, moleküler beacon prob, scorpion prob ve hibridizasyon probolar spesifik metodlara örnek olarak gösterilebilir (Günel ve ark. 2009).

Spesifik olmayan metotta, SYBR Green ve etidyum bromid gibi çift zincirli DNA’ya bağlanarak floresan emisyonunda artışa neden olan boyalar kullanılmaktadır. En sık kullanılan boya SYBR Green boyasıdır. SYBR Green çift zincirli DNA’nın minor oluğuna bağlanır (Simpson ve ark. 2000; www.mhhe.com/enger11). SYBR Green serbest formunda tespit edilemeyen miktarda düşük floresan verir. Çift zincirli DNA’ya bağlandığında ise yüksek miktarda floresan emisyonu verir. Herhangi bir primer çiftiyle çalışılabilir olması ve problardaki gibi sentez ve dizayna ihtiyaç duymaması en önemli avantajıdır ve bu da maliyeti oldukça düşürmektedir. Ancak nonspesifik PCR ürünlerinin amplifiye olma riski ve SYBR Green boyasının da bunlara bağlanabilmesi nedeniyle spesifitesi düşüktür. Bu da en önemli dezavantajını oluşturmaktadır (Simpson ve ark. 2000).

Primer prob dizaynı; iyi düzenlenmiş primerler ve probolar doğru bölgelere bağlanarak amplifikasyon ya da genomik DNA kontaminasyonundan kaynaklanan yanlış pozitif sonuçları önleyebilir. Bu nedenle primer ve proboların düzenlenmesi için hazırlanmış çeşitli bilgisayar programları kullanılmaktadır. Primer ve prob dizaynında dikkat edilecek başlıca noktalar şunlardır.

- 1.Tm dereceleri, primer için 58-60°C, prob için 68-70°C olmalı
- 2.G-C içerikleri % 30-80 aralığında olmalı
- 3.Primerler 15-30 baz uzunluğunda olmalı
4. Primerin 3' ucundaki son 5 nükleotitteki total G-C içeriği 2'yi aşmamalı.
- 5.Maksimum amplikon büyüklüğü 400 bp'i aşmamalı (ideali 50-150 bp).

6. Problar ardışık benzer nükleotit içermemeli (özellikle 4 veya daha fazla G),
7. Problardaki % 30-80 aralığındaki G-C içeriğinde C, G'den fazla olmalı,
8. Probların 5' ucunda G olmamalı (Wong ve ark. 2005).

1.2.6. Komperatif Cq (Threshold Siklus, Ct) Metodu

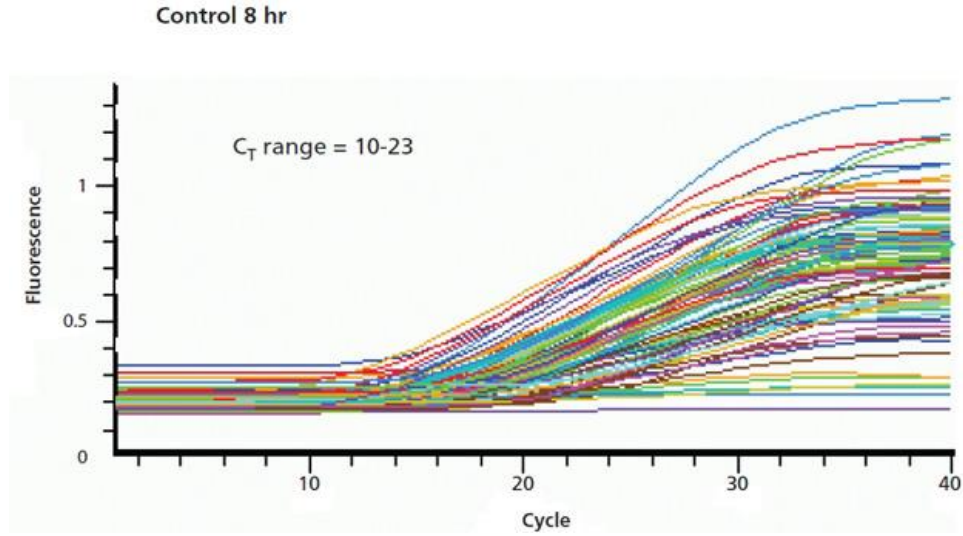
$\Delta\Delta Cq$ metodu olarak da isimlendirilen bu metod da, standart eğri metoduna benzer ama konsantrasyonların yerine Cq değerleri kullanılır. Hedef genin Cq değeri bir referans genin Cq değerine oranlarak normalize edilir. Daha sonra standart eğri metodunda olduğu gibi normalize Cq değerleri seçilen bir kalibratöre oranlanır. Sonuçlar kalibratörün n katı şeklinde verilir. Aşağıda gösterilen hesaplamalar kullanılarak Komperatif Cq metodu, $2^{-\Delta\Delta Cq}$ formülü ile ifade edilir (Cawthon 2002; Zhang 2013).

$$\Delta\Delta Cq = \Delta Cq(\text{hedef}) - \Delta Cq(\text{kalibratör})$$

$$\Delta Cq(\text{hedef}) = Cq(\text{hedef}) - Cq(\text{referans})$$

$$\Delta Cq(\text{kalibratör}) = Cq(\text{kalibratör}) - Cq(\text{referans})$$

Karşılaştırmalı Cq metodunun uygulanabilirliği validasyon (relatif verimlilik) çalışması ile değerlendirilir. Bunun için iki şart gereklidir. Birincisi, hedef gen amplikasyonunun verimliliği ile referansın gen amplikasyon verimliliğinin yaklaşık eşit ve % 100'e yakın olması gerekir. İkincisi de farklı başlangıç konsantrasyonlarda ΔCq değerinin değişmemesi yani logaritmik konsantrasyona karşı ΔCq grafiğinde slope değerinin sıfıra yakın ($< 0,1$) olmasıdır (Wong ve ark. 2005).



Şekil 1.10. Kantitatif RT-PCR Amplifikasyonu (<http://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/protocols/biology/gene-expression-analysis-of-arabidopsis-thaliana.html>)

1.2.7. Revers Transkriptaz PCR

Çalışmadaki örneklerde mRNA düzeyleri araştırılacaksa; o zaman ters transkriptaz PCR kullanılabilir. Önce ters transkriptaz veya bir primer yardımı ile RNA'dan cDNA üretilir. Meydana gelen RNA/cDNA heterodubleksi polimeraz zincirinin RNAaz aktivitesi ile parçalanır. cDNA tek iplikçik haline döner. Bağlanma sıcaklığında, cDNA'daki hedef diziye bağlanan primer, Taq DNA Polimeraz için hedef haline gelir ve uzamayı başlatır. Böylece 30 siklus sonunda milyonlarca mRNA üretilir (Mcperson, 2006).

1.2.8. Gen ekspresyonu

DNA gibi uzun ve dallanmış bir makromolekül olan RNA, nükleotidlerin 3'-5' fosfodiester bağlarıyla birleşmesinden oluşmuştur. RNA'daki nükleotidlerin sayısı 75'ten birkaç bine kadar değişmektedir. RNA'nın kovalent yapısı, DNA'dan iki önemli farklılık göstermektedir. Bunlar, pentoz biriminin deoksiriboz yerine riboz olması ve dört bazından birisinin timin gibi adeninle komplementer olan urasil olmasıdır (www.mhhe.com/enger11). RNA molekülleri bazı virüslerin dışında bütün canlılarda tek zincir yapısında olup DNA'larda olduğu gibi, komplementer bazları arasında belirli bir oran yoktur. Bununla birlikte RNA molekülleri saç tokası benzeri dönüşlerle ortaya çıkan çift sarmal yapıli bölgeler içerir ki bu yapıyı da bazlar arasındaki spesifik eşleşme sağlar (www.mhhe.com/enger11).

Hücrelerde birbirinden farklı üç çeşit RNA bulunmaktadır. Bunlar; messenger veya haberci RNA (mRNA)'dır ve protein sentezinde kalıp rolü oynar. İkincisi transfer RNA (tRNA)'dır ve mRNA kalıbı tarafından belirlenen sıraya uygun olarak peptid bağı oluşturmak üzere amino asitleri aktifleşmiş halde ribozomlara taşımakla görevlidir. 20 amino asidin her birisi için en az bir tane tRNA vardır. Ortalama 75 baz içerdiklerinden RNA'lar içinde en küçük olanlardır. Üçüncüsü ribozomal RNA (rRNA)'dır. Ribozomlar, RNA ve proteinlerden ibaret olup, protein sentezinin gerçekleştiği yerlerdir (www.mhhe.com/enger11).

Gen ekspresyonu, DNA'nın mRNA'ya çevrilmesi ve özel mRNA'ların kalıp olarak kullanması ile özel proteinlerin sentezlenmesi süreçlerini içerir (Uzun ve Gökçe 2005). Ökaryotlarda, gen transkripsiyonu, çoklu düzenleyici bölgeleri olan ve aynı anda çoklu transkripsiyon faktörlerinin bağlanmasına olanak veren hızlandırıcı DNA dizileriyle düzenlenir. DNA'ya bağlı olan proteinler birbirleriyle protein-protein etkileşimi yaparak gene has transkripsiyonu düzenleyen kompleksleri oluştururlar. Bu şekilde DNA bölgelerinin ve çok sayıda faktörün içinde olduğu gruplaşmış spesifik bileşimler, hangi genin hangi hücre tipinde eksprese olacağını belirler. Bu gene has transkripsiyon kompleksleri, bir genin belirli koşullarda aktif veya baskılanmış olması gerektiğine karar verir (Uzun ve Gökçe 2005).

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Gereç

Çalışma Veteriner Fakültesi Kliniklerine aşı amacıyla getirilen ve özel köpek çiftliklerinde bakılan parazit muayeneleri yapılmış klinik olarak sağlıklı, farklı ırklarda grup 1 (2,5-18 aylık) 23 adet ve grup 2 (3-6 yaş) arası 15 adet olmak üzere 38 köpek kullanılarak yapıldı. Çalışmaya başlamadan önce Adnan Menderes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik kurulundan 23/07/2013 tarih ve 2013/054 sayılı etik kurul kararı ile onay alınmıştır.

Kan örnekleri çalışmaya dahil edilen köpeklerin ön bacaklarında bulunan *Vena Cephalica Antebrachii*'den EDTA'lı tüplere alındı. Analizler Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim dalı laboratuvarlarında gerçekleştirildi.

2.1.1. Kullanılan Cihazlar

Analizler sırasında Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim dalı laboratuvarlarında bulunan PCR kabini, Mikrodalga fırın (Altes), Elektroforez tankları (Biorad) ve güç kaynağı (Biorad), Lightcycler Nano Real Time PCR (Roche) cihazı, analitik terazi (Denver Instrument), distile su cihazı (Nüve), spektrofotometre (Thermo scientific multiscan go microdrop), etüv (Memmert), pH metre (Hanna Instrument), soğutmalı santrifüj (Nüve), mini santrifüj (VWR mini star silverline), manyetik karıştırıcı (Velp Scientifica), su banyosu (Nüve), -80°C derin dondurucu (Nuaire), 4°C buzdolabı (Indesit), görüntüleme sistemi (UVP EC3 Imaging System Chemi HR 410), otomatik pipetler ve çeşitli cam malzemeler kullanıldı.

2.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Analizler sırasında kimyasal madde olarak; Glasiyel asetik asit (Merck, K41429056), agaroz (Sigma, A5093), tris base (Sigma, T1503), etilendiamintetraasetik asit (EDTA, Merck, K43782018), fosfat tamponu (Invitrogen, 003002), etanol absolute (Sigma, 32221), hücre lizis tamponu (Red Blood Cell Lysis buffer, Roche, Version8, 11814389 001), RNA izolasyon kiti (High Pure RNA Isolation Kit, Roche, Version 12, 11828 665001), cDNA sentez kiti (Transcriptor High Fidelity cDNA Synthese kit, Roche,

Version 8, 05091284 001), PCR kiti (Fast Start Essential DNA Green Master kit, Roche, version 2, 06402712 001), DNA Ladder 100bp (Invitrogen, 15628-019), 6x Loading Dye solution (Intron Biotechnology, 21161), SYBR Safe DNA Gel Stain (Invitrogen, S33102), RNase-ZAP (Ambion, AM9782) kullanıldı.

2.1.3. Primerler

Gen materyali olarak RNA, primer olarak ise dogTERT geni ve dog gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz (dogGAPDH) spesifik primerler kullanıldı. İnternet ortamındaki gen bankasından (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) köpeklere ait dogTERT geni ve dogGAPDH genine ait sırasıyla AF38351 ve NL_006609 kod numaralı mRNA verileri ışığında baz dizilimleri değerlendirmeye alındı ve oluşturulan primerlerin ilgili bölgeye spesifiklikleri (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) kullanılarak kontrol edildi.

Çizelge 2.1. Primer dizilimi tablo

dogTert-Reverse Primer	5' CTCCCATGATGTAGTCCATATTCACA
dogTert-Forward Primer:	3'AGAGCATAGGAATCAGACAACTCTTC
dogGAPDH-Reverse Primer:	5'-TCCACAACATACTCAGCACCAGC 3'
dogGAPDH-Forward Primer:	5' -AGTCAAGGCTGAGAACGGGAAA3'

2.2. Yöntem

2.2.1. Total Kan RNA İzolasyonu

Nükleotidlerin heterosiklik halkaları 260 nm dalga boyunda maksimum absorpsiyon özelliği gösterir. Bu nedenle 260 nm'de ölçülen absorpsiyon değerleri oldukça saf olarak izole edilen nükleik asitlerin ng/μL veya μg/mL düzeyinde miktarlarının belirlenmesinde kullanılır. RNA'nın konsantrasyonunun saptanmasında kullanılan spektrofotometrik yöntemler DNA'nın spektral analizi ile tamamen aynıdır. Sadece tek zincirli RNA'nın miktarının belirlenmesinde kullanılan formül farklıdır.

$$\text{Total RNA (ng/}\mu\text{L)} = 260 \text{ nm'deki absorbans} \times 40 \times \text{Dilüsyon Faktörü}$$

RNA molekülleri için 1 optik dansitenin 40 μg/mL'ye karşılık geldiği bilinmektedir. Yukardaki formülde 40 sayısı da buradan gelmektedir. Bununla beraber 260

ve 280 nm dalga boylarında okunan değerler arasındaki oran nükleik asitlerin saflığı hakkında bilgi vermektedir. Proteinler bilindiği gibi 280 nm’de absorpsiyon özelliği gösterirler. Bu nedenle 280 nm’de ölçülen bir değerdeki artış A260/A280 oranında düşmeye neden olur. İzole edilen total RNA örneklerinin saflığından bahsetmek için bu oran 1.8-2.00 arasında olmalıdır. Ölçümlerde kesinlikle UV geçirgen küvet kullanılmalıdır.

Bu amaçla üretilmiş olan UV geçirgen 96’lık plak kullanılarak 5 µl total RNA 95 µl elüsyon tamponu kullanılarak 20 kat seyreltildi. UV microdrop spektrofotometrede 260 ve 280 nm dalga boylarında absorbansları ölçüldü. Örneklerin RNA konsantrasyonu yukarıda bahsedilen formüle göre hesaplandı. Ayrıca A260/A280 oranının 1,8-2,00 olup olmadığı kontrol edildi.

EDTA’lı tüplere alınan kan örnekleri Red Blood Cell Lysis Buffer kullanılarak santrifüj edildi. Santrifüj işleminden sonra, tam kan RNA izolasyon ticari kiti (High Pure RNA Isolation Kit) kullanılarak RNA izolasyonları yapıldı ve elde edilen RNA’lar -80°C’de saklandı.

Total RNA izolasyonu PCR için özel yapılmış kabinde yapıldı. İzolasyon işlemine başlamadan önce pudrasız eldiven giyildi. Tek kullanımlık filtreli RNase free pipet uçları kullanıldı. Deneye başlamadan önce RNA’yı kesen enzimleri inhibe etmek için RNA izolasyon aşamasında kullanılacak ependorf tüpler otoklavlandı yada ticari olarak satılan DNase/RNase free olan tüpler kullanıldı.

Analiz prosedürü:

Ependorf tüplere 500 µl kan örneklerinden ve 1ml Red Blood Cell Lysis Buffer eklendi ve iyice pipetaj yapıldı. 10 dakika karıştırıldı (vorteks yapılmamalı), süpernatant kısmı atıldı. Aynı işlemler bir set daha gerçekleştirildi. Pellete 200 µl PBS eklenerek, pelletin tamponda çözünmesi sağlandı. Daha sonra 400 µl Lysis-Binding Buffer eklendi ve 15 saniye vorteks yapıldı ve örnekler filtreli tüplere aktararak 9230 rpm’de 15s santrifüj edildi. Daha sonra 90 µl DNase inkübasyon buffer + 10 µl DNase karışımı eklendikten sonra 15dk. inkübe edildi. Üzerine 500 µl 1. yıkama solüsyonu eklendi ve 9230 rpm’de 15s santrifüjlendi. Santrifüj sonrası tüpteki sıvı atıldı ve filtreye 500 µl 2. yıkama solüsyonu eklenerek 9230 rpm’de 15s santrifüjlendi. Tüpteki sıvıyı attık ve filtreli tüpün üzerine tekrar 200 µl 2. yıkama solüsyonu eklendi ve 11770 rpm’de 2 dk santrifüj edildi. Filtreler

temiz ependorf tüplere alındı ve 50 µl elüsyon buffer eklenerek 9230 rpm’de 1 dk santrifüjlendi. Elüsyon buffer da çözünmüş RNA örnekleri -80°C’de saklandı.

2.2.2. cDNA Kütüphanesinin Oluşturulması

Genler etkilerini mRNA üretimi ile ortaya çıkarırlar. RNAz enzimlerinin aktivitesi ile normal koşullarda çok çabuk parçalandıklarından, mRNA’lar ile laboratuvar şartlarında çalışılması oldukça güçtür. Bu nedenle, mRNA örnekleri mRNA’nın DNA karşılığı olan cDNA’ya çevrilirler ve bu halde kullanılır. Elde edilen RNA’ları kullanarak cDNA sentez kiti (Transcriptor High Fidelity cDNA Synthese kit, Roche) prosedürüne uygun olarak Light Cycler Nano Real Time PCR cihazında cDNA’lar elde edildi.

Analiz prosedürü:

9,4 µl RNA ve 2 µl random heksamer 65 °C’de 10 dakika qRT-PCR cihazında inkübe edildi. Reaksiyon tamponu (8mM) 4 µl, Protector RNase Inhibitor (20U) 0,5 µl, dNTP (1mM) 2 µl, DTT (5mM) 1 µl, Revers Transkriptaz enzim (10U) 1.1 µl kullanılarak bir karışım hazırlandı. 10 dakika RT’de inkübe edildi. Daha sonra qRT-PCR; 60 dakika 55 °C’de, 5 dakika 85 °C olacak şekilde programlandı. Elde edilen cDNA’lar 4°C’de saklandı.

2.2.3. Real Time PCR ile Telomeraz mRNA Ekspresyonunun Kantitatif Olarak Belirlenmesi

H₂O, PCR Primer (10x), master mix (2x), cDNA karışımı (Çizelge 2.2) hazırlandı. PCR ürünleri çizelge 2.3.teki prosedüre uygun olarak qRT-PCR kullanılarak elde edildi. DogTERT geninin ekspresyon analizinde kantifikasyon yapabilmek için referans gen olarak dogGAPDH geni seçildi.

Çizelge 2.2.PCR karışımı (Fast Start Essential DNA Green Master)

	Konsantrasyon	Hacim
H ₂ O	-	3 µl
Pcr Primer (10x)	10x	2 µl
Master Mix (2x)	2x	10 µl
cDNA	-	5 µl

Çizelge 2.3 Real Time PCR döngü koşulları

Sıcaklık (°C)	Ramp Oranı(°C/s)	Süre(s)
Hold		
95	4	600
3-Adım Amplifikasyon		
95	5	20
60	4	20
72	4	10
Erime		
65	4	60
95	0,1	1

2.2.4. PCR Ürününün Agaroz Jel Elektrofrezinde Kontrolü

PCR ürününün kontrolünde % 2'lik agaroz jeli hazırlandı. Bu amaçla 1,5 g agaroz ve 75 ml 1x Tris-Asetik asit-EDTA (TAE) tamponu mikrodalga fırında kaynatıldıktan sonra biraz soğutuldu ve görüntüleme amaçlı olarak 1 µl SYBR safe DNA gel stain (10 mg/ml) eklendi. Daha sonra elektroforez küveti içerisine döküldü. Agaroz donduktan sonra tarak çıkarılarak örnekler kuyucuklara eklendi. DNA işaretleyiciden 5 µL ilk kuyucuğa yüklendi. Her bir örneğe ait PCR ürününe 5 µl yükleme boya solüsyonu eklendi ve PCR ürünleri her bir kuyucuğa 20'şer µl olacak şekilde yüklendi. 100V'da ~90 dakika yürütüldü. UV görüntüleme sistemi kullanarak jel elektroforez görüntülendi.

10x TAE (tris-asetat-EDTA) Tampon Hazırlanışı:

24,2 g Tris base	}	1 litre saf suda çözülür.
5,7 ml asetik asit		
1,85 g EDTA		

3. BULGULAR

3.1. Grupların $\Delta\Delta Cq$ Değerleri

Çalışmaya dahil edilen köpeklerin yaş, cinsiyet, ırk, Cq ve $\Delta\Delta Cq$ değerleri tablo 3.1.de gösterildi.

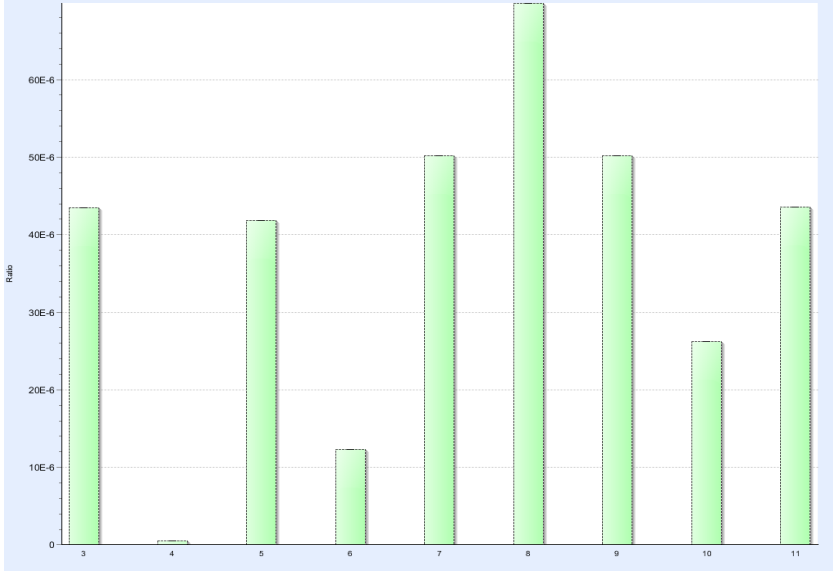
Grupların $\Delta\Delta Cq$ sonuçları kendi içlerinde değerlendirildiğinde dogTERT mRNA ekspresyonunda 1-2 kat arasında değişen kat artışı olduğu belirlendi.

	Yaş	Cinsiyet	İrk	Cq	$\Delta\Delta Cq$
1	1 yaş	Dişi	Golden Retriever	39,46	1,22812E-06
2	1,5 yaş	Dişi	Golden Retriever	34,19	5,75821E-05
3	8 ay	Erkek	Belçika Malinois	34,56	4,33661E-05
4	8 ay	Erkek	Belçika Malinois	41,10	3,89317E-07
5	9 ay	Dişi	Alman Çoban Köpeği	34,65	4,1784E-05
6	8,5 ay	Erkek	Labrador Retriever(Çikolata)	35,56	1,22039E-05
7	9 ay	Erkek	Akbaş	33,27	5,00787E-05
8	8 ay	Dişi	Belçika Malinois	34,76	6,97868E-05
9	8,5 ay	Dişi	Golden Retriever	33,83	5,0073E-05
10	10 ay	Dişi	Alman Çoban Köpeği	34,74	2,60923E-05
11	9,5 ay	Erkek	Labrador Retriever(Siyah)	35,56	4,35073E-05
12	8,5 ay	Dişi	Labrador Retriever(Çikolata)	30,59	0,000724865
13	4,5 ay	Dişi	Akbaş Çoban Köpeği	34,64	3,31645E-05
14	5,5 ay	Dişi	Amerikan Mastif	31,96	0,000278507
15	5,5 ay	Erkek	Amerikan Mastif	33,15	0,000100536
16	5,5 ay	Erkek	Amerikan Mastif	33,21	5,69478E-05
17	5,5 ay	Dişi	Amerikan Mastif	30,65	0,000354974
18	4 ay	Erkek	Cocker Spaniel	31,08	0,000478233
19	2,5 ay	Erkek	Kangal	30,46	0,00031771
20	3 ay	Dişi	Kangal	30,97	0,000402144
21	4 ay	Dişi	Kangal	32,23	0,000229376
22	3 ay	Dişi	Terrier	32,87	0,000146177
23	3,5 ay	Erkek	Beagle	31,02	0,000502009

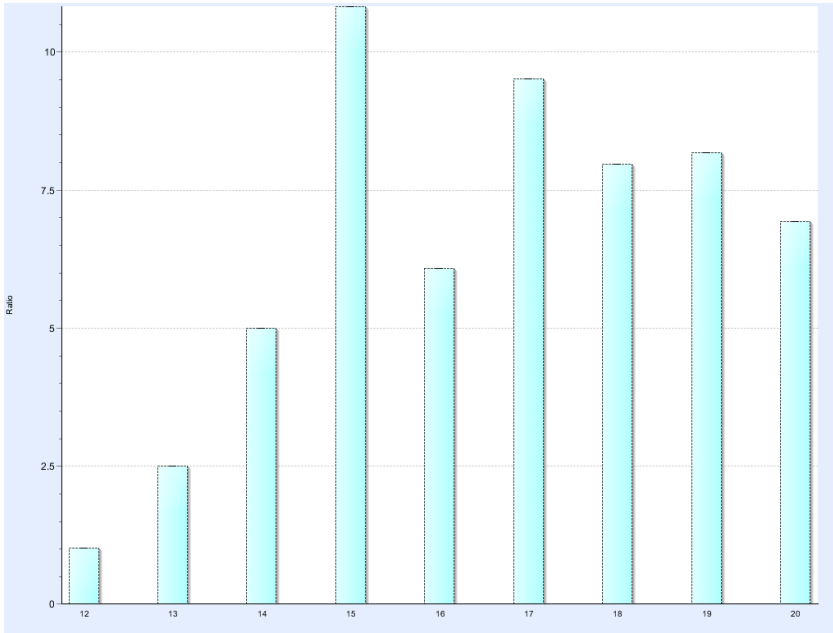
24	6 yaş	Erkek	Alman oban Köpeği	35,37	1,09803E-05
25	4 yaş	Dişi	Alman oban Köpeği	35,44	2,72415E-05
26	4 yaş	Dişi	Alman oban Köpeği	34,57	5,46675E-05
27	4 yaş	Erkek	Golden Retriever	32,72	1,19E-04
28	5 yaş	Dişi	Alman oban Köpeği	33,54	6,66168E-05
29	4 yaş	Erkek	Labrador Retriever(ikolata)	33,61	1,04E-04
30	5 yaş	Erkek	Labrador Retriever (ikolata)	32,56	8,72909E-05
31	5 yaş	Dişi	Alman oban Köpeği	33,52	8,9616E-05
32	5 yaş	Dişi	Beagle	32,61	7,59639E-05
33	3 yaş	Dişi	Golden Retriever	33,26	7,4624E-05
34	4 yaş	Erkek	Golden Retriever	33,44	0,000242454
35	4 yaş	Dişi	Alman oban Köpeği	34,54	4,11143E-05
36	4 yaş	Dişi	Golden Retriever	32,71	0,000119558
37	4 yaş	Dişi	Golden Retriever	33,56	0,00012207
38	3 yaş	Erkek	Doberman	33,59	0,000171441

Tablo 3.1. TERT ekspresyon miktarları. 1-23 arası 2,5-18 ay (grup 1), 24-38 arası 3-6 yaş (grup 2) köpeklerin değerleri.

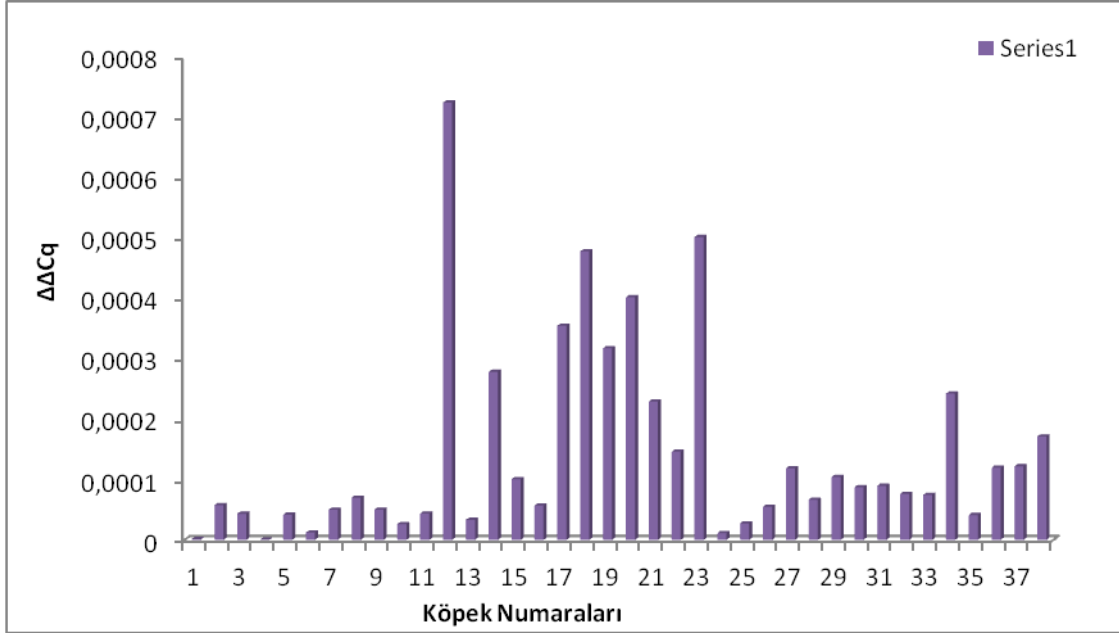
Çalışmada grup 1'deki bazı köpeklerin dogTERT mRNA ekspresyon değerleri şekil 3.1.de, grup 2'deki bazı köpeklerin dogTERT mRNA ekspresyon değerleri 3.2.de ve şekil 3.3.te çalışmaya dahil ettiğimiz tüm köpeklerin mRNA ekspresyon değerleri grafiksel olarak gösterildi.



Şekil 3.1. 2,5-18 aylık köpeklerin qRT-PCR'den alınan ekspresyon değerlerinin grafiği



Şekil 3.2. 3-6 yaş arası (grup 2) köpeklerin qRT-PCR'den alınan ekspresyon değerlerinin grafiği

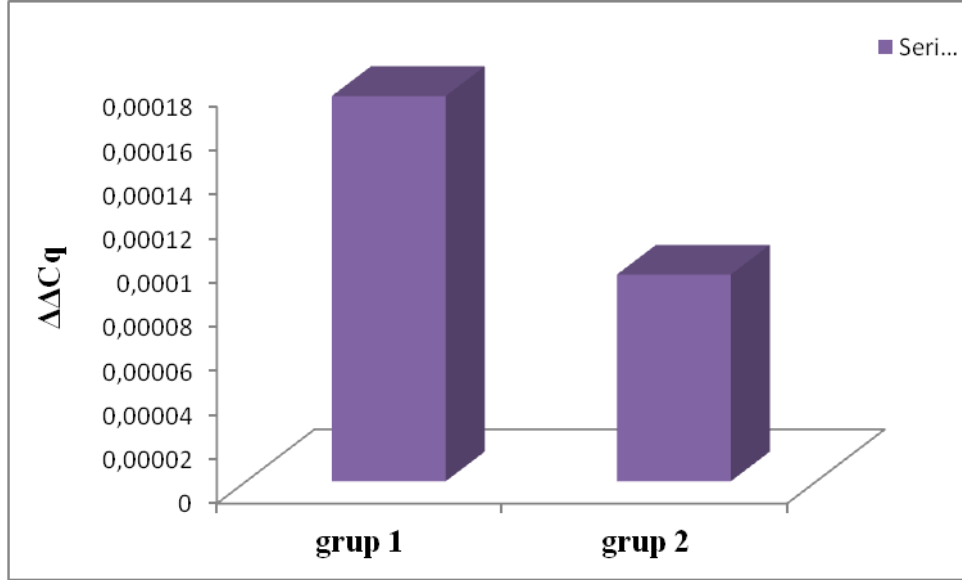


Şekil 3.3. Grup 1 ve 2’deki köpeklerin $\Delta\Delta Cq$ değerleri.

3.2. Telomeraz Reverse Transkriptaz (dogTERT) Geninin mRNA Ekspresyonu

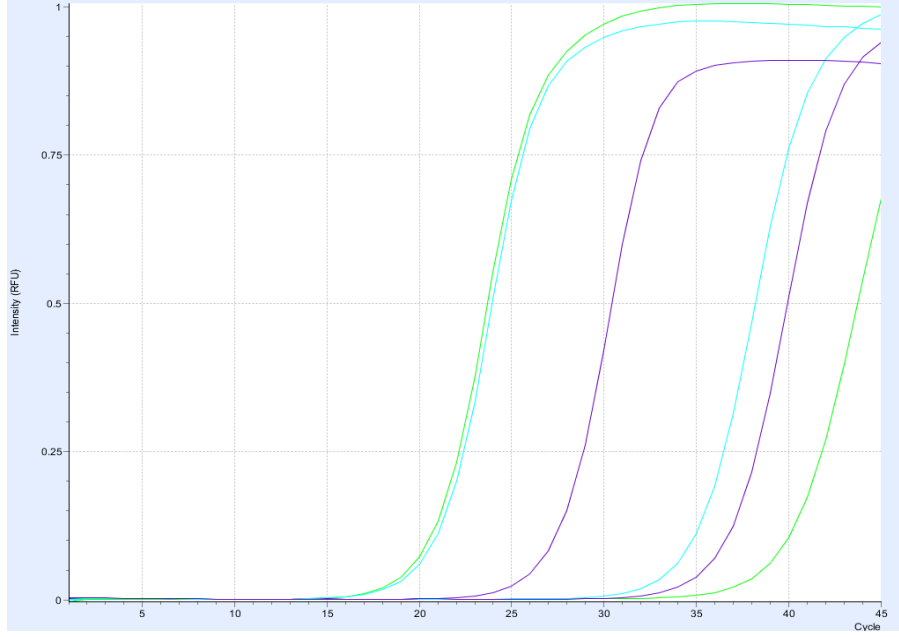
Çalışmada dogTERT geninin mRNA ekspresyonunun kantifikasyonu Light Cycler Real Time cihazıyla yapıldı.

Referans gen olan dogGAPDH’e göre dogTERT geninin ekspresyonu Cq değerleri kullanılarak $2^{-\Delta\Delta Cq}$ değeri hesaplandı. Elde edilen sonuçlar gruplar arasında değerlendirildiğinde ortalamalarını birbirlerine oranlayarak ekspresyon sayılarındaki fark kat artış olarak hesaplandı ve bu hesabın sonunda grup 2’deki köpeklerin TERT mRNA ekspresyonlarının, grup 1’deki köpeklerdekine göre ~2 kat fazla eksprese olduğu görüldü (Şekil 3.4.)

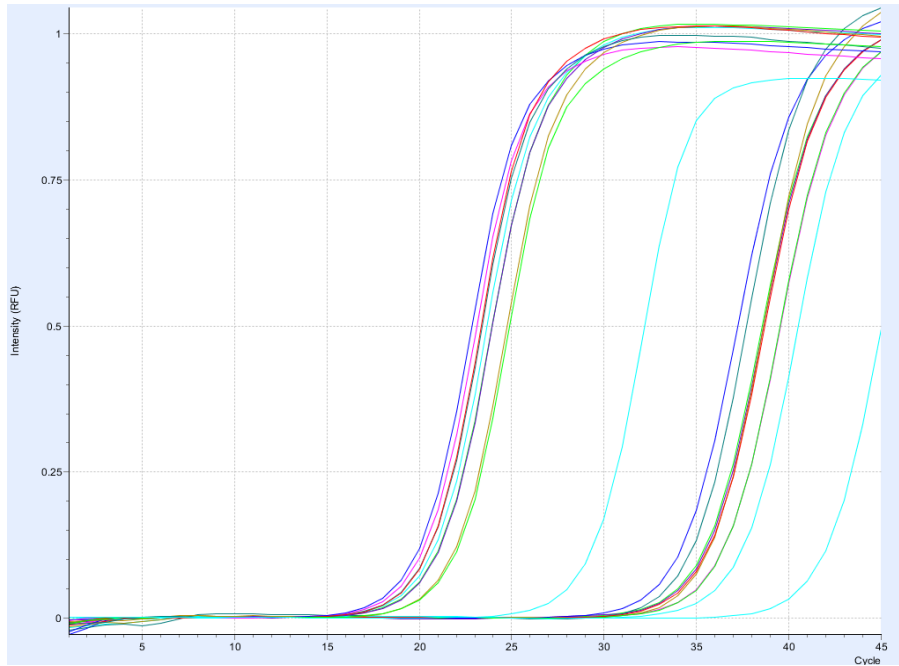


Şekil 3.4. Grup 1 ve 2'deki köpeklere ait TERT ekspresyon düzeylerinin grafiksel karşılaştırılması

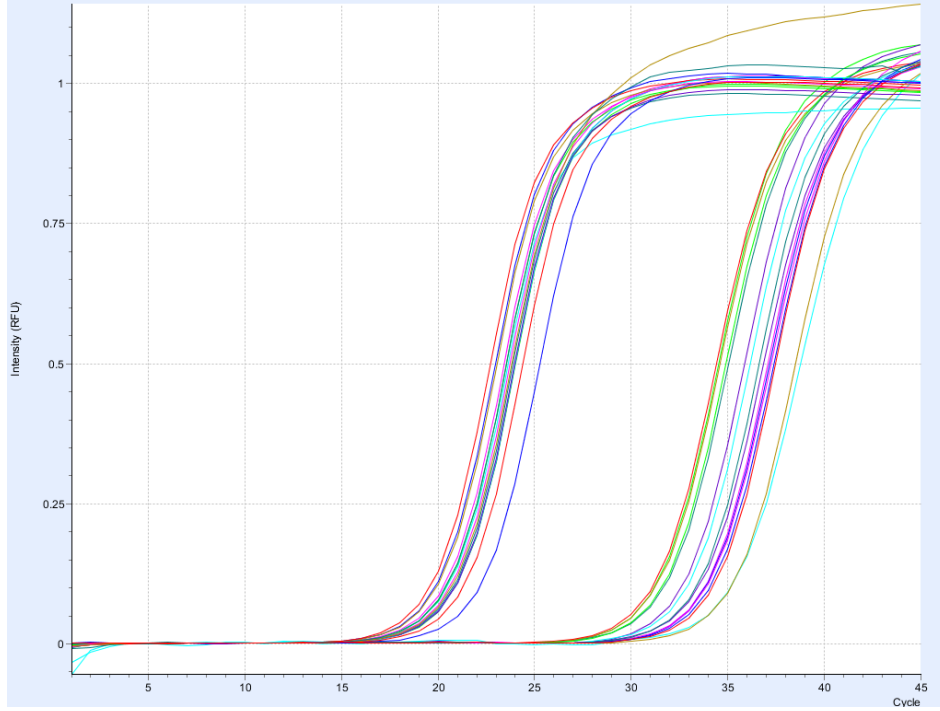
Grup 1'deki bazı köpeklerin dogTERT mRNA ekspresyonlarının eş zamanlı grafiği şekil 3.5.te, grup 2'deki bazı köpeklerin dogTERT mRNA ekspresyonlarının eş zamanlı grafiği şekil 3.6.te ve çalışmaya dahil edilen grup 1 ve grup 2'deki köpeklerin bazılarının dogTERT mRNA ekspresyonlarının eş zamanlı grafiği şekil 3.7.da gösterildi.



Şekil 3.5. Grup 1’deki köpeklere ait dogTERT ve dogGAPDH’in qRT-PCR’de elde edilen amplifikasyonun eş zamanlı ekspresyon görüntüsü



Şekil 3.6. Grup 2’deki köpeklere ait dogTERT ve dogGAPDH’in qRT-PCR’de elde edilen amplifikasyonun eş zamanlı ekspresyon görüntüsü

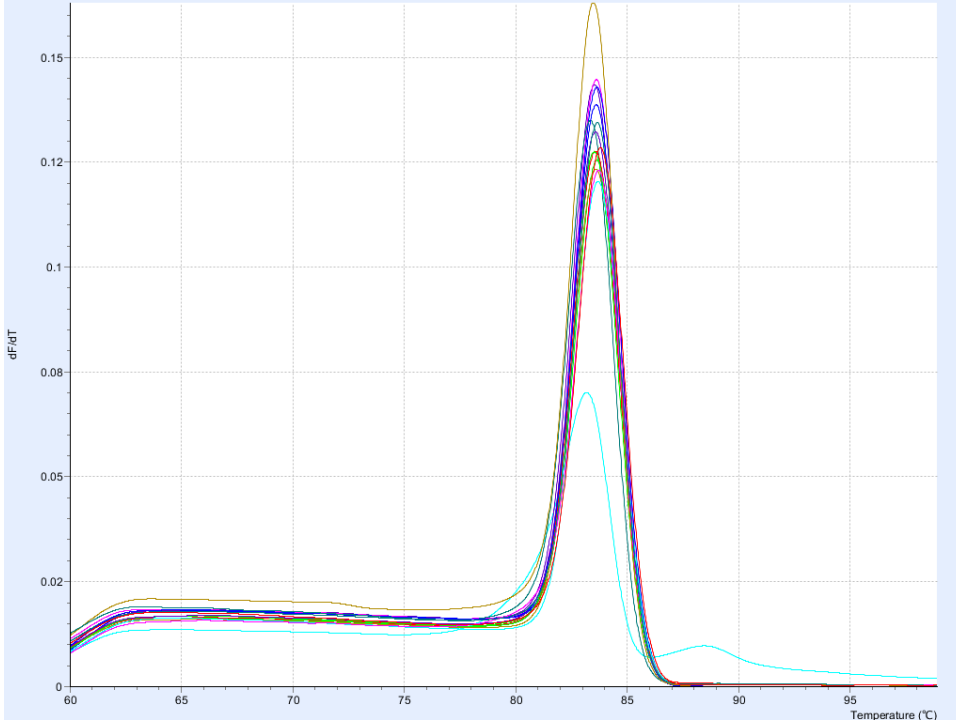


Şekil 3.7. Grup 1 ve 2'deki köpeklerde ait dogTERT ve dogGAPDH'in qRT-PCR'de elde edilen amplifikasyonun eş zamanlı ekspresyon görüntüsü

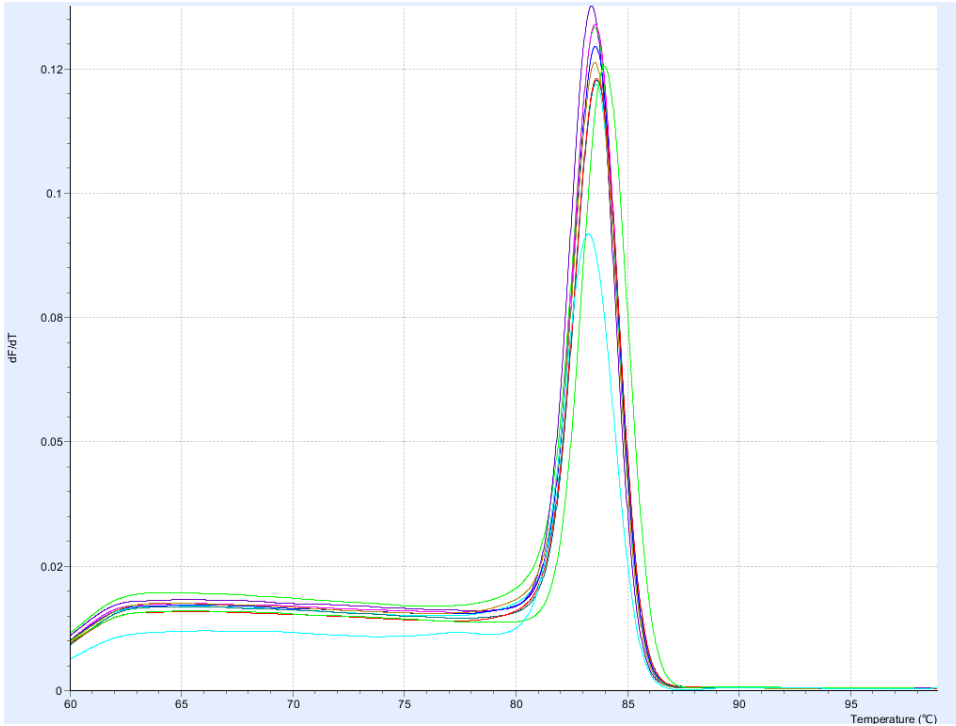
3.3. Melting Point (Tm) Analizi

Melting point analizi ile eksprese edilen örneklerin saflıklarını, girişim yapan maddelerin olup olmadığı, farklı örneklerde aynı gen bölgesinin analiz edilip edilmediği, primer dimeri oluşturup oluşturmadığı saptanmaktadır. Şekil 3.8.de görüldüğü gibi piklerin aynı yerde üst üste çıkmaları örneklerde herhangi bir girişim, primer dimeri olmadığını göstermektedir. Sadece bazı piklerin daha küçük olması o örnekte dogTERT mRNA ekspresyonunun diğerlerine göre daha az olduğunu göstermektedir.

Aynı durum referans gen olarak kullanılan dogGAPDH için de geçerlidir. Yine şekil 3.9.da görüldüğü gibi referans gende herhangi bir girişim, primer dimeri söz konusu değildir.



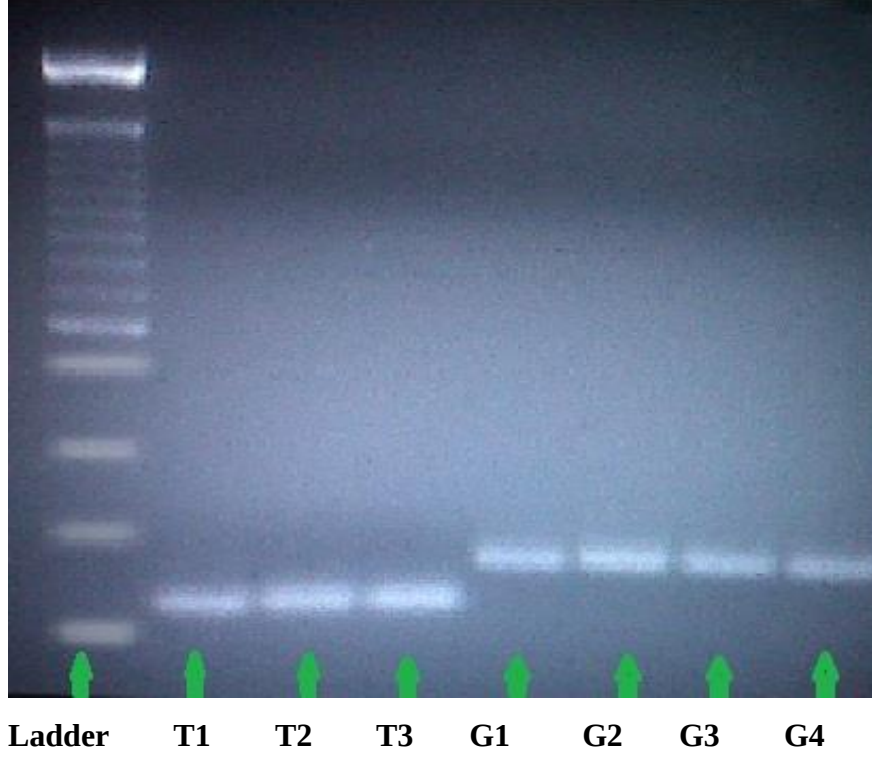
Şekil 3.8. Grup 1 ve 2'deki köpeklere ait TERT mRNA ekspresyonunun melting point (Tm) grafikleri



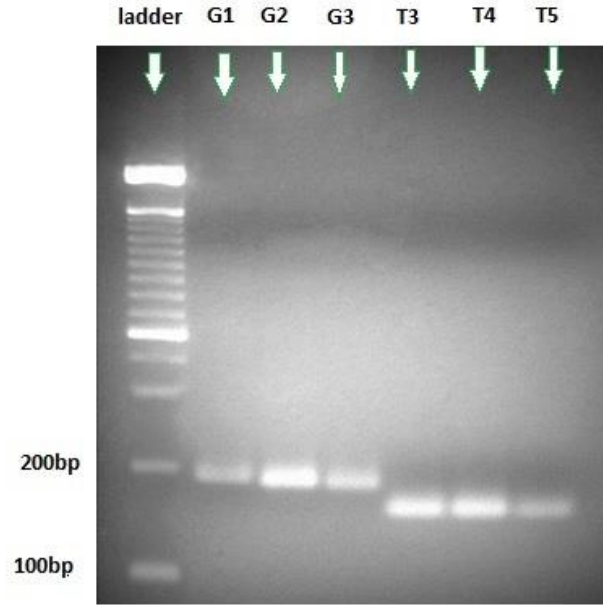
Şekil 3.9. Grup 1 ve 2'deki köpeklere ait GAPDH mRNA ekspresyonunun melting point (Tm) grafikleri

3.4. PCR Ürünlerinin Agaroz Jelinde Kontrolü

PCR Ürününün %2'lik agaroz jel elektroforezdeki görüntüleri şekil 3.10. ve şekil 3.11.de verildi.



Şekil 3.10. Grup 1'den rastgele seçilmiş PCR ürünlerinin %2'lik agaroz jel görüntüleri. G: dogGAPDH, T: dogTERT genlerini ifade etmektedir.



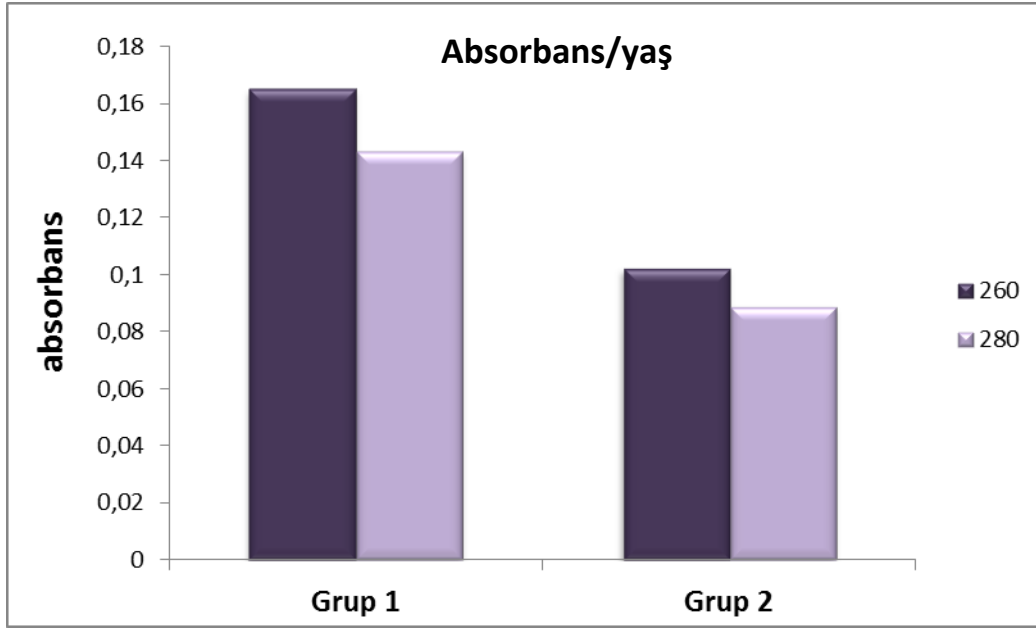
Şekil 3.11. Grup 2’den rastgele seçilmiş PCR ürünlerinin %2’lik agaroz jel görüntüleri.G: dogGAPDH, T: dogTERT genlerini ifade etmektedir.

3.5. RNA’nın Kantitatif Tayini

İzole edilen RNA’ların yoğunlukları spektrofotometre (Thermo microdrop) ile 3 kez tekrar edilerek ölçülmüştür. Bu üç tekrardan elde edilen değerlerin ortalaması alınarak seyrelmefaktörü ile çarpıldı ve her grup için tek tek RNA yoğunluğu hesaplandı (Tablo 3.5.1.).

Absorbans/yaş		
	Grup 1	Grup 2
260	0,165	0,1023
280	0,1432	0,0887
260/280	1,152235	1,153326

Tablo 3.5.1. RNA’nın kantitatif tayini



Şekil 3.12. Grup 1 ve 2’deki köpeklerde RNA’nın kantitatif ölçümünün grafiksel gösterimi

RNA Kalitesi (µg/ml)		
	Grup 1	Grup 2
Ort.	132,01	81,83

Tablo 3.5.2. Grup 1 ve 2’deki köpeklerin RNA yoğunluklarının ortalamaları

4. TARTIŞMA

Lineer kromozomların sonunda büyük ölçüde korunmuş nükleoprotein kompleksleri olan telomerler yaşlanma ve kanserde önemli role sahiptir (Shay ve ark. 2011). Telomer uzunluğu 5 ile 60 kbp aralığında değişmektedir, sekansı ve uzunluğu türlere özgüdür. Köpek telomerleri 10-23 kbp aralığındadır (McKevitt ve ark. 2002). Günümüze kadar üzerinde çalışılan tüm omurgalı telomerleri (TTAGGG)_n nükleotid tekrar dizilerine sahiptir (Shay ve ark. 2011).

Telomeraz, kromozomların 3' uçlarına telomerik sekansların eklenmesini katalizleyen son derece özel bir ribonükleoprotein kompleksidir (Kow ve ark. 2008). Telomerazın iki önemli bileşeni; katalitik ters transkriptaz alt birimi olan TERT ve telomerik sekansların eklenmesi için şablon olarak görev alan RNA bileşeni olan TR'dir. Köpek TERT (dogTERT) yakın zamanda klonlanmıştır ve insan TERT (hTERT) ile oldukça benzer olduğu bulunmuştur (Nasir 2008). Ayrıca kanserli köpek ve insan dokularındaki telomerler de incelendiğinde, histopatolojik, biyolojik yapılarının ve terapiye cevaplarının yakın olduğu görülmüştür (Kow ve ark. 2008; Zavlaris ve ark. 2009).

İnsanlarda telomeraz biyolojisi üzerine yapılan çalışmalar türler arasında telomeraz ekspresyonunda farklılıklar olduğunu göstermektedir. Transgenik kemirgen modeller kanser biyolojisi çalışmalarında ve tedavisinde geniş çapta kullanılmasına rağmen telomer biyolojisi ile ilgili fare ve insanlar arasında ciddi ölçüde farklar mevcuttur. İnsan telomerleri (5-15 kbp) kemirgen telomerlerinden (40-60 kbp) çok daha kısadır (Nasir ve ark. 2001). Telomer kısalması ve telomeraz aktivitesi insanlarda tümör büyümesi ve yaşayabilirliğinde rol oynayabilir iken kemirgenlerde az da olsa etkiye sahiptir. İnsan somatik dokularında telomeraz aktivitesi yok iken yetişkin kemirgen somatik hücrelerinde eksprese olduğu saptanmıştır. Fare hücreleri kendiliğinden ölümsüzleşirken, insan hücrelerinde bu gerçekleşmez. Bu farklılıklar kemirgen modellerin kanser araştırmalarında kullanımını olumsuz etkilemektedir (Nasir ve ark. 2001).

Tavuk telomerleri üzerine yapılan çalışmalarda da türlü varyasyonlara rastlanmıştır. Venkatesan ve price (1998) tavuk telomerlerinin insan telomerlerine benzemesine rağmen tavuklarda telomeraz aktivitesinin dağılımının farelere benzer olduğunu göstermişlerdir. Buna benzer bir şekilde yetişkin hamster ve domuzun ayrıca diğer potansiyel hayvan

modellerinin telomeraz aktivitesinin insan somatik dokularındakinden farklı olduğu bildirilmiştir (Long ve ark. 2005).

Özel bir revers transkriptaz enzimi olan dogTERT mRNA düzeylerine bakmayı seçmemizin nedeni, telomeraz ile ilgili diğer bileşenlerin telomeraz aktivitesinin etkinliğine bakmaksızın devamlı eksprese edilmesine karşılık dogTERT mRNA'sının telomeraz aktivitesiyle ilgili olarak artmasıdır ki bu dogTERT'in telomeraz denetleyen faktör olduğunu göstermektedir (Nasir ve ark. 2001).

TERT'in ekspresyonu telomeraz aktivitesinde hız sınırlayıcıdır çünkü TERT'in ekspresyonu telomeraz aktivitesi ile hücreyi büyük ölçüde sınırlandırır (Metzger ve ark. 2009).

Telomeraz aktivitesi ile dogTERT'in ekspresyonunun ilişkili olup olmadığını belirlemek için yapılan bir çalışmada dogTERT ekspresyonu telomeraz aktivitesi bakımından durumu bilinen köpek hücre kültürlerinin panelinde değerlendirilmiş ve dogTERT mRNA ekspresyonunun bütün tümörlü hücre hatlarında (A72, CML10, CMT3, CMT7, CMT8 ve MDCK) gerçekleştiği saptanmıştır (Nasir ve ark. 2004). Böylece telomeraz aktivitesinin varlığı ile dogTERT ekspresyonunun bağlantılı ve bu nedenle TERT ekspresyonunun köpek hücresi içinde telomeraz aktivitesini düzenleyen birincil belirleyicisi ve insan hücresiyle uyumlu olduğu sonucuna varmışlardır (Nasir ve ark. 2004; Peruzzi ve ark. 2010).

Telomeraz aktivitesi fetal ve ergin testislerde, fetal ovaryumlarda, tamir gören dokuların çoğalan hücrelerinde, hematopoetik kök hücrelerde, lenfositlerde, saç foliküllerinde, barsak kript hücrelerinde ve birçok kanser hücresi çeşidinde gösterilmiştir (Hiyama and Hiyama 2003, Ferreira ve ark. 2004). Telomeraz aktivitesine sahip bu tip hücrelerde hücre bölünmesinde meydana gelen telomer kaybı telafi edilerek hücrenin bölünmeye devam etmesi sağlanır (Testorelli 2003, Incles ve ark 2003). Bu şekilde korunan sabit telomer uzunluğunun hücresel yaşlanmayı önlediği ve kromozom dayanıklılığını sağladığı kabul edilmektedir (Heist ve ark 2003).

Yapılan bazı çalışmalarda yetişkin sağlıklı kişilerden alınan periferik kan ve kemik iliği mononüklear hücrelerinde telomeraz aktivitesi belirlenmiştir (Trentin ve ark 1999, Engelhardt ve ark 2000, Koutroumba ve ark 2003). Ayrıca normal insan T ve B

lenfositlerinde çok düşük seviyelerde telomeraz aktivitesinin bulunduğu ancak bu hücreler invitro olarak mutajenler ile uyarıldıklarında telomeraz aktivitesinin arttığı belirtilmektedir (Qi ve ark. 2013).

Hematopoetik kök hücrelerinin ve antijenik bir uyarı ile çoğalan lenfositlerin her hücre bölünmesinde meydana gelen telomer kısaltmasını azaltmak için telomeraz aktivitesine sahip oldukları düşünülmektedir (Koutroumba ve ark 2003, Peruzzi ve ark. 2010). Çalışmamızda köpeklerden alınan periferik kan lökositlerinde telomer ekspresyonunu belirledik. Bu durumun nonspesifik mitojenlere yada antijenlere maruz kalınca lenfoblastlara dönüşen dinlenme halindeki lenfositlerin çoğalabilmesinden kaynaklanabildiği kanısındayız.

Hematopoetik kök hücreleri ve lenfositlerde telomeraz aktivitesine rağmen bu hücrelerde yaşlanma ile beraber telomerlerin kısaltıldığı bildirilmektedir. Telomeraz aktivitesi bu normal hücrelerde muhtemelen bu dokunun rejeneratif potansiyelini sağlamak için korunmaktadır. Bununla beraber organizma bir antikanser mekanizması olarak bu hücrelerin çoğalma kapasitelerini sınırlamaya ihtiyaç duymaktadır. Çünkü bu hücrelerde telomeraz aktivitesi telomer kısaltmasını yavaşlatabilmekte fakat önleyememektedir (Koutroumba ve ark. 2003). Literatürler ile uyumlu olarak çalışmamızın sonuçları değerlendirildiğinde yaş arttıkça dogTERT mRNA ekspresyonunun azaldığı görülmektedir (Şekil 3.4.).

Normal tonsiller içerisindeki lenfositlerin periferik kandakine göre çok daha fazla telomeraz aktivitesi taşıdığı ve aktive lenfositlerde hem in vivo hem de in vitro koşullarda telomeraz aktivitesi gösterilmiştir (Iwama 1998). Genç köpeklerde periferik kan hücrelerinin aktive lenfosit fraksiyonunda bir artış olabilir ve yine tonsiller ve lenf nodüllerini içeren lenfatik dokulardaki aktive lenfositler periferik kan içine göç etmiş olabilirler. Bundan dolayı dinlenme halindeki lenfositler ile karşılaştırıldığında mitojenlerle karşılaşan aktive lenfositler ile immatür proliferatif hücreler yüksek telomer aktivitesi gösterebilirler. Bütün bunlar genç köpeklerdeki telomeraz mRNA ekspresyonunu açıklamada yardımcı olabilir.

Yapılan alışmalar kanser tanısı için tümör hücrelerinden köken alan mutant DNA'nın feçes, idrar, balgam, pankreatik sıvı, safra, serebrospinal sıvı, plazma ve serumda tespit edilebildiğini göstermiştir. Bunlardan bazılarının günümüzde kanserin erken tanısında, prognozunda, malign progresyonun gidişatını takip etme aşamalarında faydalı olabileceğini gösteren çalışmalar vardır. Tümörlerin tümünde DNA hasarları, k-ras mutasyonları gibi kolayca belirlenememektedir. Aksine bu tür tümörlerde gen üzerinde dağılmış mutasyonlar, mikrosatellit instabilite ve heterozigozite olabilmektedir. Bu tür değişikliklerin belirlenmesinin daha zor olduğu ortadadır. Bunlardan dolayı DNA hatalarının belirlenmesi için alternatif bir metod olarak doku numunelerinden dökülen hücrelerde gen ekspresyonunun kantifikasyonunun bir tümör belirteci olarak kullanılabileceği dşnlmş ve yapılan çalışmalar bunu doğrulamıştır (Oeseburg ve ark. 2010).

Telomeraz mRNA ekspresyonu ya minimal invaziv ya da tamamen invaziv olmayan tekniklerle elde edilen numunelerde çalışabilmektedir. Özellikle vücut sıvıları, dışkılar, gastrik ve kolonik yıkamalar, bronkoalveolar fırçalama numuneleri, idrar, plazma, serum ve tam kan gibi biyolojik örnekler bu amaçla kullanılabilmektedir. Örneğin, Ito ve ark. (1998) mesane kanserinde idrar örneklerinde hTERT ekspresyonunun kantitatif ölçümünü yapmışlardır.

Tümörlü insan dokularında telomeraz aktivitesinin (TA) oldukça yüksek seviyelerde olduğu insanlardaki katı tümörlerin %85'inde telomerazın eksprese edildiği ve köpek tümörlerinin %92-95'inde telomeraz aktivitesinin pozitif olduğu gösterilmiştir. Tümörlü dokulara spesifikliği, telomerazı, terapötik müdahalelerde çekici bir hedef haline getirmekte ve insan onkolojisinde birçok antitelomeraz klinik çalışmaları devam etmektedir (Kow ve ark. 2008).

Yapılan son çalışmalarda köpek genom dizileri, köpeklerin insan kanserleri için karşılaştırmalı bir model olmasına ve gelişimine katkı sağlayacağını düşündürmektedir. Ayrıca, kanser, yılda 100,000 köpek başına 1437 tahmini yıllık vaka adedi ile köpeklerde önde gelen ölüm nedenlerinden biridir ve bu yüzden köpek kanserlerinin temel biyolojisinin açıklanmasında ve tedavinin hedeflerini belirlemek için karşılaştırmalı biyolojik yaklaşımların uygulanması kanserli köpek hastalarının yararına olacaktır (Long ve ark. 2005; Shay 2011).

Birçok köpek kanser hücre hatlarında örneğin osteosarkom hücre hatlarında (CMT3, CMT7 ve CMT8) oldukça yüksek seviyelerde telomeraz aktivitesi belirlenmiştir. Telomeraz aktivitesi üniteleri ayrıca melanom (CLM10) ve köpek böbrek hücre hatlarında (GHK) yüksekken CMT3-8 hatlarında daha düşük bulunmuştur. Telomeraz aktivite seviyesi MDCK hücrelerinde 0.2U'den düşüktür ve bu hücre hattı telomeraz aktivitesi açısından negatif olarak kabul edilmektedir (Nasir ve ark. 2001).

Kanser hücrelerinin büyük bir kısmının yaşlılığa bağlı telomeri devre dışı bırakmak için telomeraz enzimi üreterek kullandığı ve antikanser ilaçlarının geliştirilmesinde telomerin anahtar rolü olduğu bulunmuştur (Jesus ve ark. 2013). Telomeraz aktivitesinin artışının regülasyonu anlaşıldığında kanser tedavisi için yeni bir hedef tanımlanmış olacak ve klinik değerlendirmelerde yeni tedavi stratejileri ortaya çıkacaktır. Ancak bu amaçla kullanılacak olan telomeraz inhibitörleri ile ilgili daha ayrıntılı çalışmalara ihtiyaç vardır. Bu nedenle hassas tümörlerin hedeflenmesi modeller kullanılarak denemelere devam edilmesi gerekmektedir. Bu amaçla köpekler ayrıca kanser tedavisinde telomeraz için hayvan modeli olarak kullanılabilir. Köpekler telomerazın hedeflendiği yeni tedavi stratejileri çalışmalarında ya da inhibisyon ve telomeraz esaslı gen terapi protokollerinde yarar sağlayabilir (Peruzzi ve ark. 2010).

Günümüzde kanser hastalarında dolaşan tümör hücrelerini belirlemek için Real-Time PCR kullanılarak tümörle ilişkili proteinleri şifreleyen mRNA'ların belirlenmesinin oldukça sensitif bir araç olduğuna inanılmaktadır. Konvansiyonel PCR end-point ölçüm yaparken, real time PCR "ekponansiyel büyüme fazında" ölçüm yapmaktadır. Aynı zamanda floresan sinyalin gücü doğrudan çoğaltılan ürün miktarı ile orantılıdır ve konvansiyonel ölçümlerden daha az nükleik asit ile çalışılabilmektedir. Daha hızlıdır (< 1 saat) ve PCR sonrası elektroforez gerektirmez. Günlük numune çalışma sayısı yüksektir (~200 numune/gün) ve kontaminasyon riski düşüktür. Sensitivitesi (< 5 kopya) ve tekrarlanabilirliği (CV < % 2.0) yüksektir. Geniş dinamik aralığa sahiptir (10 - 1010 kopya). Sonuçlar kantite edilebilir. Floresan veren proplar kullanılarak hedef nükleik asitteki mutasyonlar saptanabilir (Zhang 2013).

Telomeraz aktivitesi ile TERT ekspresyonu arasındaki korelasyondan faydalanılarak TERT'in ifade edilme düzeyinin saptanmasında kullanılan yöntemlerden bir tanesi de Real Time PCR'dır. Çalışmamız dogTERT'in periferik kandan izolasyonu ile kantitatif miktar tayininin Light Cyclers Real Time PCR Sybr Green yöntemi kullanılarak yapılması açısından bir ilk niteliğindedir.

5. SONUÇ

Son yıllarda yaşlanma ile telomer kaybı, farklı dokularda telomeraz regülasyonu ve köpek telomeraz gen sekansının tanımlanması dahil olmak üzere birçok önemli parametre üzerine çalışmalar devam etmektedir. Özellikle köpeklerin in vivo telomeraz çalışmaları için ideal bir model organizma olabileceği öngörülmektedir.

Bu çalışmada klinik olarak sağlıklı farklı ırklarda 2,5-18 aylık 23 adet, 3-6 yaş arası 15 adet olmak üzere 38 köpekten kan örnekleri alınarak kantitatif olarak telomer mRNA (dogTERT) gen ifade düzeyleri qRT-PCR SYBR Green metodu kullanılarak bakıldı. İki grup arasındaki mRNA ekspresyon düzeyleri karşılaştırıldığında nispeten daha yaşlı olan grupta daha genç olan gruba göre yaklaşık iki kat düzeyinde bir azalış saptandı. Köpeklerde tam kan kullanılarak dogTERT ekspresyonunun gösterilebileceği ve bu sonucun bundan sonra aynı ırk köpekler kullanılarak ve köpek yaşı arttırılarak yapılacak yeni çalışmalar için referans olabileceği sonucuna varıldı.

Biyolojik yaşlanmanın etiyolojisinde telomer uzunluğunun marker olarak kullanılabileceği düşünülmektedir. Ancak bu konulardaki çalışmalar çok yenidir. Köpeklerde telomeraz mRNA ekspresyonundaki bu azalmanın bir risk faktörü mü yoksa bir sonuç mu olduğuna dair çalışmalara ihtiyaç vardır. DogTERT'in kandan kantitatif tayini telomeraz-hastalık ilişkisi yada tedavi yaklaşımları açısından yeni çalışmalara ışık tutacaktır.

ÖZET

Telomer; kromozom uçlarında bulunan özelleşmiş DNA ve protein kompleksinden oluşmaktadır. Omurgalılarda telomerik DNA, TTAGGG gibi, guaninden zengin dizelerden oluşur.

Telomerler kromozomların uçlarında bulunan tekrarlayıcı DNA dizileri olup kromozomları replikasyon sonu problemine ve nükleaz parçalanmasına karşı korurlar. Telomeraz ribonükleoprotein yapısında bir enzim kompleksidir. Polimerizasyon için kendi RNA'sını kalıp olarak kullanarak replikasyon sırasında kaybolan telomer dizilerini yerine koyar. Telomeraz enzim aktivasyonunun hücre ölümsüzlüğü ve karsinogenez sürecinde önemli bir rol oynadığına inanılmaktadır. Telomerazın aktivasyonu sınırsız proliferasyon ve ölümsüzlüğe yol açar ve bu suretle tümör oluşumunda bu enzimin aktivasyonu çok önemli bir basamağı oluşturur. Yapılan çalışmalarla insan telomeraz revers transkriptaz (hTERT) mRNA ekspresyonunun telomeraz aktivasyonu ile korele olduğu ispatlanmış ve prekanseröz lezyon ve insan kanserlerinin çoğunda regülasyon artışına neden olduğu bulunmuştur.

Bu çalışmada dogTERT mRNA ekspresyonunun kantitatif belirlenmesi, dogTERT mRNA ekspresyon seviyelerinin farklı yaş ve ırklaradaki köpeklerle korelasyonlarının analiz edilmesini amaçlandı. Bunun için farklı ırk ve yaşlardaki 38 köpek kullanarak dogTERT mRNA seviyelerini Light Cycler Real-Time PCR (qRT-PCR) ile analiz edildi.

Sonuçta grup 1'deki (2,5-18 ay) köpeklerde dogTERT mRNA ekspresyon seviyelerinin grup 2'deki (3-6 yaş) köpeklere göre ~2 kat artış vardır. Sonuçlarımız qRT-PCR kullanarak tam kandan dogTERT mRNA ölçümü yapılması açısından köpek telomer çalışmaları arasında ilk niteliğindedir.

İlerdeki çalışmalarda, daha fazla sayıda köpek kullanılması gerektiği düşünülmekte ve bu çalışma klinik çalışmalara öncül olacak bir çalışmadır.

Anahtar sözcükler: Telomer, Telomeraz, dogTERT, qRT-PCR, köpek.

ABSTRACT

Telomeres are situated at the ends of human chromosomes; with repeating TTAGGG sequences (bases) and related proteins; which protect sticking of chromosome ends and thus from chromosomal defects. Intactness of telomeres is maintained by an enzyme called telomerase.

Telomeres are repetitive DNA sequences at the ends of chromosomes, protecting them against incomplete replication and nuclease degradation. Telomerase is a ribonucleoprotein enzyme complex. It restores telomere sequences lost during replication by using its RNA component as a template for polymerization. It is believed that telomerase enzyme activation play a significant role in the cell immortalization and carcinogenesis. The telomerase activation leads to indefinite proliferation and immortalization therefore, it is an important step in tumourigenesis. It has been found that the human telomerase revers transcriptase (hTERT) mRNA expression is correlated with telomerase activity and is up-regulated in most pre-cancerous lesions and human cancer.

In this study, we aimed to evaluate quantitative determination of dogTERT mRNA expression and to analyze the correlation between the expression level of dogTERT mRNA and different age and race. The level of dogTERT mRNA was analyzed in 38 different age and race dogs by Real-Time quantitative RT-PCR.

The levels of dogTERT mRNA expression in group 1 (2,5-18 month) were significantly higher than group 2 (3-6 age) dogs. Our preliminary results show that real time PCR measurement of dogTERT mRNA in peripheric blood discriminates the first study of all about dog telomer studies.

However, a further study with long-term follow up in a larger number of patients is required to confirm the clinical application of this molecular marker.

Key words: Telomere, Telomerase, dogTERT, qRT-PCR, Dog.

KAYNAKLAR

- Aldous WK, Grabill NR, A fluorescent method for detection of telomerase activity, Diagnostic Molecular Pathology 6(2): 102-110,1997.
- Angelopoulou K, Zavlaris M, Papaioannou N, Vlemmas I., Canis familiaris telomerase reverse transcriptase undergoes alternative splicing, Mamm Genome., Sep; 19(9):647-53. Epub 2008 Oct 4, 2008.
- Atlı K., Bozcuk N., Telomer ve Hücresel Yaşlanma, Turkish Journal of Geriatrics 5,(3): 111-114, , 2002.
- Baerlocher GM, Rice K, Vulto I, Lansdorp PM. Longitudinal data on telomere length in leukocytes from newborn baboons support a marked drop in stem cell turnover around 1 year of age. Aging Cell. 6:121-123, 2007
- Benetos A, Kark JD, Susser E, Kimura M, Sinnreich R, Chen W, Steenstrup T, Christensen K, Herbig U, von Bornemann Hjelmberg J, Srinivasan SR, Berenson GS, Labat C, Aviv A., Tracking and fixed ranking of leukocyte telomere length across the adult life course, Aging Cell. Aug;12(4):615-21, 2013.
- Blackburn, E.H. Structure and function of telomeres. Nature, 350: 569-573, 1991.
- Bolat İ., Keklikoğlu N., Akıncı S., Telomerlerin Hücresel Rolü, Journal of Istanbul University, Vol 41, No:4, 2007.
- Boldrini L, Pistolesi S, Gisfredi S, Ursino S, Ali G, Pieracci N, Basolo F, Parenti G, Fontanini G., Telomerase activity and hTERT mRNA expression in glial tumors, Int J Oncol. Jun;28(6):1555-60, 2006.
- Brümmendorf TH, Mak J, Sabo KM, Baerlocher GM, Dietz K, Abkowitz JL, Lansdorp PM. Longitudinal studies of telomere length in feline blood cells: implications for hematopoietic stem cell turnover in vivo, Experimental Hematology 30: 1147-1152, 2002.

- Cadile CD. ,Biller BJ, Kitchell BE, Evaluation of an assay for detecting telomerase activity in neoplastic tissues of dogs, Am J Vet Res. Dec;59(12):1526-9, 1998.
- Cawthon Richard M, Ken R Smith, Elizabeth O'Brien, Anna Sivatchenko, Richard A Kerber. Association between telomere length in blood and mortality in people aged 60 years or older. The Lancet. 361: 393- 395, 2003.
- Cawthon Richard M., Telomere measurement by quantitative PCR, Nucleic Acids Res. May 15; 30(10): e47, 2002.
- Cells: Anatomy and Action, Part 7: DNA and RNA: The molecular basis of heredity. (www.mhhe.com/enger11)
- Cherif H, Tarry JL, Ozanne SE, Hales CN., Ageing and telomeres: a study into organ- and gender-specific telomere shortening, Nucleic Acids Res. Mar 1;31(5):1576-83, 2003.
- Cong Y, Wright WE, Shay JW. Human telomerase and its regulation. Micro. Bio. Mol Bio.Rev 66: 407-25, 2002.
- Coşan D., İnsan ve Sıçan Glial Tümör Hücre Dizilerinde Telomeraz aktivitesi ve Hücre Yüzey Sialilasyonu Arasındaki İlişkinin Araştırılması, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, 2006.
- Delany Mary E., Daniels Laura M.. The chicken telomerase reverse transcriptase (chTERT): molecular and cytogenetic characterization with a comparative analysis. Gene. 339: 61-69. 2004.
- Dikmen ZG., Dikmen E., Doğan P., Kanserde telomeraza yönelik tedavi stratejileri, Hacettepe Tıp Dergisi; 37:49-55, 2006.
- Durusoy M., Telomeraz Aktivitesini Değerlendirmede Kullanılan Yöntemler ve Dayandıkları Esaslar, Türk Biyokimya Dergisi; 28 (1); 25-29, 2003.
- Edo MD, Andrés V. Aging, telomeres, and atherosclerosis.Cardiovasc Res. May 1;66(2):213-21, 2005.

- Engelhardt M, Mackenzie K, Drullinsky P, Silver RT, Moore MA., Telomerase activity and telomere length in acute and chronic leukemia, pre- and post-ex vivo culture, Cancer Res. Feb 1;60(3):610-7, 2000.
- Ferreira MG, Miller KM, Cooper JP. Indecent exposure: when telomeres become uncapped. Mol Cell.,Jan 16;13(1):7-18, 2004.
- Fick LJ, Fick GH, Li Z, Cao E, Bao B, Heffelfinger D, Parker HG, Ostrander EA, Riabowol K., Telomere length correlates with life span of dog breeds, Cell Rep. Dec 27;2(6):1530-6., 2012.
- Fletcher TM, Trevino A, Woynarowski JM, Enzymatic activity of endogenous telomerase associated with intact nuclei from human leukemia CEM cells, Biochem Biophys Res Commun 265(1) 51-56,1999.
- Gelmini S, Caldini A, Becherini L, Capaccioli S, Pazzagli M, Orlando C., Rapid, quantitative nonisotopic assay for telomerase activity in human tumors, Clin Chem. Oct;44(10):2133-8,1998.
- Golubovskaya VM, Filatov LV, Behe CI, Presnell SC, Hooth MJ, Smith GJ, Kaufmann WK.,Telomere shortening, telomerase expression, and chromosome instability in rat hepatic epithelial stem-like cells, Mol Carcinog. Mar;24(3):209-17,1999.
- Granger MP, Wright WE, Shay JW., Telomerase in cancer and aging,Crit Rev Oncol Hematol., Jan;41(1):29-40, 2002.
- Greider CW, Blackburn EH., Identification of a specific telomere terminal transferase activity in Tetrahymena extracts, Cell. Dec;43(2 Pt 1):405-13, 1985.
- Günel T., Aydın K., Real-Time PCR ve Uygulama Alanları, Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi 2(2): 43-45, 2009.
- He Y. Neumann, RD. Panyutin, IG, Intramolecular quadruplex conformation of human telomeric DNA assessed with 125I-radioprobng. Nucleic Acids Res., Oct 8;32(18):5359-67, 2004.

Heist EK, Huq F, Hajjar R. Telomerase and the aging heart, *Sci Aging Knowledge Environ.* May 14;2003(19):PE11, 2003.

Hirose M, Hashimoto JA, Tahara H, Ide T, Yoshimura T., New method to measure telomerase activity by transcription-mediated amplification and hybridization protection assay, *Clinical Chemistry*, 44(12): 2446-2452, 1998.

Hiyama E, Hiyama K., Telomerase as tumor marker, *Cancer Lett.* May 15;194(2):221-33, 2003.

<http://irc.igd.cornell.edu/MolecularMarkers/PCR>

<http://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/protocols/biology/gene-expression-analysis-of-arabidopsis-thaliana.html>

<http://www.thd.org.tr/1/haberler/22/2009-nobel-tip-odulleri-aciklandi>

Huh HJ, Huh JW, Yoo ES, Seong CM, Lee M, Hong KS, Chung WS., hTERT mRNA levels by real-time RT-PCR in acute myelogenous leukemia, *Am J Hematol.*, Aug;79(4):267-73, 2005.

Incles CM, Schultes CM, Kelland LR, Neidle S., Acquired cellular resistance to flavopiridol in a human colon carcinoma cell line involves up-regulation of the telomerase catalytic subunit and telomere elongation, sensitivity of resistant cells to combination treatment with a telomerase inhibitor, *Mol Pharmacol.* Nov;64(5):1101-8, 2003.

Ito H, Kyo S, Kanaya T, Takakura M, Koshida K, Namiki M, Inoue M., Detection of human telomerase reverse transcriptase messenger RNA in voided urine samples as a useful diagnostic tool for bladder cancer, *Clin Cancer Res.* Nov; 4(11):2807-10, 1998.

Iwama H, Ohyashiki K, Ohyashiki JH, Hayashi S, Yahata N, Ando K, Toyama K, Hoshika A, Takasaki M, Mori M, Shay JW., Telomeric length and telomerase activity vary with age in peripheral blood cells obtained from normal individuals, *Hum genet* 102: 397-402. 1998.

- Jarstfer MB, Cech TR., Effects of nucleotide analogues on Euplotes aediculatus telomerase processivity: evidence for product-assisted translocation, *Biochemistry*., Jan 8;41(1):151-61, 2002.
- Jennings BJ, Ozanne SE, Dorling MW, Hales CN., Early growth determines longevity in male rats and may be related to telomere shortening in the kidney, *FEBS Lett.* Apr 1;448(1):4-8, 1999.
- Jesus BB., Blasco MA., Telomerase at the intersection of cancer and aging, *Trends in Genetics*, September Vol. 29, No. 9, 2013.
- Jing Zhi Guan, Toyoki Maeda, Masahiro Sugano, Jun-ichi Oyama, Y Oshihiro Higuchi, Tomokazu Suzuki, Naoki Makino. An analysis of telomere length in sarcoidosis. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 62:1199-203, 2007.
- Kalmbach KH, Fontes Antunes DM, Dracxler RC, Knier TW, Seth-Smith ML, Wang F, Liu L, Keefe DL., Telomeres and human reproduction, *Fertil Steril.* Jan;99(1):23-9, 2013.
- Kipling D. , Cooke H., Hypervariable ultra-long telomeres in mice, *Nature* 347, 400–402, 1990.
- Koutroumba P., Polychronopoulou S., Haidas S., Structure and function of telomeres/telomerase and their role in preleukemia and haematologic malignancies, *Haema*, 6 (1) 35-47, 2003.
- Kow K., Thamm D.H., Terry J., Grunerud K., Bailey S.M., Withrow S.J., S.E. Lana, Impact of Telomerase Status on Canine Osteosarcoma Patients, *J Vet Intern, Med*; 22:1366–1372, 2008.
- Lange T., Broccoli D, Smogorzewska A, Chong L, Human telomeres contain two distinct Myb-related proteins, TRF1 and TRF2, *Nat Genet.* Oct;17(2):231-5, 1997
- Lehner R, Enomoto T, McGregor JA, Shroyer AL, Haugen BR, Pugazhenti U, Shroyer KR., Quantitative analysis of telomerase hTERT mRNA and telomerase activity in endometrioid adenocarcinoma and in normal endometrium, *Gynecol Oncol.* Jan;84(1):120-5, 2002.

- Lichtsteiner SP, Lebkowski JS, Vasserot AP. Telomerase: A Target for Anticancer Therapy. *Ann NY Acad Sci*, 886: 1-11,1999.
- Lin SY and Elledge SJ. Multiple tumor suppressor pathways negatively regulate telomerase. *Cell.*, 113: 881-889, 2003.
- Lingner J., Cech T. R.: Telomerase and chromosome end maintenance, *Current Opinion in Genetics & Development*, 8:226-232, 1999.
- Lledó SM, Garcia-Granero E, Dasí F, Ripoli R, García SA, Cervantes A, Aliño SF, Real time quantification in plasma of human telomerase reverse transcriptase (hTERT) mRNA in patients with colorectal cancer, *Colorectal Dis.* Jul;6(4):236-42, 2004.
- Long S, Argyle DJ, Gault EA, Campbell S, Nasir L., The canine telomerase catalytic subunit (dogTERT): characterisation of the gene promoter and identification of proximal core sequences necessary for specific transcriptional activity in canine telomerase positive cell lines, *Gene.* Sep 26;358:111-20, 2005.
- Lubna Nasir, Telomeres and telomerase: Biological and clinical importance in dogs, *The Veterinary Journal* 175, 155–163, 2008.
- Lundblad V, Wright WE. Telomeres and telomerase: a simple picture becomes complex, *Cell* 87 (1): 369-75, 1996.
- Lundblad V., Blackburn E.H. An alternative pathway for yeast telomere maintenance rescues est1- senescence. *Cell* 73, 347–360, 1993.
- McKevitt TP, Nasir L, Devlin P, Argyle DJ., Telomere lengths in dogs decrease with increasing donor age, *J Nutr.*, Jun;132(6 Suppl 2):1604S-6S, 2002.
- McPherson Michael J., Simon Geir Møller ISBN 0-203-00267-9, Taylor & Francis e-Library, 2006.
- Metzger R, Vallbohmer D, Müller-Tidow C, Higashi H, Bollschweiler E, Warnecke-Eberz U, Brabender J, Baldus SE, Xi H, Berdel WE, Serve H, Hoelscher AH, Schneider PM., Increased human telomerase reverse transcriptase (hTERT) mRNA

expression but not telomerase activity is related to survival in curatively resected non-small cell lung cancer, *Anticancer Res.* Apr;29(4):1157-62, 2009.

Miroğlu YY., Dıraman E., Eren Z., Telomer ve Telomeraz, *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi* 4 (2):41-48, 2011.

Miura N, Maeda Y, Kanbe T, Yazama H, Takeda Y, Sato R, Tsukamoto T, Sato E, Marumoto A, Harada T, Sano A, Kishimoto Y, Hirooka Y, Murawaki Y, Hasegawa J, Shiota G., Serum human telomerase reverse transcriptase messenger RNA as a novel tumor marker for hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res.* May 1;11(9):3205-9, 2005.

Mollica L, Fleury I, Belisle C, Provost S, Roy DC, Busque L., No association between telomere length and blood cell counts in elderly individuals. *Journal of Gerontology series A, biological sciences and medical sciences.* 64: 965-967, 2009.

Morin, G.B. The human telomere terminal transferase enzyme is a ribonucleoprotein that synthesizes TTAGGG repeats, *Cell* 59, 521–529, 1989.

Muntoni A and Reddel R.R. The first molecular details of ALT in human tumor cells. *Hum. Mol. Genet.*, 14, 191–196, 2005.

Nakayama T, Kyo S, Takakura M, et al. hTERT is a critical determinant of telomerase activity in renal-cell carcinoma. *Int J Cancer*, 78: 539-43, 1998.

Nasir L, Gault E, Campbell S, Veeramalai M, Gilbert D, McFarlane R, Munro A, Argyle DJ., Isolation and expression of the reverse transcriptase component of the *Canis familiaris* telomerase ribonucleoprotein (dogTERT), *Gene*. Jul 7;336(1):105-13, 2004.

Nasir L, Devlin P, Mckevitt T, Rutteman G, Argyle DJ. Telomere lengths and telomerase activity in dog tissues: a potential model system to study human telomere and telomerase biology. *Neoplasia* 3:351-359. 2001.

Nasir L., Telomeres and telomerase: Biological and clinical importance in dogs. *The Veterinary Journal*. 175: 155–163. 2008.

- Nelson DL, Cox MM./çeviri editörü Kılıç N. Lehninger Biyokimyanın İlkeleri. Palme Yayıncılık 3. baskıdan çeviri. 660-676, 2005.
- Oeseburg H., Rudolf a. de Boer, Gilst WH, Harst P., Telomere Biology in Healthy Aging and Disease, Pfluger Arch – Eur J Physiol, 459:259-268, 2010.
- Ohyashiki K, Ohyashiki JH, Nishimaki J, Toyama K, Elbihara Y, Kato H, Wright WE, Shay JW, Cytological detection of telomerase activity using an is situ telomeric repeat amplification protocol assay, Cancer Res 57: 2100-2103,1997.
- Okuyucu A., Bedir A., Özmen ZC., Ratlarda roziglitazon'un telomer dinamiğine etkisinin moleküler yöntemlerle araştırılması, Dergi omü, Vol 28, No 4, 2011.
- Okuyucu A., Bedir A., Özmen ZC., Sprague-dawley cinsi ratlarda telomer uzunluğunun kantitatif PCR ile ölçümü,Deneysel ve Klinik Tıp Dergisi, Journal of Experimental and Clinical Medicine, 28: 168-174, 2011.
- Olovnikov AM. A theory of marginotomy. The incomplete copying of template margin in enzymic synthesis of polynucleotides and biological significance of the phenomenon. J. Theor. Biol., 41, 181–190, 1973.
- Palma M., Parker Aç, Hojjat-Farsangi M., Forster J., Kokhaei P., Hansson L., Osterborg A., Mellstedt H., Telomere length and expression of human telomerase reverse transcriptase splice variants in chronic lymphocytic leukemia, Experimental Hematology, 41:615–626, 2013.
- Peruzzi D., Gavazza A., Mesiti G., Lubas G., Scarselli E., Conforti A., Bendtsen C., Ciliberto G., Monica NL. and Aurisicchio L., A Vaccine Targeting Telomerase Enhances Survival of Dogs Affected by B-cell Lymphoma, Molecular Therapy, vol. 18 no.8, 1559–1567 Aug. 2010.
- Pfaffl MW, A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR,Nucleic Acids Res. May 1;29(9):e45, 2001.
- Polychronopoulou S, Koutroumba P., Telomere length and telomerase activity: variations with advancing age and potential role in childhood malignancies, J Pediatr Hematol Oncol; 26:342-50, 2004.

- Polychronopoulou S, Koutroumba P.,Telomere length variation and telomerase activity expression in patients with congenital and acquired aplastic anemia, *Acta Haematol.*;111(3):125-31, 2004.
- Polymerase Chain Reaction: Detecting the invisible presence of biological weapons and future benefits for mosquito-borne disease surveillance, FLORIDA UNIVERSITY.
- Price LH, Kao HT, Burgers DE.,Linda L. Carpenter, Audrey R. Tyrka, Telomeres and Early-Life Stress: An Overview, *Biological Psychiatry*,Volume 73, Issue 1, 1 January, Pages 15–23, 2013.
- Prowse KR, Greider CW, Developmental and tissue-specific regulation of mouse telomerase and telomere length, *Proc Natl Acad, Sci* 92: 4818–4822, 1995.
- Qi A, Zhou H, Zhou Z, Huang X, Ma L, Wang H, Yang Y, Zhang D, Li H, Ren R, Yang R, Telomerase activity increased and telomere length shortened in peripheral blood cells from patients with immune thrombocytopenia, *J Clin Immunol.* Apr;33(3):577-85, 2013.
- Rahmati-Yamchi M, Zarghami N, Rahbani M, Montazeri A., Plasma Leptin, hTERT Gene Expression, and Anthropometric Measures in Obese and Non-Obese Women with Breast Cancer, *Breast Cancer (Auckl)*.,Mar 1;5:27-35, 2011.
- Riethman, H. Ambrosini, A. Castaneda, C. Finklestein, J. Hu, X.L. Mudunuri,U. Paul, S. Wei, J. Mapping and initial analysis of human subtelomeric sequence assemblies. *Genome Res.* Jan;14(1):18-28, 2004.
- Rojas C, Shippen DE., Telomerase regulation, *Mutat Res.*, Feb 1;730(1-2):20-7. 2012.
- Shay Jerry W., Woodring E. Wright, Role of telomeres and telomerase in cancer, *Seminars in Cancer Biology*, 21,349–353, 2011.
- Shervington A, Patel R, Differential hTERT mRNA processing between young and older glioma patients, *FEBS Lett.* May 28;582(12):1707-10, 2008.

- Simpson DA, Feeney S, Boyle C, Stitt AW. Retinal VEGF mRNA measured by SYBR green I fluorescence: A versatile approach to quantitative PCR, *Mol Vis.*, 5;6:178-83. 2000.
- Tatematsu K, Nakayama J, Danbara M, Shionoya S, Sato H, Omine M, Ishikawa F, A novel quantitative 'stretch PCR assay', that detects a dramatic increase in telomerase activity during the progression of myeloid leukemias, [Oncogene](#) , 13(10):2265-2274, 1996.
- Testorelli C., Telomerase and cancer. *J Exp Clin Cancer Res.*, Jun;22(2):165-9, 2003.
- Thewissen M, Linsen L, Geusens P, Raus J, Stinissen P, Impaired activation-induced telomerase activity in PBMC of early but not chronic rheumatoid arthritis patients, *Immunol Lett.* Sep 15;100(2):205-10, 2005.
- Tozkır H., Kronik Lenfositik Lösemili Hastalarda Telomer Uzunluğunun ve Telomeraz Enzim Aktivasyonunun Sağlıklı İnsan Populasyonu ile Karşılaştırılması, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2006.
- Trentin L, Ballon G, Ometto L, Perin A, Basso U, Chieco-Bianchi L, Semenzato G, De Rossi A., Telomerase activity in chronic lymphoproliferative disorders of B-cell lineage, *Br J Haematol.* Sep;106(3):662-8,1999.
- Tükün A., Akay G., Kutlay NY., Telomere and telomerase in hematological malignancies, *Turk J Hematol*; 23:77-83, 2006.
- Uzun S, Gökçe S, Wagner K., Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene mutations in infertile males with congenital bilateral absence of the vas deferens, *Tohoku J Exp Med.* Dec;207(4):279-85, 2005.
- Venkatesan RN., Price C., Telomerase expression in chickens: Constitutive activity in somatic tissues and down-regulation in culture, *Current Issue* , vol. 95 no. 25, 1998.
- Wang Z, Ramin SA, Tsai C, Lui P, Ruckle HC, Beltz RE, Sands JF, Slattery CW, Evaluation of PCR-ELISA for determination of telomerase activity in prostate

- needle biopsy and prostatic fluid specimens, *Urol Oncol.* Sep-Oct;7(5):199-205, 2002.
- Wenz C, Enenkel B, Amacker M, Kelleher C, Damm K and Lingner J. Human telomerase contains two cooperating telomerase RNA molecules. *EMBO J.*, 20(13): 3526-3534,2001.
- Wong ML, Medrano JF., Real-time PCR for mRNA quantitation, *Biotechniques*, 39(1):75-85, 2005.
- Xu Q, Parks CG, DeRoo LA, Cawthon RM, Sandler DP, Chen H. Multivitamin use and telomere length in women. *Am J Clin Nutr.* 6:1857-1863, 2009.
- Yajima T, Yagihashi A, Kameshima H, Kobayashi D, Furuya D, Hirata K, Watanabe N Quantitative reverse transcription-PCR assay of the RNA component of human telomerase using the TaqMan fluorogenic detection system, *Clinical Chemistry* 44(12): 2441-2445,1998.
- Yamada O, Oshimi K, Motoji T, Mizoguchi H, Telomeric DNA in normal and leukemic blood cells, *J Clin Invest.* Mar;95(3):1117-23, 1995.
- Yazawa M, Okuda M, Setoguchi A, Iwabuchi S, Nishimura R, Sasaki N, Masuda K, Ohno K, Tsujimoto H., Telomere length and telomerase activity in canine mammary gland tumors, *Am J Vet Res.*, Oct;62(10):1539-43, 2001.
- Zavlaris M, Angelopoulou K, Vlemmas I, Papaioannou N., Telomerase reverse transcriptase (TERT) expression in canine mammary tissues: a specific marker for malignancy?, *AnticancerRes.*, Jan; 29(1):319-25, 2009.
- Zhang JD, Ruschhaupt M, Biczok R., ddCt method for qRT-PCR data analysis, <http://www.bioconductor.org>, October 14, 2013.

ÖZGEÇMİŞ

1987 yılında Aydın'da doğdu. Eğitimini sırasıyla Ali Akatlar İlköğretim Okulu, Buca Lisesi ve Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı'nda 2010 yılında tamamladı. Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalı'nda 2011 yılında yüksek lisans eğitimine başladı. Adnan Menderes Üniversitesi Uygulama ve Araştırma Hastanesi'nde Mikrobiyoloji laboratuvarında 2011 yılında çalışmaya başlamıştır ve halen çalışmaktadır.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşp her türlü yardımı ve desteğini esirgemeyen değerli hocam ADÜ Veteriner Fakóltesi Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Funda KIRAL'a, Anabilim Dalı Öğretim Üyeleri Prof.Dr. Ayşegöl Günay BİLDİK'e, Doç. Dr. Pınar Alkım ULUTAŞ'a, tez savunmam sırasında katkılarından dolayı Doç. Dr. Hasret Demircan YARDİBİ'ne, deneylerim sırasında her türlü yardımı canı gönülden sağlayan Araş. Gör. Gamze EKREN ve yüksek lisans öğrencisi Selçuk Adıyaman ERTÜRK'e sonsuz teşekkür ederim.

Ayrıca her zaman yanımda olan ve beni destekleyen sevgili aileme ve arkadaşlarıma teşekkürü bir borç bilirim.