

**MEMELİKLERİNDEN SİSTEMLERİNDE TİP 60 GENİKLİK
KARAKTERİZASYONU**

Harun BUDAK

DOKTORA TEZİ

KİMYA ANABİLİM DALI

Prof. Dr. Mehmet ÇETKİ

Prof. Dr. Gregor EICHELE

2009

Her hakkı saklıdır.

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

**MEMELİLER KADIN SİSTEMİNDE TİP 60 GENİNİN
KARAKTERİZASYONU**

Harun BUDAK

KİMYA ANABİLİM DALI

ERZURUM

2009

Her hakkı saklıdır

Prof. Dr. Mehmet ÇİFTÇİ danışmanlığında, Prof. Dr. Gregor EICHELE ortak danışmanlığında, Harun BUDAK tarafından hazırlanan bu çalışma 14 / 08 / 2009 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Kimya Anabilim Dalı'nda Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Ö. İrfan KÜFREYİOĞLU

İmza: 

Üye : Prof. Dr. Gregor EICHELE

İmza: 

Üye : Prof. Dr. Mehmet ÇİFTÇİ

İmza: 

Üye : Doç. Dr. Münir OKTAY

İmza: 

Üye : Doç. Dr. Şükrü BEYDEMİR

İmza: 

Üye : Doç. Dr. T. Abdulkadir ÇOBAN

İmza: 

Üye : Yrd. Doç. Dr. Halis ŞAKİROĞLU

İmza: 

Yukarıdaki sonucu onaylarım

Prof. Dr. Ömer AKBULUT

Enstitü Müdürü

ÖZET

Doktora Tezi

MEMELİLERDE SİRKADİAN SİSTEMİNDE TIP60 GENİNİN KARAKTERİZASYONU

Harun BUDAK

Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Mehmet ÇİFTÇİ

Ortak Danışman: Prof. Dr. Gregor EICHELE

Memelilerde, ventral hipotalamusun suprakiazmatik (SCN) çekirdeğinde konumlanmakta olan merkez ritim düzenleyici, sirkadian (~24 saat) ritimler ile davranış ve fizyolojiyi kontrol eder. SCN saat, ışık/karanlık döngüsünden gelen dâsal etkilerin retinadan yansıtılması vasıtasıyla ayarlanır. Bu saat vücuda yayılmakta olan periferik saatleri hormonal ve nöronal sinyaller ile senkronize eder. Moleküler düzeyde sirkadian saatler, saat genlerini içeren transkripsiyonel/translasyonel feedback döngüsü (TTLs) tarafından kontrol edilir. Bu proteinlerin ürünleri geribesleme ile kendi transkripsiyonlarını kontrol ederler. Asetilasyon ile saat proteinlerinin modifikasyonu, saat mekanizmasının salınımının devamı için kritik rol oynamaktadır. Histon asetiltransferaz (HATs) MYST protein ailesinin bir üyesi olan Tip60, metabolizmada DNA tamiri ve apoptozis gibi birçok fonksiyonu olduğu bilinmesine karşın, sirkadian sistemdeki rolü hakkında bilinenler çok azdır. Sirkadian (TTLs) döngüsünün ana düzenleyici proteinlerinden biri olan cryptochrome 1 protein (CRY1) ile Tip60 proteinin ilişkisi tarafından gösterildi. SCN-spesifik Tip60 nakavt fareler ve Cry1-/-Tip60+/- ikili mutant fareler kullanılarak Tip60'ün sirkadian sistemdeki davranışsal düzenlemelerdeki fonksiyonel rolü araştırıldı. Elde ettiğimiz ilk verilere göre, sirkadian ritmin sürdürülebilmesi için Tip60'ün varlığı elzem olduğu önerildi.

2009, 120 sayfa

Anahtar Kelimeler: Suprakiazmatik çekirdek, Sirkadian ritim, Histon asetiltransferaz, Tip60, Cry1

ABSTRACT

PhD Thesis

CHARACTERIZATION OF TIP60 GENE IN THE MAMMALIAN CIRCADIAN SYSTEM

Harun BUDAK

Atatürk University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Chemistry

Supervisor: Prof. Dr. Mehmet ÇİFTÇİ

Co-Supervisor: Prof. Dr. Gregor EICHELE

In mammals, a central pacemaker located in the suprachiasmatic nuclei (SCN) of the ventral hypothalamus, controls circadian (~24 hrs) rhythms in behavior and physiology. The SCN clock is entrained by the external light/dark cycle via direct projections from the retina. It synchronizes peripheral clocks throughout the body by both humoral and neuronal signals. On the molecular level, circadian clocks are governed by transcriptional/translational feedback loops (TTLs) involving a set of clock genes whose protein products feed-back on their own transcription. The modification of clock proteins via acetylation plays a critical role in maintaining the oscillation of the clock machinery. Tip60 is a member of the MYST family of histone acetyltransferases (HATs) with multiple functions in metabolism, DNA repair and apoptosis. However, little is known about its role in the circadian system. We show that Tip60 interacts with cryptochrome 1 protein (CRY1), which is one of the main regulators of the circadian TTL. We used SCN-specific Tip60 knockout mice and Cry1^{-/-}Tip60^{+/-} double mutants to investigate the functional roles of Tip60 in circadian regulation of behavior. Our initial data suggest that Tip60 is essential for the maintenance of circadian rhythmicity.

2009, 120 pages

Keywords: Suprachiasmatic nuclei, Circadian rhythm, Histone acetyltransferase, Tip60, Cry1

TEŞEKKÜR

Doktora tezi olarak sunduğum bu çalışmada Max Planck Enstitüsü Biyofiziksel Kimya, Gen ve Davranışlar Bölümü (Göttingen, Almanya) laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

Ortak danışman olarak doktora çalışmalarımın deneysel kısmının tamamlanması sürecinde bilgi ve tecrübesi ile her zaman beni motive eden, her türlü maddi ve manevi desteğini sağlayan çok değerli Hocam Sayın Prof. Dr. Gregor EICHELE'ye derin minnet ve kükranlarımı sunarım.

Doktora çalışmam süresince bilgi ve tecrübeleriyle her türlü desteğini sağlayan çok değerli Hocam Sayın Prof. Dr. Ö. Kalkan KÜFREVLİOĞLU'na, Danışman Hocam Sayın Prof. Dr. Mehmet ÇETKİ'ye, Sayın Doç. Dr. Münir OKTAY'a derin minnet ve kükranlarımı sunarım.

Çalışmalarında gösterdikleri büyük yardım ve ilgilerinden dolayı Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü Başkan Sayın Prof. Dr. Nurullah SARAÇOĞLU'na ve Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyelerinden, Sayın Prof. Dr. Hasan ÖZDEMİR'e, Sayın Doç. Dr. Kükrü BEYDEMİR'e, Sayın Doç. Dr. Khami GÜLÇİN'e, tüm Kimya Bölümü ve Fen Bilimleri Enstitüsü elemanlarına ayrıca teşekkür ederim.

Deneysel çalışmalarım esnasında değerli katkılarından dolayı Max-Planck Enstitüsü Gen ve Davranış Bölümü (Göttingen) çalışanlarından, Sirkadian Ritim grup lideri Sayın Dr. Henrik OSTER'e, Sayın Dr. Pablo SZENDRO'a, Sayın Dr. Xunlei ZHOU'ya, Sayın Dr. Murat YAYLAOĞLU'na, Sayın Dr. Lars GEFFERS'a, Sayın Dr. Tianyu ZHAO'ya, Sayın Dr. Judit KOVAC'a, Sayın Dr. Gabriela WHELAN'a, Sayın Alexander PROKSCHA'ya, Sayın Silke KIEBLING'e ve değerli arkadaşlarım Sayın Dr. Murat ÇANKAYA, Sayın Ana Martinez HERNANDEZ, Sayın Dr. Nora SZABO, Sayın Nikolai PETKAU, Sayın Volodymyr SHCHERBATYY, Sayın Jana HUSSE,

Sayın Brid BODE, Sayın Dominic LANDGRAF, Sayın Anton SHOSTAK, ve tüm teknik elemanlara teşekkür ederim.

Max Planck Enstitüsü Hücre Biyolojisi bölümünden sevgili arkadaşım Sayın Dr. Ahmet UÇAR, Hayvan evi sorumlusu Sayın Dr. Ulrike Teichmann ve ekibine doktora süresince gösterdik oldukları yardımlardan dolayı teşekkür ederim.

Doktora eğitimim boyunca maddi ve manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen babam Mehmet BUDAK, annem Zeynep BUDAK ve ailemin bütün fertlerine teşekkür ederim.

Harun BUDAK

Ağustos, 2009

KİÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
SİMĞELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	ix
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	x
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ	1
1.1. Sirkadian Sistem	1
1.2. Biyolojik Saat Çekitleri	3
1.3. Biyolojik Saatlerin Faydaları	5
1.4. SCN Yapı ve Organizasyonu	6
1.5. Biyolojik Saatleri Kontrol Eden DNA Kontrol Elementleri	9
1.6. Drosophiladaki Sirkadian Sistem	12
1.7. Memelilerdeki Sirkadian Sistem	14
1.7.1. Pozitif döngü	15
1.7.2. Negatif döngü	15
1.7.3. Rev-Erb döngüsü	16
1.8. Periferik Saatler	16
1.9. CRY (cryptochrome) Proteinleri	18
1.10. Ökaryotlarda Gen İfadesinin Düzenlenmesi	19
1.10.1. Histon proteinleri	21
1.10.2. HTATİP (TİP60) histon asetiltransferaz	21
1.10.3. Memeli sirkadian sisteminde TİP60 proteinin fonksiyonu	23
1.11. Davranış Analizi	24
1.11.1. Işık-karanlık döngüsüne bağlı ritmik döngü	26
1.11.2. Serbest ritim	27
1.11.3. Aktogram	28
1.11.4. Işık-gece faza yansıma eğrisi	29
1.11.5. Davranış analizinde kullanılan yöntem ve terimler	30

2. KAYNAK ÖZETLERİ	32
3. MATERYAL ve YÖNTEM	37
3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Materyaller	37
3.2. Yararlanılan Alet ve Cihazlar	40
3.3. Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması	41
3.4. Spesifik Genler İçin İnternet Kullanılarak Primer Dizaynı	44
3.5. RNA İzolasyonu	46
3.6. cDNA Kütüphanesi Hazırlanması (RT PCR)	48
3.7. Tip60 Geni İçin cDNA Probenin Hazırlanması	49
3.8. Jel Ekstraksiyon Kiti ile Saflaştırma Protokolü	50
3.9. PCR Saflaştırma Kiti ile Uygulanan Saflaştırma Protokolü	51
3.10. Antisens mRNA Üretimi	52
3.11. <i>In situ</i> Hibridizasyon (ISH) Yönteminin Uygulanması	53
3.12. Gen ekspresyon Örneklerinin Değerlendirilmesi	57
3.13. Southern Blot Analizi	61
3.13.1. Southern blot için fare kuyruğundan genomik DNA izolasyonu	61
3.13.2. Embriyonik kök hücrelerinden (ES cell) genomik DNA eldesi	61
3.13.3. Radyoaktif prob üretimi	62
3.13.4. Restriksiyon enzimi ile genomik DNA'nın kesilmesi (Digestion)	63
3.13.5. Restriksiyon enzimi ile kesilen genomik DNA'nın agaroz jeline yüklenmesi ve membran'a transferi	63
3.13.6. Hibridizasyon	64
3.14. PCR ile Genotipleme	65
3.14.1. Flox, doşal tip, nakavt ve Syt10-Cre genotiplirmede kullanılan PCR karşılaştırmalı ve programı	66
3.14.2. Doşal tip ve mutant Cry1 genotiplirmede kullanılan PCR karşılaştırmalı ve programı	67
3.15. Fare Beyninden Total Proteinin Ekstrakte Edilmesi	68
3.16. Western Blot Tekniğinin Uygulanması	69
3.16.1. SDS-PAGE jelinin hazırlanması ve yüklenmesi	69
3.16.2. Jeldeki proteinin membrana transferi ve film edilmesi	70
3.17. Antikor Geliştirilmesi	71

3.18. Tip60Ex5 Antikorumun Spesifikliğinin Kontrolü	72
3.19. Tip60Nt Antikorumun Saflaştırılması.....	73
3.19.1. Saflaştırılan Antikor İçin Diyaliz Klemi	74
3.19.2. Tip60Nt Antikorumun Spesifikliğinin Kontrolü.....	74
3.20. Antikor ile Doku Boyaması.....	75
3.20.1. Kesitlerin fikse ve dehidre edilmesi	75
3.20.2. Slaytların floresan olarak boyanması.....	76
3.21. İmmunopresipitasyon (antikor ile çöktürme.....	77
3.21.1. İmmunopresipitasyon için fare beyninden total proteinin ekstrakte edilmesi.....	77
3.21.2. İmmunopresipitasyon protokolü	77
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	79
4.1. Alternatif Splicing Sonucu Tip60b'nin ekzon5'i Kaybettiğinin RT-PCR ile Gösterilmesi	79
4.2. Antikor ile İlgili Çalışmalar.....	82
4.2.1. Tip60Ex5 antikorumun spesifikliğinin kontrolü.....	84
4.2.2. Tip60Nt antikorumun saflaştırılması.....	85
4.2.3. Saflaştırılan Tip60Nt antikorumun spesifikliğinin kontrolü.....	86
4.2.4. Beyin dokusunda ve beynin SCN kısmında Tip60 protein ekspresyonunun farklı zaman birimlerinde incelenmesi	87
4.2.5. İmmunopresipitasyon	90
4.2.6. Antikor ile doku boyama	91
4.3. Tip60 geni için <i>In Situ</i> hibridizasyon sonuçları.....	93
4.4. Nakavt Fare Dizaynı.....	95
4.4.1. Neomycin antibiyotik direnç marker geninin genomdan silinmesi ve Tip60 ^{Flox/Flox} fare hattının elde edilmesi	99
4.4.2. Heterozigot Tip60 (Tip60 ^{+/-}) farelerinin elde edilmesi	100
4.4.3. SCN'de spesifik kontrollü nakavt farelerinin elde edilmesi.....	101
4.4.4. Cry1 ^{-/-} Tip60 ^{+/-} farelerinin elde edilmesi	102
4.5. Davranış Analizi Sonuçları.....	103
4.5.1. Tip60 ^{+/-} , Cry1 ^{-/-} , Cry1 ^{-/-} Tip60 ^{+/-} ve doğ al tip fareler için yapılan davranış analizi sonuçları.....	103

4.5.2. SCNöe spesifik kontrollü nakavt fareleri için yapıdan davranış analizi	
Sonuçlarē.....	108
4.5.3. Davranış analiz deneyinde fenotip gösteren Tip60;Syt10-Cre fareleri	
için yapıdan antikor ile doku boyamasē sonuçlarē.....	110
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	112
KAYNAKLAR.....	115
ÖZGEÇMİŞ.....	121

ŞİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

ACTH	Adrenokortikotropik hormon
cDNA	Komplementer DNA
Cry1	Cryptochrome 1
dd H ₂ O	Didestile su
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
GH	Gonadotropik hormon
IK12:12	12 saat ışıık faz, 12 saat karanlık faz
ISH	<i>In situ</i> hibridizasyon
İP	İmmunopresipitasyon
LH	Luteinleştirici hormon
mRNA	Messenger RNA
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
PK	Proteinaz K
RT-PCR	Revers transkriptaz PCR
SA	Sürekli aydınlık
SCN	Suprakiazmatik çekirdek
SK	Sürekli karanlık
Tip60	Tat-inteaktif protein 60 kDa
Tris	Trihidroksimetil aminometan
Ú	Periyot

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1.	İki biyolojik fonksiyonun faaliyetleri arasında gözlenen faz ilişkileri ve faaliyet özellikleri	2
Şekil 1.2.	SCN Yapısı.....	7
Şekil 1.3.	Memelilerin endokrin sisteminin sirkadian saat tarafından düzenlenmesi	8
Şekil 1.4.	DNA kontrol elementlerinin organizasyonu	9
Şekil 1.5.	Drosophiladaki merkezi sirkadian döngü	13
Şekil 1.6.	Memelilerdeki merkezi sirkadian döngü	14
Şekil 1.7.	Periferik saatlerin organizasyonu	17
Şekil 1.8.	Sirkadian genlerine HAT aktivitesi	24
Şekil 1.9.	Davranış analizlerinde kullanılan ve çevresel etkenlerden izole edilmiş kabin	25
Şekil 1.10.	Davranış analizlerinde kullanılan kafesler	25
Şekil 1.11.	Sirkadian ritim salınımın matematik olarak gösterilmesi	28
Şekil 1.12.	Lokomotor aktivitenin (Wheel running activity) matematik olarak gösterilmesi	29
Şekil 1.13.	İkinci fazda yansıma eğrisi.....	30
Şekil 1.14.	Doğal tip fare için lokomotor aktivitenin gösterildiği aktogram.....	31
Şekil 3.1.	Sagittal ve koronal beyin kesitleri	58
Şekil 3.2.	14,5 Günlük fare embriyosu kesitleri 1	59
Şekil 3.3.	14,5 Günlük fare embriyosu Kesitleri 2.....	60
Şekil 3.4.	Western Blot Tekniğinin matematik şeması.....	71
Şekil 3.5.	Antikor üretiminde kullanılan Tip60 proteininin amino asit dizilimi	72
Şekil 4.1.	Ekzon 5'in alternatif splicing sonucu silindiğini göstermek amacıyla dizayn edilen primerlerin konumları.....	79
Şekil 4.2.	F3, R3 ve R4 primerleri kullanılarak yapılan PCR sonucu	80
Şekil 4.3.	F1, F2, R1 ve R2 primerleri kullanılarak elde edilen PCR sonucu	80
Şekil 4.4.	Ekson 5, Forward Primerler, Revers Primerler	81
Şekil 4.5.	İki farklı tavşan için üretilen Tip60Nt antikorunun sonuçları.....	82

Şekil 4.6.	İki farklı tavşan için üretilen Tip60Ex5 antikorunun sonuçları.....	83
Şekil 4.7.	Tip60Ex5 Antikoru, Tip60Ex5 GST füzyon proteini ile bloklanması.....	85
Şekil 4.8.	Tavşan 2'den üretilen Tip60Nt antikoru için yapılan saflaştırma işleminin Western Blot ile kontrolü.....	86
Şekil 4.9.	Tip60Nt Antikoru, Tip60 proteinin N-terminal ucuna spesifik peptid ile bloklanması.....	87
Şekil 4.10.	Tip60Ex5 Antikoru kullanılarak Tip60 protein ekspresyonunun gün içindeki değişiminin beyin dokusunda gösterilmesi.....	88
Şekil 4.11.	Tip60Ex5 Antikoru kullanılarak Tip60 protein ekspresyonunun gün içindeki değişiminin SCN dokusunda gösterilmesi.....	88
Şekil 4.12.	Western Blot metodu ile beyin dokusunda farklı zaman birimlerinde kantitatif analizi yapılan Tip60 protein ekspresyon değerlerinin β - aktin proteinine karşı normalize edilip grafik olarak gösterilmesi.....	89
Şekil 4.13.	Western Blot metodu ile SCN dokusunda farklı zaman birimlerinde kantitatif analizi yapılan Tip60 protein ekspresyon değerlerinin β - aktin proteinine karşı normalize edilip grafik olarak gösterilmesi.....	89
Şekil 4.14.	Tip60 proteininin Cry1 proteini ile ilişkisinin gösterildiği IP sonucu.....	91
Şekil 4.15.	Koronal OCT Beyin Kesitlerinde Tip60 Protein Ekspresyonunun Tip60Ex5 Antikoru ile tespiti	92
Şekil 4.16.	Koronal OCT Beyin Kesitlerinde Tip60 Protein Ekspresyonunun Tip60Nt Antikoru ile tespiti.....	92
Şekil 4.17.	14,5 günlük fare embriyosu için yapılan <i>ISH</i> analiz sonuçları.....	94
Şekil 4.18.	Yetimkin fare beyni için yapılan <i>ISH</i> analiz sonuçları.....	94
Şekil 4.19.	Değişik zamanlardaki fare embriyoları için yapılan <i>ISH</i> analiz sonuçları.....	95
Şekil 4.20.	Tip60 doğal tip alleli ve kontrollü nakavt fare eldesi için dizayn edilen Tip60 nakavt vektörü.....	96
Şekil 4.21.	Homolog rekombinasyon (Homologous Recombination) basamağının Southern Blot metodu ile kontrolü	97
Şekil 4.22.	Etki hücre hattı transformasyonu (germ line transmission) basamağının Southern Blot metodu ile kontrolü	98

Şekil 4.23.	Ekleme hücre hattı transformasyonu (germ line transmission) basamağına PCR genotiplama metodu ile kontrolü	98
Şekil 4.24.	Neomycin antibiyotik direnç marker geninin farelerin genomundan silme için izlenen çaprazlama stratejisi	100
Şekil 4.25.	Heterozigot Tip60 fare elde edilmesinde izlenen çaprazlama stratejisi ...	101
Şekil 4.26.	SCN spesifik kontrollü nakavt farelerinin elde edilmesinde kullanılan çaprazlama stratejisi.....	102
Şekil 4.27.	Cry1 ^{-/-} Tip60 ^{+/-} Farelerinin elde edilmesinde kullanılan çaprazlama stratejisi	103
Şekil 4.28.	Doğal tip (DT) fare için yapılan davranış analizi sonucunun aktogram olarak ifadesi	105
Şekil 4. 29.	Cry1 nakavt fare için yapılan davranış analizi sonucunun aktogram olarak ifadesi	105
Şekil 4. 30.	Heterozigot Tip60 fare için yapılan davranış analizi sonucunun aktogram olarak ifadesi.....	106
Şekil 4. 31.	Cry1 ^{-/-} Tip60 ^{+/-} nakavt fare için yapılan davranış analizi sonucunun aktogram olarak ifadesi.....	106
Şekil 4.32.	Tip60 ^{+/-} , Cry1 ^{-/-} , Cry1 ^{-/-} Tip60 ^{+/-} ve Doğal Tip Fareler için periodogram ve faz kayması grafikleri	107
Şekil 4. 33.	SCN spesifik Tip60 kontrollü nakavt fareler için yapılan davranış analizi sonucunun aktogram olarak ifadesi.....	108
Şekil 4. 34.	SCN spesifik Tip60 kontrollü nakavt fareler için yapılan davranış analizi sonucunun aktogram olarak ifadesi.....	109
Şekil 4. 35.	SCN spesifik Tip60 kontrollü nakavt fareler ve doğal tip fareler için yapılan davranış analizi sonucunun aktogram olarak ifadesi.....	109
Şekil 4. 36.	Tip60;Syt10-Cre fare beyinlerinden hazırlanan koronal OCT beyin kesitleri için yapılan doku boyama sonuçları.....	111

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1.	Temel biyolojik saat çeşitleri	4
Çizelge 1.2.	Kısa gözlenen ritim örnekleri	4
Çizelge 1.3.	Kısa 24 saat içerisinde faaliyet gösteren önemli sirkadian olaylar	5
Çizelge 1.4.	Memelilerdeki sirkadian saat genleri	11
Çizelge 1.5.	Memelilerdeki sirkadian saati regüle edici enzimler	12
Çizelge 1.6.	Drosophiladaki sirkadian sistemde görev alan genler ve proteinleri	12
Çizelge 1.7.	Zeitgeber zaman biriminin hesaplanması	27
Çizelge 3.1.	Kullanılan kimyasal maddeler ve materyaller	37
Çizelge 3.2.	RNA izolasyonu ve DNA parçalamak için hazırlanan karışım	47
Çizelge 3.3.	Belirli bir cDNA için yapılan PCR reaksiyon karışımı	50
Çizelge 3.4.	Belirli bir antisens mRNA üretimi için hazırlanan karışım	52
Çizelge 3.5.	DNA'yı sindiren DNaz karışımı	52
Çizelge 3.6.	Genomik DNA'nın kesilmesi için hazırlanan karışım	63
Çizelge 3.7.	PCR ile genotiplemede kullanılan primerler ve template uzunlukları	65
Çizelge 3.8.	PCR ile flox, doşal tip, nakavt ve Syt10Cre genotiplemek için hazırlanan karışım	66
Çizelge 3.9.	PCR ile doşal tip ve mutant Cry1 genotiplemek için hazırlanan karışım	68
Çizelge 3.10.	SDS-PAGE jel elektroforezi için kullanılacak ayırma jeli değerleri	69
Çizelge 3.11.	SDS-PAGE Jel Elektroforezi için Kullanılacak Yükleme Jeli Değerleri	70
Çizelge 4.1.	RT-PCR da kullanılan primerler	79

1. GİRİŞ

1.1. Sirkadian Sistem

Dünya üzerindeki yaşam günlük değişimlerin etkisi altındadır. Dünyadaki tüm canlıların hayatta kalabilmek için yaşadığı ortamdaki tüm değişikliklere adapte olması gerektiğinden davranışsal ve fizyolojik cevaplar geliştirmek zorundadırlar. Fizyolojik ve davranışsal tepkilerin 24 saatlik zaman aralıklarında tekrarlanmasına günlük döngü (sirkadian) denir. Latin kökenli bir kelime olan *circa* döngü anlamına gelir, *dies* ise gün anlamındadır (Dunlap 1999; Panda *et al.* 2002; Storch *et al.* 2002). Memelilerdeki kalp atışı uyuma ve kalkma döngüsü, bağışıklık sistemi ve metabolizmadaki fonksiyonlar gibi çoğu fizyolojik süreç sirkadian sistemin kontrolü altında gerçekleşir (Sensi 1993).

Biyolojik saatler en basit canlıdan insana kadar gelişim ve değişim göstermiştir ve amacı canlıların yaşamdan maksimum verim alabilmesini sağlamak için düzenli olan çevresel değişimleri önceden sezinleyip vücudu senkronize etmektir (Rensing *et al.* 2001). İnsanların yanında diğer canlıların da yaşadığı atmosferik çevre ile uyum içinde hayatlarını devam ettirdiğini gözlemlemekteyiz. Atmosferik çevre değiştiğinde, doğadaki her canlı gibi insan vücudunda da değişimler meydana gelir. Vücut kimyası gün boyunca bir programa ayak uydurur biçimde artan veya azalan ritmik değişikliklere uğrar. İnsanların kendini uyanık, uykulu, dikkatsiz, yorgun ya da zinde hissettiği saatler vardır. Örneğin sabahları bakış açisi değişebilir, öğleden sonraları uykunuz gelebilir, ilkbaharda kendinizi daha canlı ve zinde hissedersiniz; ama sonbaharda yorgun ve huzursuz olursunuz. Mevsimler değiştiğinde, doğadaki her canlı gibi insan vücudunda da değişimler meydana gelir (Eldebirani 2003).

1729 yılında Fransız gökbilimci Jean-Jacques Dortous de Mairan'ın gözlemlediği *Mimosa* bitkisinin yapraklarının yaklaşık 24 saatlik zaman diliminde gündüz açılıp gece kapanması ile başlayan biyolojik ritim araştırmaları kronobiyoloji biliminin oluşmasına

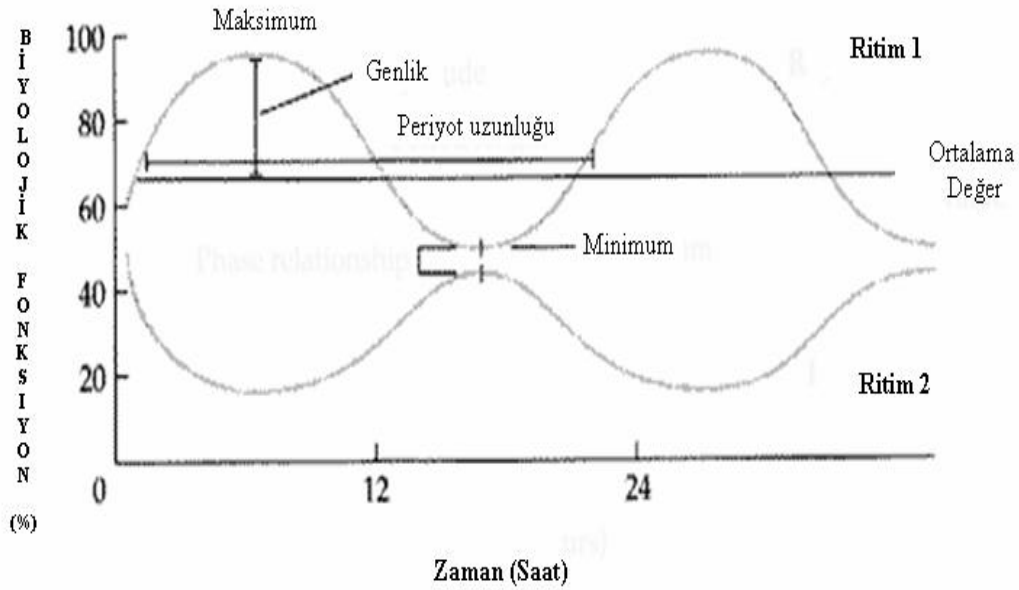
sebepler olmuştur. Kikinin biyolojik vücut ritimlerini inceleyerek, bu tip durumları açıklayan bilim dalına kronobiyoloji denilmektedir. Kronos-zaman; bios-yakam; logos-bilim anlamına gelmektedir (Pittendrigh 1993). Kronobiyoloji, biyolojik ritimlerle ilgilenir. Genel olarak ritim, periyot, sıklık, büyüklük ve faz gibi özellikler gösteren, tekrarlayıcı karakterdeki olaylar olarak tanımlanabilir. Ritimlerin bu özelliklerinin kısaca tanımlarına ise,

PERİYOD: Ritmin bir döngüsü için geçen zaman.

SİKLİK (Frequency): Birim zamanda tekrarlanan döngü sayısı

GENLİK (Amplitude): Ortalama değerden sapma miktarı

EVRE (Phase): Ritmin kendine has özellikler gösteren kısmı (Şekil 1.1).



Şekil 1.1. İki biyolojik fonksiyonun faaliyetleri arasında gözlenen faz ilişkileri ve faaliyet özellikleri (Bunney 2000; Eldebiran 2003).

Biyolojik ritimlerin içsel bir mekanizma mı yoksa kendisini çevresel işaretlere göre ayarlayabilen bir sistemmi olduğunu anlamak için *Mimosa* bitkisi tamamen doğrudan ortama göre farklı karanlıkta sürekli olduğu, çevresel işaretlerden izole edilmiş, laboratuvar ortamında muhafaza edildiğinde, bitkinin yapraklarına açılıp kapatmaya

devam ettiği gözlenmiştir. Niçin bu biyolojik döngü devam etmiştir? Böylece bitkinin bu döngüsünün sadece ışığa bağımlı olmadığı aynı zamanda içsel bir saatinin olduğu da anlaşılmıştır (Nevo *et al.* 1982).

Canlıların yürüttüğü biyolojik fonksiyonların ritimleri, genellikle çevre şartlarından döngüsel özellikler gösterenlerle eş zamanlı olarak yürür. Eğer bir canlı engelsiz bir şekilde dış ortamla ilişkili ise ve ritimlerini dış dünyadan gelen uyarılara göre düzenleyebiliyorsa, böyle ritimlere, bağlı (entrained) ritimler denir. Bunun yanında, eğer canlı laboratuvar ortamında, çevresel işaretlerden yalıtılmak bir biçimde yetiştirilirse, bu durumda tam olarak çevresel işaretlerle tutarlı olmasa da bir iç ritmi sürdürdüğü görülür. Bu tip ritimlere de serbest (free-running) ritimler denir. Canlıların çevreden aldığı sinyallerin bir kısmı ritimlerini düzenlemesi için bir işaret görevi yapar. Örneğin, ışık ve karanlık, canlıların gece ve gündüz göstereceği faaliyetleri ayarlaması için çevresel bir işaret olarak kullanılır. Bunun gibi çevresel işaretlere, *zeitgeber* (almanca, zeit= zaman, geber= verici) veya "ritim verici" denir. Bu ritim verici faktörler, ayın devri, yılın mevsimleri, güneğin durumu vb. olabileceği gibi, bunların arasında en önemlisi ışıktır. Günlük döngünün çok düzenli olması vücut içinde bir biyolojik saatle kontrol edildiğini gösterir (Pittendrigh 1993; Canan 2001).

1.2. Biyolojik Saat Çeşitleri

Dünyanın dönüğü ile ilişkili olan (Sirkadian) ritme bağlı olarak tıbbi terminolojide sirkaseptan, sirkatrivijintan gibi isimlendirmeler de kullanılmaktadır (Çizelge 1.1 ve 1.2).

Çizelge 1.1. Temel biyolojik saat çekitleri (Bunney 2000; Eldebiran 2003).

Biyolojik saat türü	Süre
Sirkadian (Dünyanın dönüğü)	24 saat 22-26 saat
Ultradian	<20 saat
İnfradian	>28 saat
Sirkaseptan	7±3 gün
Sirkadiseptan	14±3 gün
Sirkavijintan	21±3 gün
Sirkatrivijintan	30±5 gün
Sirkatidal (Gel-gitler)	11-14 saat
Sirkalunar (Ayın evreleri)	26-32 gün
Sirkannual (Yılın mevsimleri)	330-400 gün

Çizelge 1.2. Kısa ve gözlenen ritim örnekleri (Bunney 2000; Eldebiran 2003).

Ritim sıklığı	Fizyolojik ve davranışsal hareketler
Saniyeler mertebesinde	Görme ve iktme gibi sistemler
Dakikalar mertebesinde	Nefes alıp verme, kalp atakları mide hareketleri
Saat mertebesinde	Kan dolaşımına çekitli enzim aktiviteleri
Gün mertebesinde	Yeme, içme, tuvalet ihtiyacı uyuma
Gündelik	Uyku-uyanıklık, vücut sıcaklıklarının dalgalanmaları, yorgunluk-dinçlik, ruh durumu, kan basıncı stres, fiziksel ve zihinsel performans
Aylık	Menstruel döngü, insan ve primatlarda ayın evrelerine menstruel döngünün kilitlenmesi, memeli gebelik süresinde 30 günlük ortak çarpanlar, erkeklerde yaklaşık 21-28 günlük testosteron salınım döngüsü
Senelik	Kısa ve memeli hayvan doğumları SADS (mevsimsel afektif bozukluk sendromu), serebrovasküler kazalar ve solunum kaynaklı ölümler, ani bebek ölümleri, kazalar, hastalıklar, cinayet, intihar.

1.3. Biyolojik Saatlerin Faydalarē

Biyolojik saatlerin faydalarēnē genel olarak iki madde olarak özetleyebiliriz.

- Canlēnē faaliyetlerinin çevresi ile uyumlu halde süregitmesi
- Etkin iklēv için, iç mekanizmalarē ek zamanlē çalāxtāđabilmesi.

Yapđan çalāmalarda gün içinde insanlarē doğ al olarak bazē biyolojik faaliyetlerinin artēp artmadēđnē araktāđmasē yönünde çalāmalar devam etmektedir. Çizelge 1.3de elde edilen bazēbulgular verilmiktir (Canan 2001).

Çizelge 1.3. Kısanda 24 saat içerisinde faaliyet gösteren önemli sirkadian olaylar.

06:00	Kortizon salgđđnmasēyla organizma uyanē. Metabolizma hareketlenerek günün iklēri için enerji ve proteini kullanēna sunar.
07:00	Vücut hala zayıf safhadadē. Bu nedenle spor yapmaktan kaçāđmalē Böylece kalp ve dolakēna gereksiz yere yüklenilmik olur. Sindirim organlarē bu saatte iyi çalāxtā, güzel bir kahvaltē için iyi bir zaman
08:00	Nikotinin sağ lē a en fazla zarar verdiğ i saattir. Kahvaltē sigarasē damarlarē her zamankinden daha da fazla daraltē.
09:00	Vücudun kuvvetli olduğ u saattir. Kā ne olacaksanız veya röntgen çektiyorsanız en uygun zaman.
10:00	Vücut en yüksek ēēēna ulakmāxtā, verimlilik en üst düzeydedir. Bellek yaratēēve dinamiktir, fakat 10.00-12.00 arasē enfarktüse sēk rastlanē.
11:00	Vücudun tam formunda olduğ u saat. Zihin hēzlē çalāxtā ve özellikle hesap iklēri zorlanmadan yapđabilir.
12:00	Dikkat azalē, uyku basar. Midedeki asit fazlalakā, beyindeki kan azalē.
13:00	Vücut formdan dūkmūktir. Verimlilik gün ortalamasēnē % 20 altēndadē.
14:00	Tansiyon ve hormon düzeyi dūktūđ ünden bitkinlik hissedilir. Bu saatte acē daha az hissedilir.
15:00	Enerji geri gelmiktir, bellek tam formundadē. Sabahkinden az olmakla birlikte ikinci verimliliğ e yaklakā.
16:00	Spor için en iyi saat. Tansiyon ve dolakēn çok iyi durumdadē. Mide asidini önleyici ilaçlarē etkisi bu saatte daha verimlidir.
17:00	Organlarē faaliyetleri üst düzeydedir. Vücut direnci artar. Böbrekler dolayēē ile mesane çok iyi çalāxtā. Akşamüstü midedeki asit miktarē fazlalakā. 17'ye doğ ru mide kanamasē geçirme riski artar.
18:00	Akşam yemeğ i için iyi bir saattir. Pankreas özellikle aktiftir. Karaciğ er alkole karkē her zamankinden daha dayanēklē sayđē.

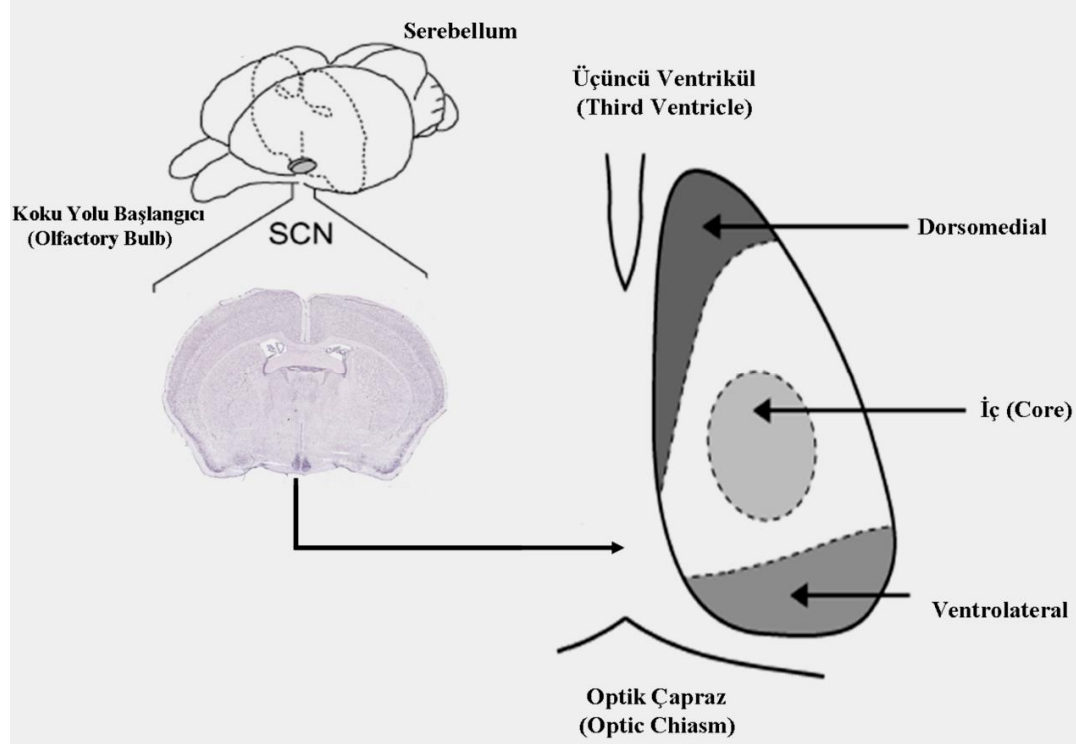
Çizelge 1.3. (devam)

19:00	Tansiyon ve nabız tembelleşir bu nedenle, tansiyonu düşüren ilaçlar konusunda dikkatli olunmalıdır. Sinir sistemi üzerinde etkili olan ilaçların tesir derecesi de fazladır.
20:00	Karaciğerdeki yağ düzeyi düşer ve kirli kan kalbe tekrar her zamankinden daha fazla akar. Alerjik ve astım hastalıkları ile ilişkili ilaçlar bu saatte alınmalıdır. Ayrıca antibiyotiklerin etkisi de artar.
21:00	Sindirim organlarının günlük görevi sona erdiğinden bu vakitte yenilen her şey midede sabaha kadar hazmedilmeden kalır.
22:00	Bu vakitten sonra vücut nikotini daha zor atar.
23:00	Tam dinlenme saatidir. Organizmadaki stres hormonu salgılaması durdurulur. Tansiyon ve vücut ısısı düşer.
24:00	Uyku esnasında deri hücreleri durmaksızın çalışır. İlk rüya safhası başlar.
01:00	Vücut kendini uykuya programlar. Dikkat azaldığından bu saatte çalışanların hata yapma olasılığı yüksek ve trafik kazaları artar.
02:00	Görme duyusu ve refleksler zayıflar. Bu nedenle trafik kazalarının çoğu bu saatte olur. Vücut soğumuş ve kardiyo-vasküler hassastır.
03:00	Melatonin hormonunun salgılanması tembelletir, kararsız yapar. Melankolik hissetme artar ve intihar vakalarına çokça rastlanır.
04:00	Stres hormonundan enerji kazanılır. Enfarktüsler 04.00 - 06.00 arasında özellikle fazlalır. Çünkü tansiyon oldukça fazla yükselir, kalp damarları çabuk gerilir.
05:00	Bu saatte vücuttaki erkeklik hormonu çok fazla salgılanır. Stres hormonu gündüz değerinin 6 katına çıkar. Kaybolan enerji geri gelir.

1.4. SCN Yapısı ve Organizasyonu

SCN (suprakiazmatik çekirdek); beyinin hipotalamusunun ön kısmında yer alan yaklaşık 8000-10000 farklı nöronal elemanlardan oluşan ve her bir nöronal elemanın kendine ait spesifik özelliği olan bir grup sinir hücresi (biyolojik saat merkezi)'dir (Ralph *et al.* 1990). Zamana bağlı davranışların organizasyonunda çok önemli fonksiyonları olan SCN'nin, hipotalamusun tanımlanmasından beri bilinmesine rağmen 1970'li yıllara kadar sirkadian sistemdeki fonksiyonu anlaşılamamıştı 1970'li yıllardan hemen sonra pek çok yapılan çalışmalarda SCN dokusu lezyona uğratılmak memelilerde biyolojik saat fonksiyonlarının kaybolmaya başladığı görülmüştür (Moore and Eichler 1972; Stephan and Zucker 1972).

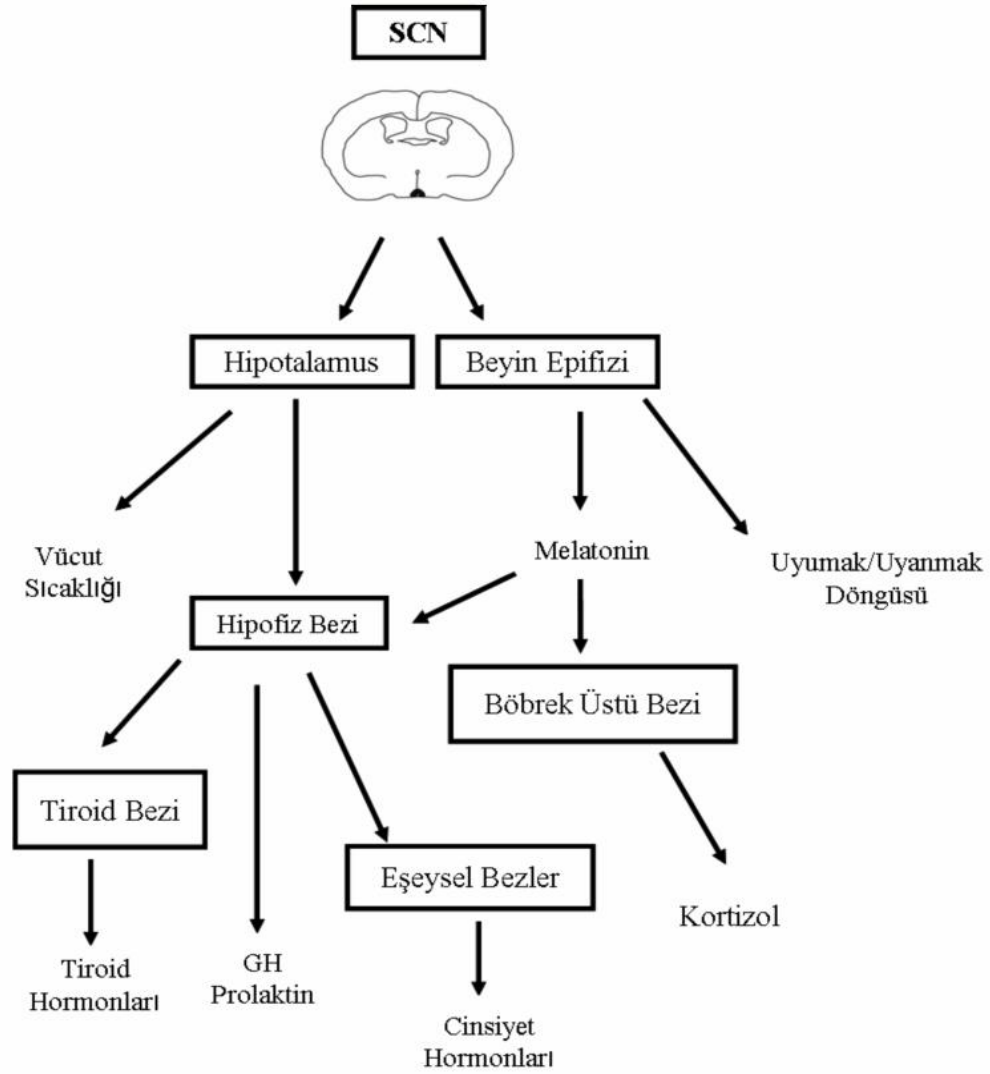
SCN retinadan özel girikler almasıyla yanlında, bakta epifiz bezi olmak üzere bir çok bölge ile iliski içerisinde olan üst saat vazifesi görür (Van Den Pol *et al.* 1992). Bu ünlü biyolojik saat bölgesi uyku, tansiyon, vücut sıcaklığı uyanma gibi birçok yaşam ritmini düzenler (Oster 2002).



Şekil 1.2. SCN Yapısı (<http://www.brain-map.org>, Hirota and Fukada 2004).

SCN sadece biyolojik metabolik olayları iki farklı mekanizma ile koordine eder. Bu mekanizmalar endokrin sistem ve sirkadian ritimin ana enzimlerinin aktivitesinin düzenlenmesi ile ilgilidir (Buijs and Kalsbeek 2001). SCN endokrin sistemi, kısmen beyin epifizinden salgılanan melatonin ile kısmen de hipotalamus yolu ile yönetilir (Schwartz *et al.* 2001). Uyku düzeni sağlayan melatonin seviyesi gece en yüksek değerdedir. Hipofiz bezi üzerinde etkili olan melatonin hormonu, ayrıca böbrek üstü bezinden kortizol hormonunun salgılanmasında ve kontrolünde etkindir. Vücut sıcaklığı gün içindeki değişimlerinden dolayı hipotalamus sorumludur. Hipofiz bezi, gonadotropik hormon (GH), prolaktin, adrenokortikotropik hormon (ACTH) ve

uyarēē endokrin bezlerden salgāama yapāmasēē (yumurtalēklardan cinsiyet hormonlarēēē salgāamasēē gibi) saē lar (Goldman 2001).

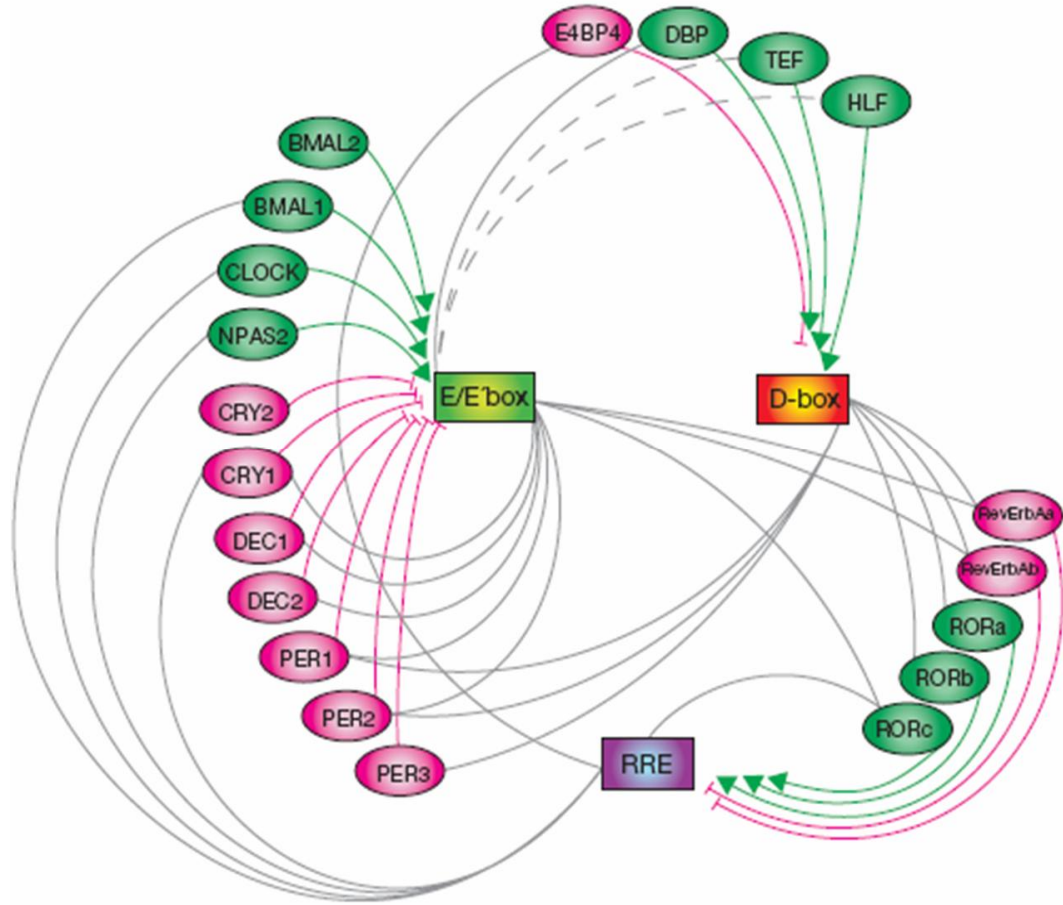


ēekil 1.3. Memelilerin endokrin sisteminin sirkadian saat tarafēēdan dūzenlenmesi (<http://www.rpi.edu/~hrushw/> adresinden modifiye edildi).

Gūnlūk biyolojik ritim tūm canlēlarda oldukēa benzer olmakla birlikte tamamen aynē deē ildir.

1.5. Biyolojik Saatleri Kontrol Eden DNA Kontrol Elementleri

Memelilerdeki davranışsal ve fiziksel sirkadian salınanlar kontrol eden bir üst saat vazifesi gören suprakiazmatik nükleusun kontrolünde olan ve vücudun değişik periferal bölgelerinde fonksiyon gösteren birçok periferal saat mevcuttur. Moleküler düzeyde bu saatler Transkripsiyonel/Translasyonel feed-back döngüsü (TTL) olarak fonksiyon gösterecek şekilde organize olmuştur (Ukai *et al.* 2008).



Şekil 1.4. DNA kontrol elementlerinin organizasyonu (Ukai *et al.* 2008).

Transkripsiyonel döngü, sirkadian sistemin içerdigi 3 farklı saat kontrol DNA elementleri (CCEs) ile en az 20 farklı saat veya saat genleri tarafından kontrol edilen genler tarafından düzenlenmektedir. Günün ilk üçte biri ile birlikte E-box (CACGT[G/T])

DNA elementi, gün boyunca D-box (TTA[T/C]GTAA) DNA elementi ve karanlık (gece) RRE ([A/T]A[A/T]NT[A/G]GGTCA) DNA elementi fonksiyon göstermektedir (Ukai *et al.* 2008).

Transkripsiyon faktörleri, çizelge 1.4. de açıklandığı üzere bHLH (basic-helix-loop-helix) protein yapısına içermektedirler. Bu protein motif yapısına transkripsiyon faktörleri için karakteristik özelliiktir ve E-box DNA elementine bağlanarak downstream genlerinin ekspresyonunu düzenler (Ukai *et al.* 2008).

Nükleotid dizisi olan E-box DNA elementi genellikle genlerin promotor kısmının upstream bölgesine yerleşmiş olarak bulunur. Bu DNA elementinin tek başına ekspresyonlar direkt veya dolaylı olarak en az 11 transkripsiyon faktörü tarafından kontrol edilir. Bu kontrol temel memeli sirkadian sistemi içinde çok kritik fonksiyona sahiptir. D-box ve RRE DNA elementlerinin tek başına transkripsiyonlarda 4-5 transkripsiyon faktörü tarafından kontrol edilmesine rağmen bunların öncelikli fonksiyonu memeli sirkadian döngünün stabilizasyonunu sağlamaktır (Ukai *et al.* 2008).

Çizelge 1.4. Memelilerdeki sirkadian saat genleri (Phillip and Joseph 2004; Monica and David 2007).

	Omurgalē Hayvanlar	Kromozom (Fare/Kısan)	Sēñlāndēma	Fonksiyon	Mutasyon Fenotipi
Pozitif Transkripsiyon Faktörleri	CLOCK	5/4	bHLH-PAS	PAS-Domain transkripsiyon faktörü	4 saat uzun periyot; aritmik (KK)
	BMAL1/MOP3	7/11	bHLH-PAS	PAS-Domain transkripsiyon faktörü ve histon asetiltransferaz	aritmik (KK)
	BMAL2/MOP9	6/12	bHLH-PAS	PAS-Domain transkripsiyon faktörü;BMAL1 paralog	Çalēma yapēmamēk
	NPAS2	1/2	bHLH-PAS	Transkripsiyon faktör; clock paralog	0,2 saat kēsa periyot
Negatif Feed-Back Elementleri	Per 1	11/17	PAS-Domain	PER/CRY etkilekimi, CLOCK:BMAL1 inhibitörü	0-1,1 saat kēsa periyot
	Per 2	1/2	PAS-Domain	PER/CRY etkilekimi, CLOCK:BMAL1 inhibitörü	1,5 saat kēsa periyot, aritmik (DD)
	Per 3?	4/1	PAS-Domain	PER/CRY etkilekimi	0-0,5 saat kēsa periyot
	CRY 1	10/12	Flavoprotein	PER/CRY etkilekimi, CLOCK:BMAL1 inhibitörü	1 saat kēsa periyot
	CRY 2	2/11	Flavoprotein	PER/CRY etkilekimi, CLOCK:BMAL1 inhibitörü	1 saat uzun periyot
	T ~~K~~ M?	10/12	PER- ilişkili	PAS-Domain yapēproteini,PER ile ilişkili olabilir	Homozigot T ~~K~~ M fareler embiryonik dönemde ölüyor
	Rev-ErbaŬ	11/17	Orphan nükler reseptör	BMAL1`nēn inhibitörü	0,4 saat kēsa periyot

Çizelge 1.5. Memelilerdeki sirkadian saati regüle edici enzimler (Phillip and Joseph 2004; Monica and David 2007).

Regüle Edici Enzimler	Omurgalı Hayvanlar	Fonksiyon
	CKI α , β	Protein kinaz
	CKII	Protein kinaz
	GSK3	Protein kinaz
	PP1	Protein fosfataz
	PP2A	Protein fosfataz
	PP5	Protein fosfataz
	β TrCP	SCF Ubiquitin ligazın adaptörü

1.6. Drosophila'daki Sirkadian Sistem

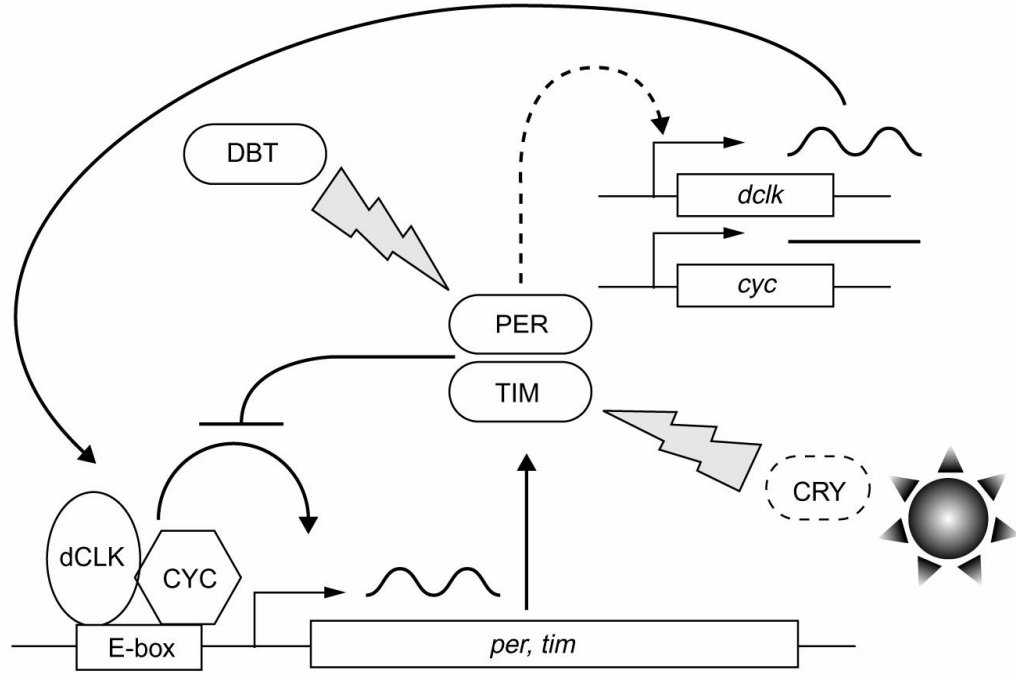
Altı proteinin görev aldığı bu mekanizma bu canlıda iyi bir şekilde açıklanmıştır (Çizelge 1.6).

Çizelge 1.6. Drosophiladaki sirkadian sistemde görev alan genler ve proteinleri

PROTEİN ADI	PROTEİNİN KISA ADI	PROTEİNİN KİMLİĞİ VE FREKANSI
PERIOD	PER	Per
TIMELESS	TIM	Tim
CLOCK	CLK	Clk
CYCLE	CYC	Cyc
DOUBLE TIME	DBT	Dbt
CRYPTOCHROME	CRY	Cry

Sabah ile birlikte güneş ışığı CRY proteini tarafından absorblanır ve bu da hücre sitozolünde CRY proteini ile TIMELESS proteinin bağlanmasıyla sebep olur. Bunun sonucu olarak TIMELESS miktarı azalır. Bu durum sabahın ilk ışığı ile beraber her zaman ayarlanır. Bu esnada çekirdekte TIMELESS ve PERIOD protein genleri transkripsiyona uğrar ve RNA oluşur. Translasyon sonucu eksprese olan proteinler sitoplazmaya taşınır. Bu iki proteinin konsantrasyonu gün boyunca artar. DOUBLE TIME tarafından fosforilasyon ile PERIOD miktarının azalması sağlanır. Sonunda PERIOD ve TIMELESS'in konsantrasyonları kritik düzeye ulaşır ve birbirleriyle ve

dimerleriyle bağlanmaya baklarlar. Bu korunma hücrenin sitozolünden çekirdeğine hareket ile devam eder. Orada CYCLE ve CLOCK bu dimerden uzaklaşır. Bunun sebebi Per ve Tim genlerinin transkripsiyon aktivitesinden CYCLE ve CLOCK'ın korunmasıdır. Bu yüzden PERIOD ve TIMELESS proteinlerinin konsantrasyonlarının kontrolü kendi genlerinin ekspresyonu ile negatif feed-back döngüsü ile sağlanır. Gece esnasında PERIOD ve TIMELESS'in konsantrasyonunda çok düşük azalma olur. Ertesi gün döngü tekrarlanır. Son yıllardaki çalışmada 2. ritmik oscillator sistem hakkında kanılar sunulmuştur. Bu sistem saat (clock) proteinlerinin seviyesini düzenler (Cermakian and Sassone-Corsi 2000) (Şekil 1.5).

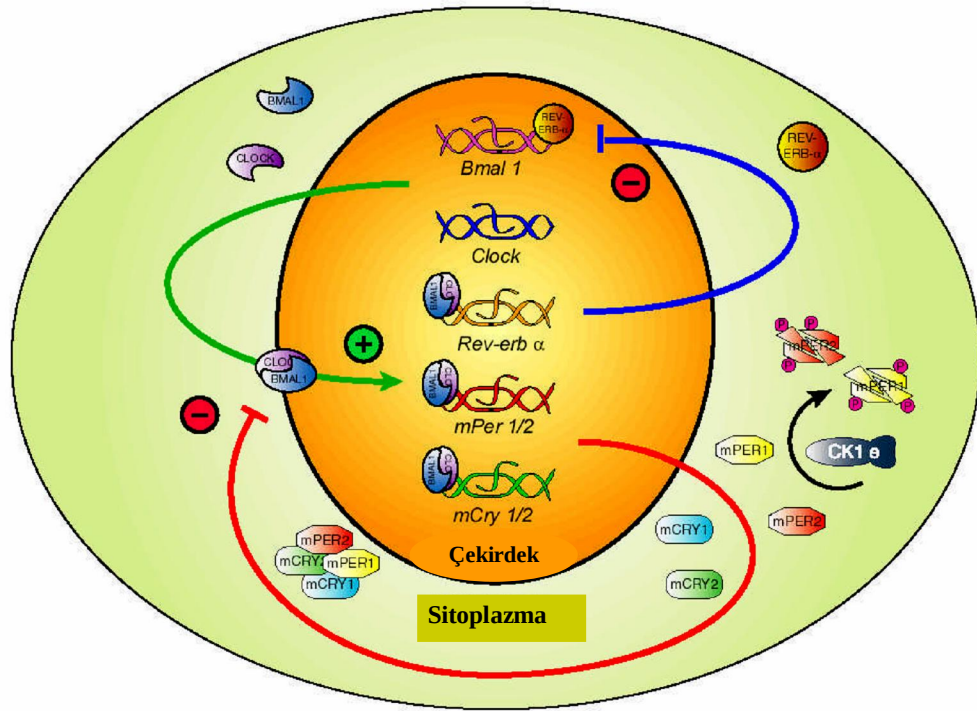


Şekil 1.5. *Drosophila*daki merkezi sirkadian döngü (Ripperger and Schibler 2001).

1.7. Memelilerdeki Sirkadian Sistem

Memelilerde ilk olarak bulunan sirkadian geni CLOCK olarak adlandırıldı (Vitaterna *et. al.* 1994). Şimdiye kadar 11 sirkadian geni tanımlanmıştır. PER1, PER2, PER3, CRY1, CRY2, DEC1, DEC2, CLOCK, BMAL1, REVERB ve ROR.

Birbiri ile ilişkili mRNA ve proteinlerin aralarındaki etkileşimler negatif feed-back döngüsü, pozitif feed-back döngüsü ve Rev-erb transkripsiyonel ve transkript sonrası otomatik düzenleyici döngü olarak tanımlanmıştır (Albercht and Eichele 2003).



Şekil 1.6. Memelilerdeki merkezi sirkadian döngü (Ripperger and Schibler 2001; Albercht and Eichele 2003). Mor renkli daireler CLOCK proteinini, mavi renkli daireler BMAL1 proteinini, sarı renkli daireler PER1, kırmızı renkli daireler PER2 proteinini, mavi renkli daireler CRY1 ve açık yeşil renkli daireler CRY2 proteinini ifade etmektedirler.

Pozitif feedback döngüsünde CLOCK/BMAL1 heterodimeri, Per ve Cry geninin düzenleyici bölgesindeki E-box bölgesine bağlanarak bu genlerin transkripsiyonunu aktive eder. Transkripsiyon sonrasında sitoplazmaya geçen Per ve Cry transkriptleri ribozomda translasyon ile protein formuna dönüştürülür. Sitoplazmadaki Per ve Cry proteinleri çekirdeğe transfer olup CLOCK/BMAL1 heterodimerini inhibe ederek kendi transkripsiyonlarını repress etmeleri ise negatif feed-back döngüsü olarak adlandırılır (Albercht and Eichele 2003).

1.7.1. Pozitif döngü

Üç transkripsiyon faktörü CLOCK, BMAL1, ROR'dan oluşmaktadır. CLOCK (Circadian Locomotor Output Kaput) transkripsiyon faktörü bHLH (basic Helix-Loop-Helix)-PAS (Period-Arnt-Sim) domain transkripsiyon faktörleri enzim ailesindendir. bHLH protein domaini DNA bağlanmalarına izin verir iken, PAS domaini ise bu domaini içeren diğer proteinler ile dimerleşmesini sağlar. Ikeda ve Nomura tarafından 1997 yılında bulunan BMAL1 (Brain and Muscle Arnt Like protein 1) MOP3 olarak da adlandırılabilir. CLOCK ile aynı domain transkripsiyon faktörleri enzim ailesindendir (Gu *et al.* 2000; Kay 1997; Reppert 1998). CLOCK/BMAL1 kompleksi E-box üzerindeki CACGTG promotor nükleotid diziliminden bağlanır (Darlington *et al.* 1998; Gekakis *et al.* 1998; Hogenesch *et al.* 1998; Jin *et al.* 1999; Kume *et al.* 1999). BMAL1 ile BMAL2 (MOP9) yüksek oranda benzerlik gösterirler ve her iki formu da CLOCK ile heterodimer oluşturabilir; ayrıca birlikte E-Box elementinin transkripsiyonunu devam ettirebilirler (Gekakis *et al.* 1998; Hogenesch *et al.* 1998; Hogenesch *et al.* 2000; Honma *et al.* 1998; Ikeda *et al.* 2000; Jin *et al.* 1999; Ripperger *et al.* 2000).

1.7.2. Negatif döngü

PER (PER1, PER2, PER3), CRY (CRY1, CRY2), ve DEC (DEC1, DEC2) gibi üç transkripsiyon faktörü ailesinden oluşmaktadır. PER (Periyot) proteini PAS domainine sahiptir, fakat CLOCK/BMAL1 heterodimerinin aksine bHLH domainine sahip değildir. Ayrıca NLS (Nuclear Localization Signal) ve CLD (Cytoplasmic Localization

Domain) domainlerini de içermektedir. CRY (Cryptochrome) proteini ilk olarak bitkilerde karakterize edilmik flavoproteindir. DEC (Differentially Expressed in Chondrocytes) proteini 2002 yılında Honma ve arkadaşları tarafından bulunmuştur. bHLH transkripsiyon faktörlerini kifleler. Buna karşın PAS domainine sahip değildir. CLOCK ve BMAL ile aynı DNA dizilimlerine bağlanabilmesine rağmen transkripsiyonu aktive edemez (Cermakian and Sassone-Corsi 2000).

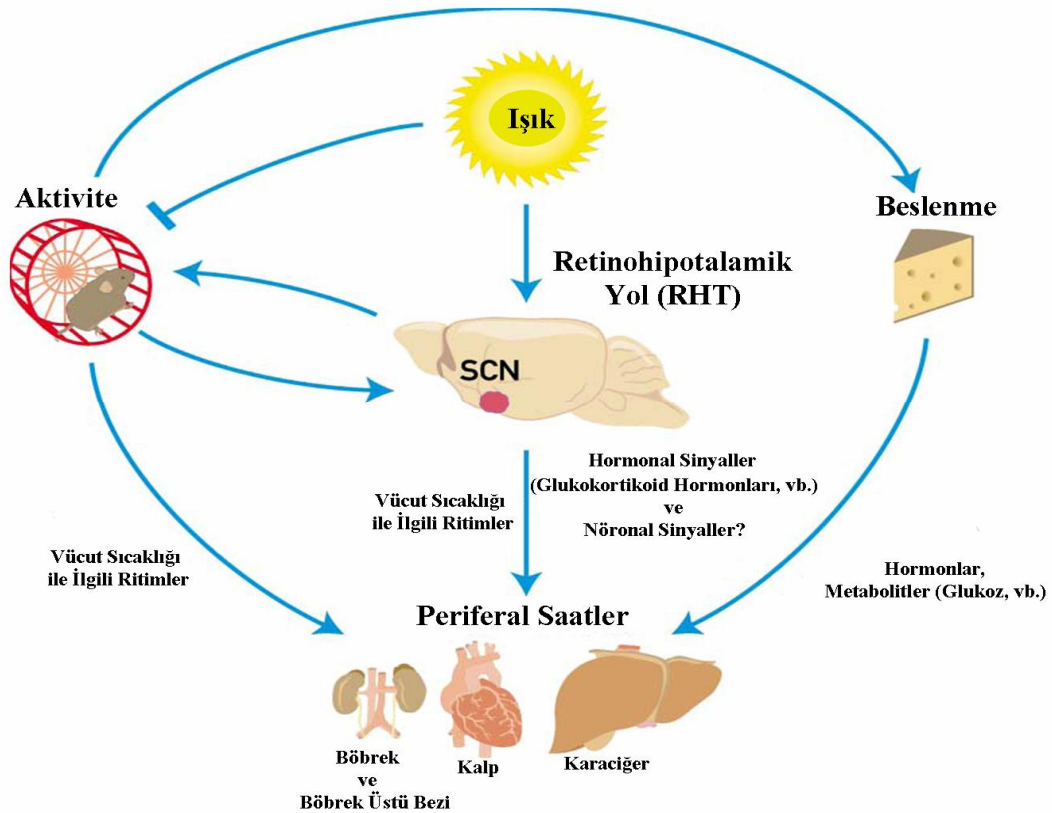
1.7.3. Rev-ErbÜ döngüsü

CLOCK/BMAL1 heterodimeri, REV-ERBÜ (Orphan Nuclear Receptor) transkripsiyon faktör proteininin transkripsiyonunu tekvik etmektedir. Bu protein, translasyon sonrasında sitoplazmadan nükleusa transfer olup BMAL1'in transkripsiyonunu RORE dizilimi üzerinden regüle etmek için RORÜ ile yarı halindedir (Albercht and Eichele 2003; Duez and Staels 2007).

1.8. Periferel Saatler

Sirkadian saat genlerinden ilk olarak Per 1 için ekspresyon örnekleri tanımlandı Per1'e ait transkriptlerin sadece SCN de olmadı aynı zamanda hipofiz bezinde ve retinada olduğunu da gözlemlendi (Balsalobre *et al.* 1998). Bunu takiben transgenik fareler (Wilsbacher *et al.* 2002) ve seçimler (Yamazaki *et al.* 2000) kullanılarak yapılan deneysel çalışmalarda bu konu açıklanmaya çalışıldı Per1'in promotor bölgesi lusiferaz raportör genini yönlendirir. Bu da Per1 promotor aktivitesinin doğrudan ve sürekli olarak ölçülmesine müsaade eder. Bu teknik doğrudan çalışmada karaciğer, akciğer, iskelet kas ve beynin farklı kısımlarında sirkadian raportör gen ekspresyonları gösterildi (Damiola *et al.* 2000). Böylece sirkadian genleri sadece SCN'de eksprese olmadı hipotalamusun dışındaki karaciğer, kalp, böbrek ve kas gibi periferel dokularda da periferel sirkadian saatlerin olduğunu da gösterilmiştir (Balsalobre 2002; Herzog and Tosini, 2001). Bu periferel saatler direkt veya dolaylı olarak hormonal ve nöronal sinyaller ile SCN tarafından koordine edilirler (Schibler and Sassone Corsi, 2002, Schibler *et al.* 2003). Memeli periferel dokulardan alınmış hücreler bile besi

ortamında kuvvetli sirkadian salınımalar gösterirler. Bu salınımların genlik (amplitude)leri birkaç gün sonra zayıflamaya baklar. Bu esnada uygulanan serum koku ile bu salınımlar tekrar kuvvetli hale gelir ve birkaç gün sonra genlik tekrar zayıflar. Besi ortamındaki her hücre için bu durum aynıdır, fakat bu hücreler arasında senkronizasyon yoktur. İlk bu salınımlara hiçbir şekilde etki etmez. Periferel saatlere besin ile kuvvetli bir şekilde etki yapılır (Yamazaki et al, 2000). SCN için zeitgeber etki ışık ile olur iken periferel saatler için ise besin zeitgeber etki yapar (Yamazaki et al., 2000; Schibler et al. 2003).



Şekil 1.7. Periferel saatlerin organizasyonu (Schibler and Sassone-Corsi 2002).

SCN'in ritim olayını kontrol ettiğini düşünülse de son yıllarda CLOCK genleri hakkında yapılan çalışmalarda periferel organlarda salınım mekanizmasının etkili olduğunu görülmüştür. Aslında tüm periferel organlar sirkadian ritim gösterebilme kapasitesindedirler, fakat sirkadian ritim genlerinin tüm periferel hücre tiplerindeki

ekspresyonlarē SCN`de gereklekenler ile karıakıēıēdēēāda yaklak 4 saat geciktirilirler (Balsalobre *et al.* 1998). Son yēlarda CLOCK mutant farelerde yapēan araktēmalarda merkezi ve periferel salēānlar farklē etkiler gōstermesine raē men periferel saatlerin mekanizmalarēān regūle edilmesi aynen SCNōdeki dūzenlenmeler gibidir (Oishi *et al.* 2000).

Periferel saatlerin fonksiyonlarē ile beyinin fonksiyonlarē ek zamanlē olarak alēmalēē. Bu senkronizasyon oē u kez yayēma faktōrleri yolu ile gereklekir (Silver *et al.* 1996). Nōronal sinyaller bazē prosesler için ōnemli gōrūnmesine raē men (Kalsbeek and Buijs 2002), muhtemelen kan dolakāē yolu ile gereklekir (Oishi *et al.* 1998). Bu da periferel saat genlerinin ekspresyonlarēān neden SCN dekilere gōre 4 saat geç gereklektēē ini aēklamaktadē.

1.9. CRY (cryptochrome) Proteinleri

Cry1 ve Cry2 genleri, SCN tarafēndan kontrol edilen ve dūzenlenen sirkadian sistemin feedback dōngsū içerisindeki negatif dōngyū dūzenleyen temel bilekenlerdir (Van der Horst *et al.* 1999). Cry proteinleri ilk olarak bitkilerde sarē boya (pterin/flavin) içeren flavoproteinler olarak karakterize edildi. Arabidopsis bitkisindeki sirkadian sistemin sūrūklenmesinde āēē a karē çekitli cevaplarē verilmesinin etkin olduē u gōsterilmiktir (Cashmore *et al.* 1999). Fare Cry genlerinin her ikisinin de SCNōde eksprese olmasēa raē men sadece Cry1 geni sirkadian salēān gōstermektedir. Her iki Cry geni aynē zamanda ganlion hūcrelerinde ve retinanē i kēmāda eksprese olduklarēndan dolayē sirkadian sistemde fotoreseptōr olarak gōrev yapabileceē i tahmin edilmiktir (Miyamoto and Sancar 1998).

Genomdan Cry1 geni silindiē inde, sirkadian periyodun kēsaldē ē (Van der Horst *et al.* 1999) buna karēā Cry2 geni silindiē inde ise sirkadian sistemdeki fotik sūrūklenmenin uzadē ē gōsterilmiktir (Thresher *et al.* 1998; Van der Horst *et al.* 1999). Her iki Cry geninin silindiē i fareler sūrēkli karanlāk altēda sirkadian ritmin ve davranēsal sirkadian aktivitelerinin tamamen kaybolduē u gōsterilmiktir (Van der Horst *et al.* 1999). Bu

çalāmalar açēka göstermiştir ki Cry genleri sirkadian mekanizmanē düzenli olarak fonksiyonlarē gerçekleştirilmesi için gereklidir.

1.10. Ökaryotlarda Gen İfadesinin Düzenlenmesi

1960'da Jacob ve Monod tarafından Escherichia coli'de operon yapışının bulunması gen ifadesini regüle eden mekanizmayē çözümlemenin ilk adımıdır. Lac operonunda bulunan bazı regülasyon ilkeleri ökaryotlarda da bulunmasına rağmen, ökaryotlar daha karmaşık gen regülasyon sistemi geliştirmişlerdir (Klug 2003).

Farklı hücreler çok özgün biyokimyasal faaliyetlerine göre özelleşmiş görevler üstlenirler. Bütün hücreler tüm genetik yapıyı taşımalarına rağmen, farklı hücreler farklı gen gruplarına harekete geçirir. Örneğin, pankreas hücreleri retinal pigment yapamazlar, benzer şekilde retinal hücreler de insülin yapamazlar. Bu noktada da akla gelen sorudur, nasıl olurda organizma belirli bir hücre tipinde belirli bir gen takımını farklı hücre tipinde ise diğer farklı gen takımını nasıl çalıştırmaktadır? Bu regülasyon, hücresel seviyede, gerekli olmayan genetik bilginin ortadan kaldırılmasıyla başlanmaz. Bunun yerine, genomun özgül kısımlarını etkin hale geçiren, diğer mekanizmaları başlatan mekanizmalar geliştirilmiştir. Seçilen özgül bir gen bölgesinin, etkinleştirilmesi (aktivasyonu) ve baskılanması (represyonu) organizmadaki hassas dengeyi gösterir. Bir genin kendisi yapısal olarak normal olsa bile, yanlış zamanda, yanlış hücre tipinde ya da anormal miktarda ifade (ekspres) olması sağlıksız bir fenotipe ya da organizmanın ölümüne sebep olabilir (Klug 2003).

Ökaryotik gen regülasyonu prokaryotik gen regülasyonundan daha karmaşıktır ve bunun çok sayıda nedenleri vardır;

1. Ökaryotik hücreler, prokaryotik hücrelerin içerdikleri kadar fazla miktarda genetik bilgi taşı ve bu bilgiyi taşıyan DNA, kromatin yapışını oluşturmak için histonlarla ve diğer proteinler ile kompleks oluşturur. Kromatin yapışını ister açık ve transkripsiyona hazır olsun, isterse kapalı ve transkripsiyona uygun olmasın, bu yapı gen regülasyonu

için açma/kapama düğmesidir. Prokaryotlarda ise transkripsiyon için açma/kapama düğmesi operatördür.

2. Ökaryotlardaki genetik bilgi birden fazla kromozom tarafından taşınır ve bu kromozomlar bir çekirdek zarfı ile çevrilidir.
3. Ökaryotlarda transkripsiyon ve translasyon yer ve zaman olarak birbirlerinden ayrılmıştır. Transkripsiyon çekirdekte ve translasyon ise sitoplazmada olur.
4. Ökaryotik genlerin transkripsiyon ürünleri (Transkriptler) sitoplazmaya aktarılmadan önce moleküler iklemden geçirilir.
5. Ökaryotik mRNA'nın prokaryotik mRNA'dan daha uzun bir yarıdanma ömrü vardır. Prokaryotlar protein yapmayı durdurmak isterlerse, transkripsiyonu durdururlar ve mRNA'da birkaç dakika içerisinde bozulur.
6. mRNA yapısının daha kararlı olmasından dolayı ökaryotlarda translasyonel seviyede kontrol olması gerekir.
7. Ökaryotların çoğu, farklılaşmak hücre tiplerine sahip çok hücreli organizmalardır. Her hücre tam bir gen takımına sahip olmasına rağmen, farklı hücre tipleri, farklı protein yapmak için farklı gen takımlarını kullanırlar.

Bütün bunların hepsi, ökaryotlardaki gen ifadesi regülasyonunun potansiyel olarak pek çok seviyede olabileceğini göstermektedir. Ökaryotlarda genetik ifadenin regülasyonu, DNA'dan proteine kadar uzanan yolda birçok noktada ortaya çıkabilir.

1. Transkripsiyonel kontrol
 2. Transkripsiyon sonrası kontrol (Post-Transcriptional)
 3. Translasyonel kontrol
 4. Protein ürünlerinin translasyon sonrası kontrolü (Post-Translational modification)
- (Klug 2003).

1.10.1. Histon proteinleri

Ökaryotik organizmalarda genetik maddenin yapış ve organizasyonu virüs ve prokaryotlarinkinden daha karmaşıktır. Bu karmaşıklık, kromozomu oluşturan DNA'nın çok büyük miktarda olukundan ve ökaryotik DNA'nın çok sayıda proteinle ilişkili olukundan ileri gelir. Tek bir insan hücre çekirdeğinde bulunan 46 kromozomun toplam uzunluğu 2 metredir. Bu genetik madde proteinlerle beraber 5-10 µm çapındaki çekirdeğin içine sığmaktadır. Bu boyuttaki hücrenin içine yerleşmesi, ileri derecede bir düzenli sıkıştırma ve katlanmanın sonucudur (Klug 2003).

Ökaryotik DNA yapışanmasının temel birimleri nükleozomlardır. Nükleozomlar, kromozomlardaki DNA molekülünün histon adı verilen lizin ve arginin zengin bazik karakterdeki proteinlerle oluşturduğu komplekslerdir. Ökaryotik DNA, histonların dışında, transkripsiyon ve replikasyon enzimleri, transkripsiyon faktörleri ve hormon reseptörleri gibi fonksiyonel proteinlerle de birleşmiş halde olabilir. Histon proteinleri bütün ökaryotlarda benzer yapı ve büyüklüktedir. H1, H2A, H2B, H3, H4 olmak üzere 5 çeşit histon vardır (Keha ve Küfrevioğlu 2004).

Son yıllarda yapılan araştırmalar, histon moleküllerinin, asetilasyon, metilasyon, fosforilasyon ve ADP-ribozilasyon (NAD^+ den ADP-riboz kısmının transferi) gibi kovalent modifikasyonlara maruz kaldıklarına göstermiştir. Bu durum, transkripsiyon sonrasında meydana gelen histon modifikasyonlarının DNA yapışanması ve fonksiyonunun düzenlenmesi üzerinde etkili olduğunu göstermiştir (Raphael 2005; Keha ve Küfrevioğlu 2004).

1.10.2. HTATİP (TİP60) histon asetiltransferaz

Kromatin çok farklı iki işlem ile şekil değiştirir. İlk işlem ATP hidrolizi ile katalizlenen şekillenme kompleksidir. Tanınlanan ilk yeniden şekillendirme komplekslerinden biri SWI/SNF olarak adlandırılır. İkinci olarak mayada, 11 alt birimli bir kompleks olarak tanınlanmıştır ve daha sonra yaygın olarak diğer ökaryotlarda da görülmüştür. Yeniden

rekrutlenme kompleksi, transkripsiyon faktörlerinin yardımıyla özgül gen bölgesine yönlendirilir. Diğer bir kromatin yapısını değiştirme işlemi, birçok histon asetil transferaz enzimlerinden (HAT) biri tarafından katalizlenen histon modifikasyonudur (Klug 2003).

Asetiltransferaz enzimleri, asetil CoA'dan hem N- terminal amino asitlerin α -amino ya da içindeki lisin rezidülerinin α -amino grubuna asetil grubu transferini katalizler. Ökaryotik proteinlerin çok büyük kısmının N-terminal asetilasyonu translasyon esnasında meydana gelir. Lisin asetilasyonu ise translasyonel modifikasyonlar sonrasında çoğu proteinlerin protein-protein etkileşimini, enzimatik aktiviteleri ve stabiliteyi, DNA bağlanmalarına gibi fonksiyonları etkiler (Polevoda and Sherman 2002).

Lisin asetiltransferazlar birkaç kategoriye ayrılır. MYST (MOZ, Ybf2/Sas3, Sas2 ve Tip60) enzim ailesi bu gruplardan bir tanesidir. Bu enzim ailesi, grubu ve ismini içerdiği enzimlerin baş harflerinden alır ve gen regülasyonu, DNA'daki hasarların tamiri, tümör genesiz, dozaj kompensasyon, apoptozis gibi çok geniş aralıkta biyolojik aktivite gösterirler (Utley and Cote 2003).

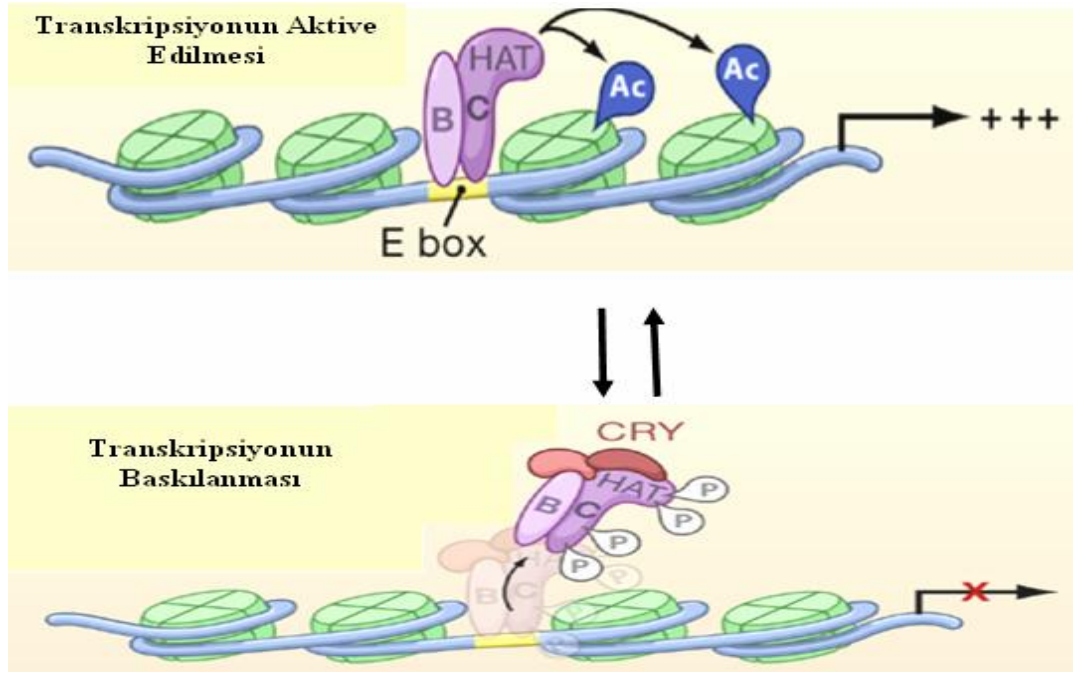
Maya hücresinden insan hücresine kadar MYST enzim ailesinden yaklaşık olarak 12 enzim tanımlanmış ve bunların molekül büyüklükleri 23-225 kDalton arasında değişmektedir. Tip60 ile beraber bu enzim ailesinin çoğu üyesi kromo çinko parmak bölgesi (chromo-zinc finger), lösince zengin bölge ve histon asetil transferaz (HAT) domainleri içermektedir (Gaughan *et al.* 2001, Doyon and Côté 2006). MYST enzim ailesinden en iyi karakterize edilen enzim histon asetiltransferaz Tip60 (Tat interaktif Protein 60kDa)'dır (Sternier and Berger 2000). İlk olarak HIV (Human immunodeficiency virus)-1 Tat interaktif protein olarak karakterize edildi (Kamine *et al.*, 1996). Kısa zamanda Tip60 geni toplam 14 ekzon içerir ve alternatif splicing sonucu en az üç izoform oluşur. Tip60 izoform 1, Tip60 izoform 2 (Tip60 α) ve Tip60 izoform 3 (Tip60 β). En iyi karakterize edilen splicing formu izoform2'dir. Ekzon 1'in translasyonu sonucu izoform 1 farklı fonksiyonları ile yeni bir protein haline gelir (Legube and Trouche 2003). Alternatif splicing sonucu ekzon 5'in yok olması ile

İzoform 3 (Tip60b) oluşur (Ran and Pereira-Smith 2000). Tip60 izoform 2 (Tip60a) 513 (58kDalton) amino grup asit tarafından kıfrelenir ve N-terminal kromodomain ve C-terminal MYST domain içerir. Kromodomainler birçok kromatin regülatör proteinlerde bulunmasına ve fonksiyonlarının bilinmesine rağmen Tip60 kromodomainin fonksiyonu henüz bilinmemektedir (Akhtar *et al.* 2000, Ultey and Cote 2003). MYST domaini ise katalitik domainidir ve kasa dizilimler içerir (HAT domaini). MYST domaini ayrıca Cys-Cys-His-Cys zinc finger içerir. Bu dizilim asetiltransferaz aktivitesi ve protein-protein ilişkileri için gereklidir (Nordentoft and Jorgensen 2003; Xiao *et al.* 2003).

1.10.3. Memeli sirkadian sistemde Tip60 proteinin fonksiyonu

Tip60 geninin SCN'de sirkadian genlerinin ekspresyonlarını regüle ettiği ve ayrıca CRY (CRY1, CRY2) proteinleri ile ilişkileri gösterilmiştir (Pablo S. Yayınlanmadı). Bilindiği üzere memeli sirkadian sistemdeki negatif döngüde CLOCK/BMAL heterodimeri ile CRY ve PER proteinleri direkt ilişkilidir (Griffin *et al.* 1999; Kume *et al.* 1999).

Transkripsiyonal aktivasyonda CLOCK/BMAL1 heterodimeri E-kutusuna (E-Box) bağlanır ve Clock histon asetiltransferaz (HAT) tarafından histon 3 (H3)'ün asetillenmesiyle transkripsiyon aktive edilir. Transkripsiyonun baskılanmasında ise ilk olarak PER ve CRY proteinleri CLOCK/BMAL1 heterodimerini bağlayarak konformasyonunda değişiklik oluşmasına sebep olur. Bu konformasyon değişikliği sonucu CLOCK HAT aktivitesi, CLOCK'un fosforilasyonu ile engellenir ve transkripsiyon baskılanır (Paul and Wangjie 2006).



Şekil 1.8. Sirkadian genlerine HAT aktivitesi (Paul and Wangjie 2006).

1.11. Davranış Analizi

Memelilerde dinlenme ve aktif dönem olmak üzere ikiye ayrılan 24 saatlik sirkadian döngü güneş ışığına göre ayarlanır. Göz retinasından giren ışık, retinohipotalamik yol ile hipotalamusun ventral kısmında bulunan ve sirkadian sistemi organize eden bir üst saat olan SCN (Suprakiazmatik Nukleus)'e ulaşır ve bu sinyaller günlük dinlenme ve aktif döngüyü ayarlar (Albrecht and Foster 2002; Jud *et al.* 2005).

Sirkadian deneylerde ışık, biyolojik saati faz erteleme (phase delays) ve faz ilerletme (phase advances) olarak tetikleyici rolündedir. Bu deneyler için tamamen dark ortamdan (ışık, ses, sıcaklık vb. çevresel uyarılardan) izole edilmik kabinler kullanılır (Şekil 1. 9). Doğal ortamda güneşin, gün içindeki vakit farklılığına göre değişken parlaklığı izole edilmik kabinlerde yapay ışık kaynağı kullanılarak doğal hayattaki gibi gündüz (ışık faz) ve gece (karanlık faz) oluşturulur (Albrecht and Foster 2002; Jud *et al.* 2005).



Şekil 1.9. Davranış analizlerinde kullanılan ve çevresel etkenlerden izole edilmiş kabin.



Şekil 1.10. Davranış analizlerinde kullanılan kafesler.

1.11.1. Işık-Karanlık döngüsüne bağımlı döngü

Tamamen dış ortamdan izole edilmik ve bilgisayar programı ile ışık girişi sağlanan kabinlerde muhafaza edilen farelere, tamamen doğal ortamdaki değişimler ile aynı olacak şekilde ışık verildiği zaman, içsel biyolojik saatteki biyolojik parametrelerin doğal ortam ile aynı olarak değiştiği saptanmıştır. Bu senkronizasyon mekanizması sürüklenme (entrainment) veya bağımlı olarak adlandırılır. Kullanılan zaman birimi ise zeitgeber zaman birimini ifade eden ZT olarak isimlendirilir. 24 saatten oluşan 12 saat ışık i 12 saat karanlık (light-dark cycle LD: 24 saat) periyotlara ayrılan zeitgeber zamanda karanlık periyodu skotofaz ve aydınlık periyot ise fotofaz olarak adlandırılır. Zeitgeber zaman tanımlamasında gün 24 zeitgeber zaman birimden oluşur. İlk 12 aktif hale geldiği yani fotofazı kapsadığı zaman birimi ZT0 ve 12 aktif olmadığı skotofaz periyodunun kapsadığı zaman birimi ise ZT12 olarak ifade edilir (Albrecht and Foster 2002; Jud et al. 2005).

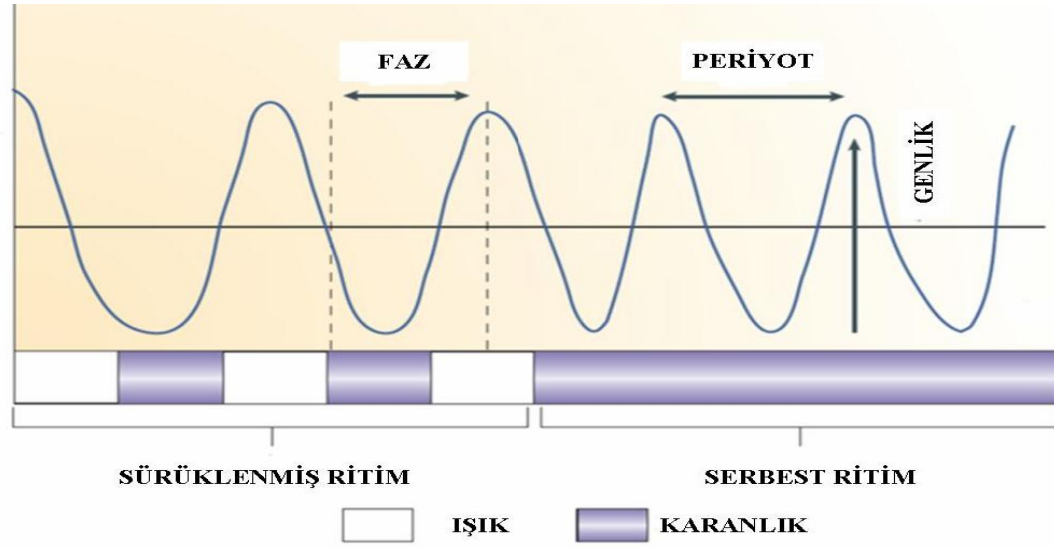
Sirkadian deneylere bağlanırken farelerden alınacak dokular için zeitgeber zaman birimini kullanacak ise fareler ışık haricindeki tüm çevresel kartlardan izole edilmik kabinlere konur. Aydınlık periyodun kapsadığı zaman ZT0: 6:⁰⁰ ve karanlık kapsadığı periyot ise ZT12: 18:⁰⁰ olacak şekilde ayarlanır. Böylece normal gün içerisinde farelerin bakımına daha iyi yapılır. Eğer ZT18 de doku alınacak ise, bu zaman birimi gece yarısına yani 24:⁰⁰’e denk gelir. Bu sorunu kolaylaştırmak için normal döngü ile aynı zamanda ters döngü (Revers Cycle) yani ZT0: 18:⁰⁰ ve ZT12: 6:⁰⁰ olacak şekilde izolasyon kabinleri ayarlanarak normal gün içerisinde ZT18 zaman birimine ait dokular alınabilir (Çizelge 1.7). Farelerin muhafaza edildiği kafeslerin içerisinde yeterince yem ve su bulundurulmalıdır (Şekil 1. 10). Kafesler 2 veya 3 haftada bir değiştirilerek ortamın hijyenine dikkat edilmelidir (Albrecht and Foster 2002; Jud et al. 2005).

Çizelge 1.7. Zeitgeber zaman biriminin hesaplanması

İlāk					
Gerçek Zaman	06: ⁰⁰	12: ⁰⁰	18: ⁰⁰	24: ⁰⁰	} Normal Döngü
Zeitgeber Zaman Birimi (ZT)	ZT0	ZT6	ZT12	ZT18	
Gerçek Zaman	18: ⁰⁰	24: ⁰⁰	6: ⁰⁰	12: ⁰⁰	} Ters Döngü
Zeitgeber Zaman Birimi (ZT)	ZT0	ZT6	ZT12	ZT18	

1.11.2. Serbest ritim

Sabit koşullar altında bir başka ifade ile dış ortamdan gelen ve biyolojik saatin tetiklenmesine sebep olan sebeplerden izole edilmik ortamlarda organizmaların günlük senkronizasyon döngüsü tam olarak 24 saat değildir. Canlı organizmanın cekidine göre bu periyot 24 saatlik zaman diliminden daha kısa veya daha uzundur. Dolayısıyla bu zaman birimi duruma göre 1 ZT birimden daha kısa veya daha uzundur. ZT olarak ifade edilemeyen bu zaman birimi sirkadian zaman birimi (circadian time (CT) units) olarak ifade edilir. Bu sirkadian periyodun 24'e bölünmesiyle bir sirkadian zaman birimi hesaplanır. Gündüzleri dinlenen, geceleri aktif olan naktüurnal canlılarda bir sirkadian birimi genellikle 1 saatten kısadır. Mesela C57BL/6*Tyrc-Brd*×129S7 genetik bekrandına sahip farelerde sirkadian periyodu 23.7±0.1 saat ve bir sirkadian birimi 59,25 saattir. Naktüurnal canlılarda CT0 subjektif gün yani dinlenme periyodun başlangıcı ve CT12 ise subjektif gecenin yani aktif periyodun başlangıcı olarak kabul edilir. Karanlıkta dinlenen, ışıkta aktif olan diurnal canlılar için CT0 subjektif gün yani aktif periyodun başlangıcıdır. CT12 subjektif gecenin (karanlık) yani dinlenme periyodunun başlangıcıdır. Birçok deneyde sürekli karanlık sabit koşul olarak kabul edilir (Albrecht and Foster 2002; Jud *et al.* 2005).



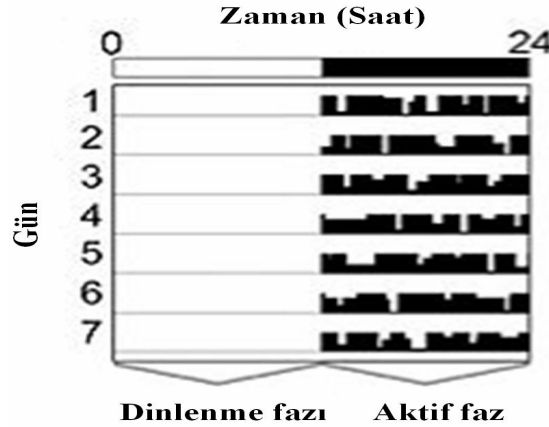
Şekil 1.11. Sirkadian ritim salınımlarının matematik olarak gösterilmesi (Bell-Pedersen *et al.* 2005)

Bazı araştırmacılar sirkadian ritim deneylerinde sürekli karanlık kullanmak yerine sönük kârmâzâk kullanırlar. Sönük kârmâzâk, karanlık ortam ile karıştırdığı anda fareden doku almak, kafes değiştirmek, farelere su ve yem vermek gibi aktiviteleri gerçekleştirmede avantaj sağlar. Fakat en dalga boyuna göre algılama kabiliyeti canlıdan canlıya göre değişir. Mesela Djungarian cinsi hamster farelerin sönük kârmâzâk a karıştırdığı oldukça yüksektir ve bu nedenle sönük kârmâzâk bu hayvan ile çalışmalarda olumsuz etkiler yapar. Son yıllarda yapılan deneysel çalışmalar, sürekli sönük kârmâzâk ile yapılan deneyler ile sürekli karanlık altında yapılan deneyler karıştırdığı anda sirkadian periyodun (T) arttığı belirtilmiştir. Sonuç olarak tavsiye edilen sabit kokullar altında yapılan sirkadian deneylerde sürekli karanlık en kullanılması bu kokullar altında fareden doku alınması yiyecek ve su takviyesi gibi işlemlerin kesilmesi ile yapılmasıdır (Albrecht and Foster 2002; Jud *et al.* 2005).

1.11.3. Aktogram

Sirkadian lokomotor aktivite ritimleri genellikle aktogram olarak isimlendirilen grafik ile gösterilir. Grafikteki her bir yatay çizgi 1 günü (24 saat) ifade eder. Siyah kâmlar

aktif fazē (alpha phase), beyaz kēānlar ise dinlenme fazēnē (rho phase) ifade eder (Albrecht and Foster 2002 Jud *et al.* 2005).



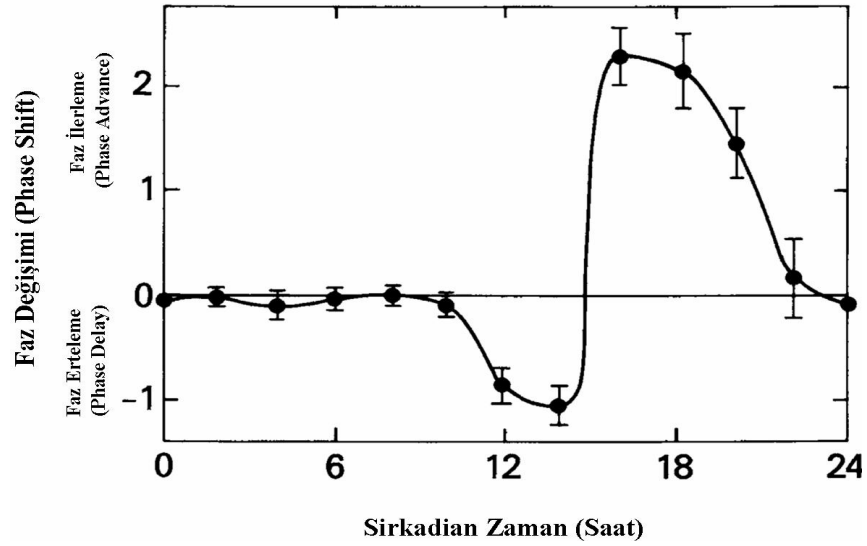
Şekil 1.12. Lokomotor aktivitenin (Wheel running activity) şematik olarak gösterilmesi (Jud *et al.* 2005).

1.11.4. Işık-karanlık faza yansınma eğrisi

Işık-Karanlık (12:12) döngüsünde muhafaza edilen fareler sürekli karanlık ortama transfer edildiğinde 2 farklı durum söz konusu olabilir. Eğer fareler sabit sebrset ritim gösterirse *Aschoff tip 1* protokolü uygulanır. Bu protokole göre sürekli karanlık altında minimum 10 gün tutulan farelere, kısa süreli ışık verme (Light Pulse) deneyi yapılırken genelde 2 farklı zaman aralığı tercih edilir. Subjektif gecenin başlangıcına yakın bir zaman olan CT13-15 arası veya subjektif gecenin bitiş vaktine yakın bir zaman olan CT18-20. Doğal tip farelerde CT13-15 arası uygulanan kısa süreli ışık verme işleminden sonra faz ertelemesine (Phase Delay) sebep olur iken CT18-20 arası uygulanan kısa süreli ışık verme işleminden sonra faz ilerleme olur. Bu değişimin grafiksel olarak ifade edildiği eğri Işık-karanlık Faza Yansınma Eğrisi (A Phase Response Curve to Light (PRC)) olarak isimlendirilir (Albrecht and Foster; 2002, Phillip and Joseph 2004; Jud *et al.* 2005,).

Işık-Karanlık (12:12) döngüsünde muhafaza edilen fareler sürekli karanlık ortama transfer edildiğinde ritmik olmayan davranışlar gösterirler ise faz kayması deneyi için

sirkadian zaman biriminin hesaplanmasında problem yakan. Bu durumda *Aschoff tip2* protokolü uygulanması tercih edilir. Bu protokole göre 15 gün IK (12:12) döngüsünde muhafaza edilen fareler ilk olarak 2-3 hafta sürekli karanlık a transfer edilir ve sonra tekrar IK (12:12) döngüsünde 10-15 gün muhafaza edilir. Yeniden sürekli karanlık a transfer edilen fareler 1 günlük SK altında muhafaza edildikten sonra arzu edilen herhangi bir zamanda kısa süreli ışık verme deneyi yapılabilir (Albrecht and Foster; 2002, Phillip and Joseph 2004; Jud *et al.* 2005.).

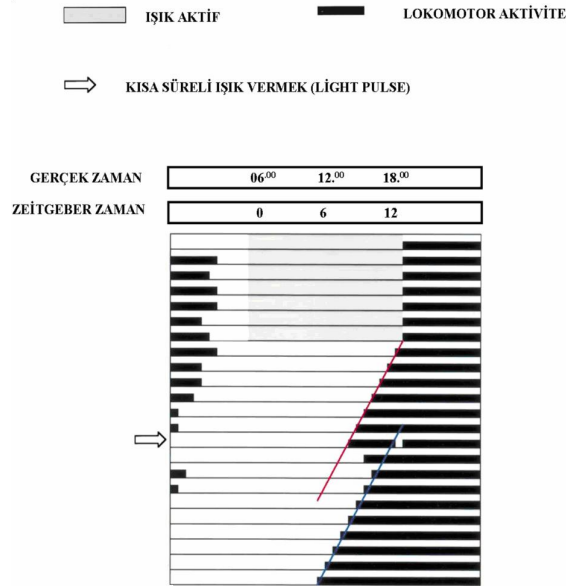


Şekil 1.13. Işığın faza yansımaları (Phillip and Joseph 2004).

1.11.5. Davranış analizinde kullanılan yöntem ve terimler

Şekil 1.14 de görüldüğü üzere aktogram toplam 23 günden oluşuyor. İlk olarak fareler 12:12 ışık-karanlık (IK) döngüsüne, izole edilmik kabinlerde maruz bırakılır. Aktif fazın başlangıcı ve bitiş noktası stabil hale (12:12 aktif-dinlenme fazı) geldikten sonraki 7-10 gün sonrasında fare sürekli karanlık a maruz bırakılır (Şekil 1.14'de 7. günden sonra fare sürekli karanlık a maruz bırakılır). Böylece fareler dışardan gelen ve biyolojik saatin ayarlanmasına tetikleyen ışıktan izole edilmik ortamda olduğundan serbest ritim göstermeye başlar. Doğal tip (wild type) fareler sürekli karanlık döngüsünde 23,5-23,8

saat arasēnda gūnlūk periyot uzunluđ u gōsterir. Dolayēē ile IK dōngūsünde 24 saat olan gūnlūk periyot uzunluđ u sūrekli karanlēk dōngūsünde kēsalē. Gūnlūk kēalmalar sonucu aktif fazēn baslangēç noktasē bir ōnceki gūne gōre daha erken baklar. Bu kēalma stabil hale geldikten sonra 7-10 gūn sonrasē (ēekil 1.14'de sūrekli karanlē ēē 7. gūnünde) gūnlūk aktif fazēn baslangēç noktalarēēēn oluēturduđ u eđ imden yeni periyot uzunluđ u tau (τ) hesaplanē. Bu sirkadian data periodogram (G^2) ile gōsterilir. Kēsa sūreli ēēk verme (light pulse) basamađ ē için CT14 hesaplanē. Genellikle bu islem için seēilen zaman aralē ē CT12 ile CT24 arasēndadē. 15-30 dakikalēk ēēk verme iēleminden sonra fareler tekrar sūrekli karanlēk altēnda muhafaza edilir. Bu iēlem sonrasē farelerdeki faz kaymasē (phase shift ϕ) olarak gōsterir. Iēēk, faz kaymasē için en etkili olan ēevresel deđ iēimdir. Ses ve yiyecek de faz deđ iēimine sebep olan ēevresel etkilerdendir. Dođ al tip (wild type) cinslerinin ēođ unluđ unda ēekil 1. 14 de gōrūldūđ ū gibi faz erteleme (phase delay) gōrūlūr. Eđ im tekrar stabil hale geldikten sonra τ hesaplanē. τ hesaplanēken ēēk verme iēleminden sonraki ilk gūn hesaba katēmaz. Bu iki eđ rinin birbirine oranē faz deđ iēimini verir. Elde edilen deđ er pozitif ise faz ilerletme (phase advance), negatif ise faz erteleme (phase delay) olarak ifade edilir ve Iēēēn Faza Yansēna Eđ risi olarak grafiklenir.



ēekil 1.14. Doğ al tip fare için lokomotor aktivitenin gōsterildiđ i aktogram (Phillip and Joseph 2004)

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Dünya üzerinde yaşayan tüm canlılar iki önemli periyodik değişim olan gece-gündüz ve mevsimlerin etkisi altındadır. Bu değişimlere karşı mekanizma geliştirip adapte olmayı bekleyen canlılar nesillerini günümüze kadar devam ettirmiştir (Dunlap 1999; Oster *et al.* 2002). Son yıllarda sirkadian sistem ile ilgili yapılan bilimsel çalışmalar, doğrudan sahip olduğumuz ve sürekli olarak yaşadığımız ortam ile etkileşim içinde olan sirkadian sistemimizdeki saat genlerinin birbirleri ile olan senkronizasyonunun enerji metabolizması üzerinde ne kadar önemli bir rol oynadığı sistemimizde oluşabilecek tahribatların ne gibi metabolik hasarlar oluşturacağı birçok çalışma ile gösterilmiştir (Rudic *et al.* 2004; Garaulet and Madrid 2009).

Nakavt ve mutant farelerde yapılan çalışmada, sirkadian sistemdeki pozitif döngü elementlerinden BMAL1 ve CLOCK heterodimerinin glukoz metabolizmasındaki homeostazi düzenlediği gösterilmiştir. BMAL1 ve CLOCK genlerinin inaktif edilmesi glukoz ve trigliseridlerin günlük değişimlerini baskıladığı hem Clock mutant hem de BMAL1 nakavt farelerde glukoneogenez homeostazinin yok olduğunu gösterilmiştir (Rudic *et al.* 2004).

Clock geni mutant edilmik farelerde, günlük yemek ritimlerinde önemli oranda değişim olduğunu gösterilmiştir. Bunun sonucu olarak bu mutant farelerin aşırı miktarda besin tükettikleri (hyperphagic) ve obez oldukları kandaki lipid ve lipoprotein seviyelerinin anormal seviye yükseldiği (hyperlipidemia, hepatic steatosis), karaciğerlerinde yağlanma sorunları ve diyabet (hypoinsulinemia) problemleri yakadıkları gösterilmiştir (Turek *et al.* 2005).

Diki Clock mutant farelerde üreme aktivitesi üzerine yapılan çalışmada, hipotalamik hormon üretiminin günlük ritim düzenini kaybettiği gösterilmiştir. Üreme hormonları tarafından kontrol edilen östrojen döngüsünün düzensizliği, hipofiz bezi tarafından sentezlenen LH (Luteinleştirici hormon) hormonunun koordinesiz üretilmeye bakıldığı

ve hamilelik döneminde fetal reabsorbsiyonun artması ile doğum hatalarına yol açtığı gösterilmiştir (Miller *et al.* 2004; Kennaway 2005).

Nakavt BMAL1 fareler için yapılan davranış analizlerinde toplam aktiviteleri azaldığı ve sürekli karanlık altında aritmik davranış gösterdikleri ve bununla beraber bazı hedef genlerin ekspresyon düzeylerinin azaldığı gösterilmiştir. Hedef genlerdeki ekspresyon değişiminin BMAL1 nakavt farelerin yaşam sürelerinin kısalması erken yalanma, deri altlarında normalden az miktarda yağ dokusu içermesi, organlarda küçülme gibi birçok probleme sebep olduğu gösterilmiştir (Kondratov *et al.* 2006).

1981 yılında Weitzman ve arkadaşları tarafından tanımlanan geç uyuma sendromu (Delayed sleep phase syndrome), çocukluk ve gençlik dönemlerinde başlayan bir rahatsızlıktır. Birçok sebebe bağlı olarak ortaya çıkan bu rahatsızlık, eğitim, çalışma, aile ve sosyal hayatı oldukça rahatsız etmektedir. Sirkadian sistemdeki aksaklıkları bu hastalığı tetikleyen ana sebep olduğu gösterilmiştir (Alvarez *et al.* 1992).

Erken uyuma sendromu (Familial advanced sleep phase syndrome (FASPS)) olarak adlandırılan ve sirkadian ritim değişiklerinin sebep olduğu bir rahatsızlık ilk olarak 2001 yılında tanımlanmıştır. Vücut sıcağı ve melatonin salgılanması ve uyku ritimlerinin normal kıkıllara kıyasla 4 saat erken olduğu sendromdur. CK1 α enzimi üzerinde bulunan PER2 yalanma bölgesindeki serin amino asitinin mutasyonu sonucu fosforilasyon etkisinin azalmasından kaynaklandığı gösterilmiştir (Toh *et al.* 2001).

Per2 geni mutant olan farelerde yapılan çalışmada, bu genin mutant olduğu farelerin kanser olma eğilimlerinin doğal tip farelere göre daha fazla olduğu, γ radyasyonla maruz bırakılan Per2 mutant farelerinde tümör gelişiminin doğal tip farelere göre daha hızlı olduğu gösterilmiştir. Doğal tip fareler γ radyasyonla maruz bırakılmasına rağmen Per2'nin tetiklediği ekspresyonları gerçekleştiriyor olması sirkadian sistemin düzgün işleyişinin tümör gelişiminin baskılanmasında rol oynadığı gösterilmiştir. Ayrıca mutant Per2 farelerde, hücre döngüsünü regüle eden ve tümör baskılayıcı olarak fonksiyon gösteren genlerden Cyclin D1, Cyclin A, Mdm-2 ve Gadd45'in

ekspresyonların kontrolü ı radyasyonuna maruz b ak dd ktan sonra kaybolmukt r. Kanser hücrelerinin     almas n  engelleyen Myc transkripsiyon faktörünün ekspresyonun kontrolü sirkadian sistem düzenleyicileri tarafından gerçekleştirilir. Mutant Per2 farelerde Myc geninin ekspresyonunun k   land     g sterilmiktir (Fu *et al.* 2002).

Günümüzde, Jet-lag olarak adland  dan ve özellikle k  alar arası u uklar n yo  un oldu  u seyahatlerde gözlenen yeni bir hastalık biçimi tan nlanm    . Bu rahats zl k, büyük zaman dilimle-rinin katedildi  i, doç u-bat  do  rultusunda gerçekleşen jet u uklar  sonucu ortaya çıkar. Jet u uklar  insanın uyarlanabilme kapasitesinin çok üzerindeki bir h  la zaman de  i imine neden olur. Jet-lag, bu de  i ime organizmanın uyum sa  layamamas ndan kaynaklanarak, uyku ve sindirim bozuklu  u, psikolojik işlev bozuklukları, dikkat da          alg ama eksikli  i, motivasyon bozuklu  u, genel huzursuzluk hissi gibi rahats zl klara sebep olur. Bu belirtiler, batıdan do  uya gidenlerde (zaman ilerlemesi yakayanlarda) daha belirgindir. Yak  ar, jet yolculuklar ndan daha fazla etkilenirler ve yeni saat düzenlerine adaptasyonlar  gençlere göre daha zordur. Bunun yanında, ileri-geri saat uygulamalarının (k  -yaz saatleri), hafif jet-lag belirtilerine neden oldu  u  ne s r lm    r (Canan 2001; Sack 2009).

Hücre kültürleri ile 2000 y  nda yapıdan çalışmada, Tip60HAT aktivitesinin bask  and     hücrelerde DNA tamir mekanizması ile beraber apoptosiz fonksiyonunda aksaklıklar meydana geldi  i g sterilmiktir (Ikura *et al.* 2000).

Farelerde yapıdan çalışmada, prostatta metastaz bask  ay c  geni olan KAI1  regüle eden ve prostat kanser hücrelerinde inhibisyon etkisi gösteren  -katein i reptin kromatin düzenleyici kompleksi histon deasetilaz aktivitesine ihtiyaç duydu  u ve bu basamakta Tip60 koaktivatör olarak işlev g rd     g sterilmiktir (Kim *et al.* 2005).

Amaç

DNA'nın paketlenişi kromatin yapısı içerisinde birçok protein-DNA etkilekimi bulunur. DNA tamir mekanizması ile kromatin modifikasyonu ve yeniden düzenlenmesi (chromatin modification/remodelling) arasında yüksek derecede koordinasyon bulunur. Bu koordinasyon DNA'nın kromatin içerisine girişini düzenler. Histon asetil transferaz (HAT) kofaktörlerinden olan Tip60 ve Tip60 (HAT), çift sarmallı DNA kollarının etrafındaki kromatin yapılarına bağlanmasını sağlayarak DNA tamir mekanizmasında görev alır. Embriyonik fare fibroblast (MEF) hücrelerinde *in vivo* olarak gösterilmiştir (Murr *et al.* 2005).

Hücre döngüsünü düzenleyen bir transkripsiyon faktörü olan p53, birçok organizmada tümör baskılayarak hücrenin kansere karşı direncini artırır ve birçok önemli fonksiyona sahiptir. Hücrenin ihtiyacına göre hücre döngüsünü durdurma veya ölümü (apoptosis) arasında seçim yapmaktadır. Fakat bu seçim mekanizmasının nasıl işlediği tam olarak aydınlatılmamıştır. 2006 yılında yapılan çalışmada, p53 transkripsiyon faktörünün hücre döngüsünü durdurma veya ölümünü gerçekleştirme fonksiyonları gösterilebilmesi için Tip60'ye aracılık olarak ihtiyaç duyulduğu gösterilmiştir. Ayrıca p53 transkripsiyon faktörünün sahip olduğu DNA-bağımlı domaininin işlev gösterilebilmesi için lizin (120) amino asiti üzerinden asetilenmesi gerekmektedir. Bu asetilasyonun Tip60 HAT tarafından gerçekleştirilmesi, p53 transkripsiyon faktörünün apoptotik fonksiyonunu gerçekleştirebilmesi için elzem olduğu *in vivo* ve *in vitro* olarak gösterilmiştir (Yi *et al.* 2006).

Transgenik Myc ve heterozigot Tip60 fareler kullanılarak yapılan lenfoma kanseri ile ilgili çalışmada, heterozigot Tip60 farelerin, Myc proteinin baskıladığı lenfoma tümörlerinin oluşumunun erken evrelerinde yetersiz kalmasına sebep olduğu gösterilmiştir. Buna karşın Myc proteinin indüklediği hücre çoğalmasında (proliferation) fonksiyonunun ve ARF-p53 tümör baskılama mekanizmasının etkilenmediği ifade edilmiştir. Heterozigot Tip60 farelerde, Myc proteinin indüklediği DNA-Hasarcı cevaplarının (DNA-damage response) güçlü bir şekilde etkilediğini fakat B

hücrelerinde genel bir tahribata yol açmadığı bu etkilerin Myc proteinin ve p53 transkripsiyon faktörünün indüklediği genlerin ekspresyon seviyelerinde bir değişiklik yapmadığı gösterilmiştir (Gorrini *et al.* 2007).

Hayvan genomları 15.000 (*Drosophila*) ve 30.000 (insan, fare) arasında gen ihtiva ederler; bu genlerin bir kısmı düzenleyici proseslerde gerekli olan proteinleri kodlarlar. Tip60 geni proteomu düzenleyen genlerden bir tanesidir ve bu genin fonksiyon gösterdiği birçok metabolik yolun açılanmasına karşı sirkadian sistemde herhangi bir fonksiyonunu olup olmadığı hakkında herhangi bir yayımlanmış bilgi bulunmamaktadır. Bu aşamada bu çalışmanın hedefi, mutant fareler ve spesifik antikorlar kullanarak bu önemli metabolik yolun hem moleküler düzeyde hemde biyokimyasal olarak aydınlatılmasına katkıda bulunmaktır.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Materyaller

Çalışmalarda çizelge 3.1'de belirtilen kimyasal maddeler ve materyaller kullanılmıştır.

Çizelge 3.1. Kullanılan kimyasal maddeler ve materyaller.

%5 (Normal Goat Serum) Keçi Serumu	Vector laboratories
10 X Buffer	QIAGEN
100 bp DNA marker	NEBiolabs
2-log DNA marker	NEBiolabs
Agaroz	Life Technologies
Alexa 488 antikor (goat anti-mouse IgG)	Kavitrogen
Amersham hyperfilm 18x24 cm	GE Healthcare
Amonyum asetat	Merck
AmpliqonTaq DNA polimeraz	Biomol
Anti-Dig-Fab-POD	Roche
APS (Amonyum persülfat)	Amresco
Asetik Anhidrit	Sigma
Asetik asit	Merck
BCIP(5-bromo-4-kloro-3-indolilfosfat,4-toluidin tuzu)	Roche
Beads (Protein G-Agaroz)	Roche
Beta Aktin (HRP Bağlanmaz)	Santa Cruz Biotechnology
BioTherm Taq DNA polimeraz	Gene Craft
Bisbenzimidin	Sigma
Blotlama kağıdı (Blottin Paper)	Macherey-nagel
BMB blocking reagent	Roche
Borik asit	Merck
Brom fenol mavisi	Pharmacia Biotech
BSA (Bovine serum albumin10mg/ml)	NEBiolabs
Cry1 Antikoru (Rabbit Anti-mouseCry1 IgG)	Alpha Diagnostic
DAPI (4'-6-Diamidino-2-phenylindole)	Kavitrogen
Diyaliz torbası (Dialysis tubing cellulose membrane)	Sigma
DMSO	Sigma
Dnaz I (Rnaz Free)	Roche
dNTP	NEBiolabs
DNTPs	Roche
DTT	Biomol
DTT, dithiotreitol	Sigma
EDTA	Sigma

Çizelge 3.1. (devam)

%5 (Normal Goat Serum) Keçi Serumu	Vector laboratories
EGTA	Sigma
Enhancer	QIAGEN
Etanol	Carl Roth GmbH
Etidyum bromür	Sigma
FCS (Fetal Calf Serum)	PAA Laboratories
Fenol	Roth GmbH, 76185 Karlsruhe
Fenol/Kloroform/İzooamilalkol, izopropanol	Roth GmbH, 76185 Karlsruhe
Filtre Kağıdı	Sartorius
Formaldehit	Electron microscopy sciences
Formamide	Fluka
GE Healthcare Life Sciences - Hybond-XL	GE Healthcare
Gliserin	Appli chem
Glisin	Merck
Glutaraldehit(%25)	Merck
H ₂ SO ₄	Merck
HEPES	Sigma
Hidrojen peroksit (H ₂ O ₂)	Fluka
Hidroklorik asit, (HCl) , 1N çözelti	Carl Roth GmbH
Hyperscreen	Amersham Biosciences
ISH Tamponu	Ambion
Iyotasetamid	Sigma
Illustra ProbeQuant G-50 Micro Columns	GE Healthcare
Jel ve PCR ekstraksiyon kiti	QIAGEN
Jelatin (Gelatin from porcine skin, Type A)	Sigma
Kalsiyum klorür	Merck
Kb-Ladder	NEBiolabs
KH ₂ PO ₄	Merck
Kloroform	Roth GmbH, 76185 Karlsruhe
Levamisole ([(-)-tetramizol hidroklorür)	sigma
Maleik asit	Fluka
Matriks	BioScience
Medium (prolong Gold Antifade Reagent)	Invitrogen
Metanol	Carl Roth GmbH
MgCl ₂	Merck
Mikroskop slaytları	Menzel gläser
Mikro Pistil	Schütt Labortechnik
Na ₂ HPO ₄	Riedel de Haen
NaCl	Merck
NaF	Sigma
NaN ₃	Merck
NBT (Nitroblue tetrazolium klorür)	Roche
NEN Tiramide signal amplification	NEN/Perkin-Elmer
NeutrAvidin-AP	Roche
NP40 (Nonidet P40)	Roche

Çizelge 3.1. (devam)

%5 (Normal Goat Serum) Keçi Serumu	Vector laboratories
Peptit(NH ₂ -CR LPV LRR NQD NED EW-COOH)	BioScience
Per2 Antikoru (Rabbit Anti-mousePer2 IgG)	Alpha Diagnostic
Porablot PVDF membran	Macherey-nagel
Potasyum klorür	Roth GmbH, 76185 Karlsruhe
Prestained Protein Marker	NEBiolabs
Primerler	MWG
Proteaz inhibitör (complete protease inh.)	Roche
Proteinaz K	Roche
Rediprime II DNA Labeling System	GE Healthcare
Redivue deoxycytidine 5'-[³² P] Redivue stablizele and colored	GE Healthcare
Restriksiyon Enzimi (BamH1)	NEBiolabs
Reverse transkriptaz	Invitrogen
Rnaz A	Sigma
Rnaz inhibitörü	Roche
RnazZAP	Sigma
Rotiphorse Gel 30	Carl Roth GmbH
Sheep Serum (Koyun serumu)	Chemicon International Inc.
Skim Milk Powder (Süt tozu)	Fluka
SMCC activated BSA (Maleimide activation of carrier protein and conjugation of sulfhydryl-peptide)	Pierce
Sodyum klorür NaCl	Carl Roth GmbH
Sodyumhidroksit NaOH, 1N çözeltisi	Carl Roth GmbH
SP6-primeri	MWG
SP6-RNA-Polimeraz	Roche
Super signal west femto maximum sensitivity substrate	Pierce
Super signal west pico chemiluminescent substrate	Pierce
T7-DNA-Primeri	MWG
T7-RNA-Polimeraz	Roche
Taq-DNA-polimeraz	QIAGEN
TEMED (tetrametiletildiamin)	Fluka
Tissue-Tec (OCT)	Sakura
Tri sodyum sitrat dihidrat	Roth GmbH, 76185 Karlsruhe
Trietanolamin	Fluka
Tris	Carl Roth GmbH
Triton X-100	Merck
TritonX-100	Merck
Tween-20	Sigma
Western blot jel hazırlama seti	Bio-Rad
6-Aktin (HRP-conjugated)	Santa Cruz Biotechnology
6-Gliseroil fosfat	Sigma
6-Merkapto etanol	Sigma

3.3. Kullandān Çözeltilerin Hazārlanmasē

- 1. %100k AgaroZ Jeli:** 1xTAE çözeltisinden 100 ml alēndē üzerine 1 g agaroz konuldu ve 1,5 dakika mikro dalga fāēnda ēāēarak hazārlandē
- 2. %100k Tween:** 10 g tween 90 ml otoklavlanmēk dd su ile çözölerek 100 ml %100k tween hazārlandē Renk reaktifi, TMN, Hyb mix reaktifleri haricindeki *in situ* hibridizasyon iklēmlerinde kullandān tüm çözeltilere oranē %0,5 olacak kēilde tween ilave edildi.
- 3. %400k PFA:** 500 ml otoklavlanmēk dd suya 1ml 2N NaOH ilave edildi ve 65°C'dik su banyosuna konularak ēāēdē Isēnēken 200 g PFA (paraformaldehit) ilave edildi. Tamamen çözöndükten sonra 100 ml 10xPBS ilave edilip oda sēcaklēēna gelmesi beklenir. pH: 7,4ēe ayarlandē ve hacim 1litreye tamamlandēktan sonra 100 ml lik alikuatlara ayrēarak -20°C`de muhafaza edildi. 6 ay süre ile muhafaza edilebilirliēi saē landē
- 4. %400k Sheep serum:** 250 ml çözeltiden hazārlamak için, 1xTNT çözeltisinden 240 ml alēndē ve iēerisine 10 mlēde sheep serum ilave edildi ve karēēēarak Filtreden geēirilerek kullandēdē
- 5. %5 Keēi Serumı (Normal Goat Serum):** 10 ml hazārlamak için, 500 el keēi serumu 9,5 ml TBST iēerisinde çözölerek hazārlandē
- 6. %500k Formamid I:** 100 ml 20xSSC, 500 ml formamid ve 400 ml otoklavlanmēk dd su birbirleriyle karēēēarak 1litre hazārlandē
- 7. %500k Formamid II:** 50 ml 20xSSC, 500 ml formamid ve 450 ml otoklavlanmēk dd su birbirleriyle karēēēarak 1litre hazārlandē
- 8. 0,2 M HCl:** 100 ml çözelti hazārlamak için, 1 M HCl`den 20 ml alēndē ve hacim otoklavlanmēk dd su ile 100 ml`ye tamamlandē
- 9. 1 M Tris:** 121,14 g Tris 900 ml destile su iēinde çözöldü. 1M HCl ile pH: 6,8ēe ayarlanēp hacim destile su ile 1 litreye tamamlandē
- 10. 1xTransfer Çözeltisi:** 10x transfer çözeltisinden 100 ml alēndē ve 700 ml destile su ve 200 ml metanol ilave edilerek toplam hacim 1 litreye tamamlandē
- 11. 1,5 M Tris:** 181,7 g Tris 900 ml destile su iēinde çözöldü. 1M HCl ile pH: 8,8ēe ayarlanēp hacim destile su ile 1litreye tamamlandē

- 12. 10xPBS:** 80 g NaCl, 2 g KCl, 14,4 g Na_2HPO_4 , 2,4 g KH_2PO_4 900 ml dd suda çözüldü, pH 7,4 ayarlandı ve son hacim 1 litreye tamamlandıktan sonra otoklavlandı
- 13. 10xTBS:** 80 g NaCl, 2 g KCl, 30 g Tris 900 ml destile su içinde çözüldü. 1M HCl ile pH: 7,4 e ayarlandı ve hacim destile su ile 1 litreye tamamlanıp otoklav edildi.
- 14. 10xTN:** 121,5 g Tris 87,96 g NaCl 950 ml dd suda çözüldü, pH 7,5 ayarlandı ve son hacim 1 litreye tamamlandıktan sonra otoklavlandı
- 15. 10xTransfer Çözeltisi:** 29 g Glisin, 58 g Tris, 3,7 g SDS 900 ml destile suda çözüldü ve pH. 8,3'e ayarlandı ve toplam hacim destile su ile 1 litreye tamamlandı
- 16. 10xTRİS-Glisin Elektroforez Çözeltisi:** 30,2 g Tris, 188 g Glisin, 100 ml %10 SDS 1 litre destile su içerisinde çözüldü.
- 17. 100mM Glisin Çözeltisi:** 7,507 g glisin 950ml suda çözülür ve istenilen pH'a ayarlandıktan sonra toplam hacim su ile 1 litreye tamamlandı
- 18. 2xPK (Proteinaz K Tamponu):** 100mM Tris (12,1 g), 10mM EDTA (3,72 g) alında ve 950 ml otoklavlanmamış dd suda çözüldü. pH 8,0'e ayarlanıp, toplam hacim 1 litreye tamamlandıktan sonra oda sıcaklığında muhafaza edildi.
- 19. 20xSSC:** 175,3 g NaCl, 88,2 g Na sitrat-trisodyum sitrat dihidrat 950 ml dd suda çözüldü, pH 7,0'a ayarlandıktan sonra son hacim 1 litreye tamamlandı ve otoklavlandı
- 20. 3M Sodyum Asetat:** 40,8 g Sodyum asetat 50 ml saf su içerisinde çözüldü. Asetik asit ile pH: 5,2'ye ayarlandı ve son hacim saf su ile 100 ml'ye tamamlandı
- 21. 3mM NaN_3 Çözeltisi:** 19,5mg NaN_3 100 ml destile suda çözülerek hazırlandı
- 22. 4 M Amonyum Asetat:** 100 ml çözeltiden hazırlamak için, 31,12 g amonyum asetat 70 ml dd su içerisinde çözüldü ve son hacim dd su ile 100 ml'ye tamamlandı Otoklavlandıktan sonra -20°C'de muhafaza edildi.
- 23. 5xNTE Çözeltisi:** 146.25 g NaCl (2,5 M), 6.055 g Tris (50 mM), 9,305 g EDTA (25 mM) 950 ml sıcak dd su (60°C) içerisinde çözüldü ve pH 8 ayarlandıktan sonra 1 litre'ye tamamlanıp, otoklavlandı
- 24. 5xSDS-PAGE Yükleme Çözeltisi (western blot için):** 2,5 ml Tris/HCl çözeltisi, 0,771 g DDT, 0,05 g brom fenol mavisi, 5 ml %50 gliserol, 1 g SDS alınıp hacim destile su ile 10 ml'ye tamamlandı -20°C'de saklandı
- 25. 50xTAE Çözeltisi:** 242 g Tris, 18,6 g EDTA ve 57,1 ml asetik asit alında 1 litreye destile su ile tamamlandı

26. 6xYükleme Tamponu (PCR için): Didistile suda çözölmük %30 gliserol, %0.25 bromfenol mavisi ve %0.25 ksilen siyanol FF alēēp istenen miktarda hazēlandē ve 4°Cde saklandē

27. Alkaline Transferaz Çözeltisi: 87,66g NaCl ve 20g NaOH 1 lt didistile su içerisinde çözünerek hazēlandē

28. Bloking Reaktifi (maleat tamponu icinde): Bu hazēlanan çözeltide bloking reaktifinin konsantrasyonu %1`dir. 100 ml maleat çözeltisi alēndē ve içerisinde 1g bloking reaktifi konuldu. 1,5 saat 100°C`de karēēēē üzerinde karēēēēde 4°C`de muhafaza edildi ve kullanmaya baēlamadan önce filtreden geçirildi.

29. DAPK Boyasē 0,5 mg/ml olacak ōekilde DMSO içerisinde çözölerek stok hazēlandē Kullanēacaē ē zaman dd su içerisinde 1/100 oranēda seyreltilerek kullanēdē

30. DEPC (Diētil pirokarbonat)ēi su: 1 ml DEPC alēndē 1 litre dd su ilave edildi. 4 saat karēēēēēde karēēēēēēktan sonra otoklavlandē Oda sēaklē ēnda saklandē

31. Depurination Çözeltisi: 0,25M HCl çözeltisi hazēlandē

32. DNA Marker: 150 μl gliserol, 150 μl DEPCēē su, 100 μl 6x loading tamponu ve 100 μl DNA ladder (1000 μg/μl) birbiri ile karēēēēēarak hazēlandē

34. Hibridizasyon Çözeltisi (Modified Church Buffer): 500ml 1M fosfat tamponu (Na₂HPO₄) pH:7,2, 2 ml 0,5M EDTA ve 70g SDS 1 litre didistile su çözölerek hazēlandē

35. İmmunopresipitasyon İēin Liziz Çözeltisi: 150mM NaCl, 20mM HEPES, 1mM MgCl₂, 1mM EGTA, 1mM DTT 950 ml dd su içerisinde çözöldü. PH 7,4ē ayarlandē Hacim dd su ile 1 litreye tamamlandē Toplam hacmin %10 u kadar Triton X-100 ilave edildi ve 4°C de muhafaza edildi.

36. Liziz Çözeltisi (Genomik DNA izole etmek için): 1M Tris-HCl pH:8 çözeltisinden 50 ml, 0,5M EDTA pH:8 çözeltisinden 5ml, %10 SDS çözeltisinden 10ml, 5M NaCl çözeltisinden 20ml alēndē ve dd su ile son hacim 500ml ye tamamlandē Stok çözeltisi olarak 4°Cde muhafaza edildi.

37. Maleat Tamponu: 8,765 g NaCl, 16 g maleik asit 950 ml dd suda çözöldü. pH: 7,5`e ayarlandēve toplam hacim 1 litreye tamamlandē

38. Neutralization II Çözeltisi: 121,14g Tris ve 87,66g NaCl 900 ml didistile suda çözöldü. pH:7,4ē HCl ile ayarlandēktan sonra toplam hacim 1litreye didistile su ile tamamlandē

39. Renklendirme Çözeltisi: 200 ml hazırlamak için önceden hazırlanmış TMN çözeltisi ilk olarak filtreden geçirildi. Çözeltinin her 1 ml'sinde 0,5 mg levamizol [(-)-tetramizol hidroklorür] olacak şekilde 100 mg bu maddeden alındı ve çözüldü. 1 ml NBT (Nitroblue tetrazolium klorid) (5µl/ml), 0,75 ml BCIP (5-bromo-4-kloro-3-indolil-fosfat, 4-toluidine tuzu) (3,75µl/ml) ilaveleri yapıldıktan sonra hemen kullanıldı

40. Stok Liziz Çözeltisi (Fare beyininden protein ekstraksiyonu için): 0,05M Tris, 0,15M NaCl, 0,001M EDTA, 0,001M EGTA, %0,1 Triton X-100, 0,01M β-gliserol fosfat, 0,001M NaF alındı ve hacim distile su ile 250 ml tamamlandı 4 °C de saklandı

41. 50xTAE Çözeltisi: 242g Tris, 100ml 0,5M EDTA pH:8 ve 57,1 ml asetik asit 800ml saf su içerisinde çözüldü. HCl ile pH:8'e ayarlandı ve toplam hacim saf su ile 1litreye tamamlandı

42. TBST: 10xTBS den 100ml alındı ve 900 ml distile su ile 1 litreye tamamlandıktan sonra 1 ml Tween-20 ilave edildi.

43. TE Çözeltisi: 10ml 1 Tris-HCl pH: 7,5 ve 2 ml 500mM EDTA pH:8 çözeltileri karıştırıldı ve toplam hacim saf su ile 1litreye tamamlandı

44. TMN: 500 ml hazırlamak için 6,06 g Tris, 2,92 g NaCl, ve 5,08 g MgCl₂·6H₂O alındı ve suda çözüldü, pH 9,5'a ayarlandı stok olarak -20 °C'de muhafaza edildi.

45. TNB (%0,5 dik bloking reaktifi): 1xTN çözeltisinden 100 ml alındı ve içerisine yüzde %0,5 olacak şekilde bloking reaktifi ilave edildi. 1 saat 60°C sıcaklığındaki karıştırıcı üzerinde karıştırıldı Oda sıcaklığına getirilen çözelti pH 8,0'e ayarlandı ve 50 ml'lik alikuatlara ayrıldı -20°C'de muhafaza edildi.

46. PBNB Çözeltisi: 1,87 g KCl, 50 mg jelatin, 2,25 ml Tween 20, 2,25 ml NP40, 1M MgCl₂ çözeltisinden 1,25 ml, 1M Tris-HCl çözeltisinden 5 ml alındı ve distile su ile toplam hacim 500 ml ye tamamlandı Otoklav edildi ve +4°C de muhafaza edildi.

3.4. Spesifik Genler İçin İnternet Kullanarak Primer Dizayn

In situ hibridizasyonu ile Tip60 geni için yapılan gen ekspresyon analizleri için gerekli olan antisens mRNA'nın üretiminde kullanılan Htip2_forward ve Htip2_revers primerlerinin dizaynı aşağıdaki gibi yapıldı

1. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> web sayfası açıldı. Search karesine Nucleotide seçildi, for karesine aratılacak genin Accession number yazıldı ve daha sonra go tuşuna basıldı. Genin Accession number bilinmiyorsa genin kodladığı proteinin ardından da sekansa ulaşılabilir. Search karesine Nucleotide seçildi, for karesine aratılacak proteinin adı yazıldı ve daha sonra go tuşuna basıldı. Burada aradığınız gen kareye çekti. Locus ID üzerine tıklandı ve genin cDNA sekansı elde edildi. Bu sekans kopyalanıp fare non-redundant database karesine blastlandı.
2. Gen sekansının blastlanmasının amacı arandan genin diğer genlerle homolojisinin araştırılması ve diğer genlerle en az homoloji gösteren ksmenden cDNA probu üretilmesinin sağlanmasıdır. Bu yapıldığı takdirde hemen ikinci bakanda diğer birçok genin interferansı giderilmik olur.

Blastlama için <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi> web sayfasına girildi. Nucleotide blast tuşuna basıldı. Açılan web sayfasına yukarıda elde edilen ilgili genin sekansı Enter Query Sequence altındaki kutu içine yapıldı.

Database: Mouse genomic + transcript

Optimize for: Highly similar sequences (megablast)

seçildi. BLAST tuşuna basılarak sorgu başlatıldı. Daha sonra homolojinin olup olmadığının anlaşılması.

Bu sonuca göre genin spesifik probunu elde etmek için gen sekansında en iyi bölge seçimi yapılmalıdır. Diğer genlerle homolojinin en az olduğu bölge seçildi. Bu sekans kopyalanarak primer programında ilgili yere kopyalandı. Genelde prob hazırlamada belirli bir genin tüm cDNA'sı yerine, cDNA'nın belirli bir kısmının elde edilmesi ve çoğaltılması istenir. Ancak bu cDNA'nın büyüklüğü amaca uygun olarak ayarlanmalıdır. Örnek olarak, *in situ* hibridizasyon yöntemiyle gen ekspresyon analizi için cDNA probu, yaklaşık 1000 nükleotid uzunluğunda olmalıdır. 500 nükleotidin altındaki problemlerle sonuç alınması çok zordur.

3. Primer dizaynē için http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi web sayfasına girildi. Kopyalanan gen sekansē kaynak sekans kutusuna yapētēddē ve akaēđdaki bilgiler girildi.

Sequence ID : Genin kēsa adē
 Product Size Ranges : Kētenilen uzunluk
 Primer Size : Min: 19 Opt: 20 Max: 21
 Primer Tm : Min: 57.0 Opt: 60.0 Max: 61.0 Max Tm Dif:100
 Primer GC% : Min: 20.0 Opt: 50 Max: 80.0

ñPick primersō tukuna basēddē Sistem tarafēndan seēilen primerler ekrana geldi. Primerin A veya T ile baklamasē G ve C ile sonlanmasē idealdir. Ayrēca 4 veya daha fazla nūkleotidin pepeke gelmesi nonspesifik baēlanmaya yol aēabilir. Bundan kaēāmalēddē. Bu nedenlerden dolayē programēn verdiē i primerler her zaman uygun olmayabilir. Bu durumda programēn verdiē i bōlgenin civarēnda uygun primerler seēilebilir. Burada left ve right primerleri seēildikten sonra son kontrol olarak iki iklem yapēddē Seēilen her iki primer için ayrē ayrē olarak, bakka genlerle homolojisinin olup olmadēē ēnē belirlenmesi amacēyla blastlama yapēddē Bu iklem yukarēda aēēklandēē ē gibi uygulandē

3.5. RNA Kēolasyonu

cDNA kūtūphanesi olukturmak için, amacēnēza uygun olacak ēekilde fare embriyolarē (E 10.5, E 13.5, E 14.5 vb.) veya fare beyinleri (P0, P7, vb.) alēndē ve kullanēacak zamana kadar -80°Cōde muhafaza edildi. Revers transkriptaz enzimi ve belirtilen kimyasallar kullanēarak cDNA kūtūphanesi akaēđdaki basamaklar da anlatēddēē ē gibi elde edildi.

Hazēlanmēk olan doku veya dokulardan maksimum 40 mg alēnēp, 1,5 mlēdik bir ependorf tūpüne kondu ve sēasē ile kē iklemler yapēddē

1. Tüpün içindeki doku üzerine 800 µl RNAzol B eklendi ve tamamen homojenize oluncaya kadar karıştırıldı. Karıştırma işleminden sonra 80 µl kloroform eklenerek 20 s karıştırıldı. Karıştırıldıktan sonra 5 dakika buz içinde bekletildi.
2. Bekleme işleminin ardından 15 dakika 4°C'de maksimum hızda santrifüj edildi ve süpernatant alındı ve 1 ml %75'lik etanol ile tekrardan çökelek çözüldü ve 5 dakika 4°C'de maksimum hızda santrifüj edildi. Süpernatant tekrardan alınarak çökelek 5 dakika vakum kurutucusunda kurutuldu. Sonra 87 µl DEPC'di su ile 60°C'de 10 dakika bekletilerek çözüldü.
3. Bu işlemin ardından 99 µl su ve 1 µl hazırlanmış RNaz çözeltiden alındı ve 260 nm'de konsantrasyonu ölçüldü ve hesaplama aşağıdaki şekilde yapıldı

$$Ug = OD_{260} \times 310$$
4. Konsantrasyona bakıldıktan sonra DNaz kullanılarak ortamdaki DNA'lar parçalandı. Bunun için aşağıdaki şekilde hazırlandı

Çizelge 3.2. RNA izolasyonu ve DNA parçalamak için hazırlanan karışım.

RNA ekstraktı	86µl
10x PCR2 tamponu	10µl
RNaz inhibitörü	2µl
DNaz I (RNaz'sız)	2µl

5. Hazırlanan karışım 37°C'de 30 dakika inkübe edildi. 150 µl DEPC'di su ve 250 µl PIC (fenol: kloroform: izoamil alkol: 25:24:1 şeklinde) alındı ve 30 dakika bekletilen karışım üzerine eklendi. 5 dakika 4°C'de maksimum hızda santrifüj edildi. Süpernatant başka bir tüpe alınıp 250 µl kloroform eklendi. Tekrardan 5 dakika 4°C'de maksimum hızda santrifüj edildi. Süpernatant yine başka bir tüpe aktarıldı ve 750 µl etanol ile 6,25 µl 3 M sodyum asetat eklendi. 30 dakika 4°C'de maksimum hızda santrifüj edildi ve süpernatant alındı 1 ml etanol çökelek üzerine eklendi ve 5 dakika 4°C'de maksimum hızda santrifüj yapıldı. Süpernatant alındı ve vakum kurutucusunda 10 dakika kurutuldu. Son olarakta 0,5 µg olacak şekilde hesaplama yapıldı ve bulunan miktar DEPC'di suya alınarak 60°C'de 10 dakika bekletilerek çözüldü ve kullanılmaya kadar -80°C'de saklandı

3.6. cDNA Kütüphanesi Hazırlanması (RT PCR)

ThermoScript™ RT-PCR sistemi ile cDNA sentezlendi. Bunun için iki karışım hazırlandı

Karışım 1:

Oligo(dT)-Primer : 3 µl
 RNA : 6 µl (0,5µg/µl)
 DEPC-su : 21 µl

Yukarıdaki miktarlar alındı ve PCR tüpüne kondu, 65°C'de 5 dakika bekletildi.

Karışım 2 (Her bir cDNA stoku için).

5x cDNA sentez tamponu (vortex) : 12 µl
 0,1M DTT : 3 µl
 RnaseOut™ (40 U/µl) : 3 µl
 DEPC-su : 3 µl
 10 mM dNTP-Mix : 6 µl
 ThermoScript™ RT (15 U/µl Polimeraz): 3 µl

Karışım 1'de hazırlanan tüp üzerine karışım 2 eklendi ve vortekslendi. Karışımın ikleminin ardından 60 dakika 50°C'de ve daha sonra 85°C 5 dakika PCR cihazı içinde inkübe edildi. Inkübasyon sonunda 1 µl RNaz ilave edildi. PCR cihazı da 20 dakika 37°C'de bekletilerek reaksiyon durduruldu. Hazırlanan ürün -80°C'de saklandı

3.7. Tip60 Geni İçin cDNA Probenun Hazırlanması

Dizayn edilen primerlerden forward primer (AATGGGTCAGCCCGTAGGGC)ın ucuna T7 promoter dizilimi eklendi. Revers primer (AGTCAATCCGAAGGAGCCGC)ın ucuna ise SP6 promoter dizilimi eklendi. PCR cihazı ile cDNA çözeltide PCR sonrası agaroz jel elektroforezi ile Tip60 geninin sentezlenip sentezlenmediği kontrol edildi. Tip60 geni için yapılan antisens mRNA üretimi sırasıyla aşağıda ifade edilmiştir.

RT-PCR için Kullanılan PCR Programı

LID 105°C WAIT AUTO

1. PAUSE PRESS ENTER
2. T=94°C 4 dakika
3. T=94°C 25 saniye
4. T=57°C 25 saniye
5. T=72°C 1.15 dakika
6. GOTO 3 REP 35
7. T=72°C 9 dakika
8. HOLD 4°C ENTER

Reaksiyon için eppendorf PCR (200µL) tüpü kullanıldı. PCR işlemi ise ilk önce PCR cihazının kapak sıcaklığı 105°C ayarlandı. Daha sonra çalışılan reaksiyon karışımının denatürasyonu için 4 dakika 95°C bekletildi. Bu işlemin ardından 35 kez tekrarlanacak olan reaksiyon işlemlerine geçildi. Burada birinci olarak 94°C de 25 s denatürasyon, 57°C 25 s primerin yapması ve 72°C'de 1.15 dakika cDNA'nın uzaması yapıldı. Bu işlemlerin ardından son basamak olan 72°C'de 9 dakika bekletilerek primerlerin tamamen kalıp DNA dan uzaklaşması sağlandı.

Belirli bir cDNA için yapılan PCR reaksiyon karışımı

Çizelge 3.3. Belirli bir cDNA için yapılan PCR reaksiyon karışımı

H ₂ O	11,85µL
10x Tampon	2,5µL
Q (enhancer)	5µL
dNTP'ler (10mM,roche)	2,5µL
T7 promoter sekansı+Primer for. (10 pmol/ µL)	1µL
SP6 promoter sekansı+Primer rev. (10 pmol/ µL)	1µL
Template (RT-ürünü)	1µL
Enzim Tag-polimeraz	0,15µL

Hazırlanan bu karışım yukarıda yapılan PCR programı çalıştırılarak PCR cihazına yerleştirildi. PCR işlemi bittikten sonra agaroz jel (%1'lik) elektroforeziyle genlere ait templeytlarin sentezlenip sentezlenmediği in bakıldı

3.8. Jel Ekstraksiyon Kiti ile Saflaştırma Protokolü

- Elendiği imiz DNA parçası bisturi ile %1'lik agaroz jelinden kesildi ve ependorf tüpüne kondu.
- Kestiği imiz jelin ağırlığı olan üç katı hacminde QG (guanidin tiyosiyonat içerir) tamponu ilave edildi.
- Jelin QG Buffer içerisinde erimesi için 50°C'deki bama blokunda 10 bekletildi ve her 3 dakikada bir kısa süreli vortekslendi.
- Karışım 2 ml'lik QI Aquick spin kolon tüpüne aktarıldı
- Karışımındaki DNA'nın kolona tutulması için oda sıcaklığında, 13.000 rpm de 1 dakika santrifüj edildi.
- Kolondaki sıvı kışm atıldıktan sonra kolon içerisine 500 µl QG tamponu ilave edildi ve oda sıcaklığında, 13.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
- Sıvı kışm döküldükten sonra kolon içerisine 750 µl PE tamponu ilave edildi ve oda sıcaklığında, 13.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.

- S v  k   m tekrar döküldü, PE tamponunun ihtiya ettiği izopropanolun tamamen uzakla tır lmas i in kolon oda s cakla  nda, 13.000 rpm de 5 dakika santrifüj edildi.
- Daha sonra kolon, 1,5 ml lik steril mikrosantrifüj t p içerisine konuldu ve üzerine 30  l EB (10 mM Tris-HCl, pH 8,5) tamponu ilave edildi ve oda s cakla  nda, 13.000 rpm de 1 dakika santrifüj edildi.
- Santrifüjden sonraki elüsyonda ilgilendiğimiz DNA par as saf olarak elde edildi.

Elde edilen saf DNA probuna ürün miktarı artırılmak için 2. PCR uygulandı ve PCR ürününe, PCR saflaştırma kiti ile saflaştırma uygulandı Uygulanan 2. PCR Çizelge 3.3'de belirtilen PCR hacminin 4 kat fazla olacak şekilde hazırlandı

3.9. PCR Saflaştırma Kiti ve Uygulanan Saflaştırma Protokolü

- 2. PCR ürününün 1 hacmine karışık 5 hacim PB (guanidin hidroklorür ve izopropanol içerir) tamponu eklendi ve karıştırıldı
- Karışım 2 ml'lik QI Aquick spin kolon tüpüne aktarıldı
- Karışımındaki DNA'nın kolona bağlanması için karışım oda sıcaklığında, 13.000 rpm'de 1 dakika santrifüjlendi.
- Sıvı karışım atıldı kolona 750 µl PE tamponu kolona eklendi ve oda sıcaklığında, 13.000 rpm'de 1 dakika santrifüjlendi. Sıvı karışım atılarak kolon aynı tüpe yerleştirildi. PE tamponunun ihtiva ettiği izopropanolün tamamen uzaklaştırılması için ilaveten 5 dakika daha santrifüj yapıldı
- Kolon 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne kondu. DNA'yı elüe etmek için 30 µl EB (10 mM Tris-HCl, pH 8,5) tamponu QI Aquick spin kolonunun merkezine eklendi ve 1 dakika santrifüjlendi.

Santrifüjden sonraki elüsyonda ilgilendiğimiz DNA templeyti saf olarak elde edildi. DNA templeytinin konsantrasyonunu bulmak için aşağıdaki formül kullanıldı:

DNA templeyi konsantrasyonu ($\mu\text{g/mL}$)= A_{260} x seyrelme faktörü x 50

Antisens mRNA üretimi için kullanacağın DNA templeytinin konsantrasyonu minimum 0,5 µg olmalıdır. DNA templeytimizin µg miktarına tekabül eden µl miktarı Çizelge 3.3'de belirtilen miktarın altında veya üstünde ise; kullanılan DEPC-su miktarında azalma veya arttırma yaparak toplam hacmin 20 µl'i akmamasına dikkat edildi.

3.10. Antisens mRNA Üretimi

Hazırlanan cDNA templeytlerini kullanarak antisens mRNA üretimi için ilk olarak Çizelge 3.4'de belirtilen karışım her bir tüp için hazırlandı 1,5ml ependorf tüpü içerisinde hazırlanan karışım 37°C'de 2,5 saat inkübasyona bırakıldı

Çizelge 3.4. Belirli bir antisens mRNA üretimi için hazırlanan karışım.

SP6 RNA polimeraz	1µl
RNAsin	1µl
Dig RNA labeling mix, 10x	2µl
Tampon 10x	2µl
DNA	2µl
DEPC-su	12µl

Daha sonra DNaz ile muamele edilerek DNA'nın sindirilmesi sağlandı Bu amaçla Çizelge 3.5'de belirtilen karışım 1 µl alındı ve 37°C'de 2,5 saat bekletilen reaksiyon tüpüne eklendi. Bu şekilde reaksiyon durduruldu ve ortamda artı kalan cDNA'nın DNaz ile parçalanması sağlandı

Çizelge 3.5. DNA'yı sindiren DNaz karışımı

DNaz I (10U/µl)	0,1 µL
0,3 M MgCl ₂	0,08 µL
H ₂ O	0,82 µL

1. Örneklerin hazırlanması ve dokunun fiksasyonu,

2. Ön hibridizasyon işlemi, probların ilavesi ve hibridizasyon işlemi,
3. Son hibridizasyon işlemi ve spesifik olmayan bağlanmaların giderilmesi, slaytların bir seri çözeltiden geçirilerek ve fikse edilerek üzerlerinin lamelle kapatılması ve örneklerin mikroskopta incelenmesi.

Slaytların sandviç şeklinde hazırlanmasında kullanılan özel camlar bir gece 180°C sıcaklıktaki fırında bekletildi. Kullanılan bütün çözeltilerin büyük bir kısmı otoklavlandı veya özel kaplarda hazırlanmış RNA'ları korumak için DEPC'di su kullanıldı ve böylece RNaz'a karşı korundu. 12,5, 13,5, 14,5 ve 15,5 günlük fare embriyoları ile yetiştirilmiş fare beyni fareden alındıktan sonra OCT (Optimal freezing medium) içine gömüldü. Bu amaçla özel alakalı kaplar kullanıldı. Numuneler bu özel kapların içine konulduktan sonra anı blokla donduruldu ve -70°C'de saklandı (Herzig 2001). Mikrotom cihazı kullanılarak lamalar üzerine belirtilen embriyo ve beyin dokuları için 25 µm'lik doku kesitleri hazırlandı.

A. Slaytların fikse edilmesi

Hazırlanan slaytlardaki dokuların fizyolojik ve moleküler yapılarının korunması için aşağıdaki gibi fiksasyon işlemi robot tarafından yapıldı.

Fiksasyon Basamakları

1. %4'lük PFA ile 25 dakika inkübasyon
2. %0,9'lük NaCl ile 2 dakika inkübasyon
3. %0,9'lük NaCl ile 2 dakika inkübasyon

Asetilasyon Basamakları

1. 400 ml 0,1M TEA çözeltisine 1ml %98 lik asetik anhidrit ilave edildi. 5 dakika manyetik karıştırıcı üzerinde inkübasyondan sonra ikinci kez bu işlem tekrarlandı.

Dehidrasyon Basamağ ę

1XPBS ile 2 dakika inkübasyon

1. %0,9đük NaCl ile 2 dakika inkübasyon
2. %30đük Etanol ile 2 dakika inkübasyon
3. %50đik Etanol ile 2 dakika inkübasyon
4. %70đik Etanol ile 2 dakika inkübasyon
5. %80đik Etanol ile 2 dakika inkübasyon
6. %95đik Etanol ile 2 dakika inkübasyon
7. %100đük Etanol ile 2 dakika inkübasyon
8. %100đük Etanol ile 2 dakika inkübasyon
9. 30°Cđik fāında 3 dakika inkübasyon.

Daha sonra slaytlar *ISH* için -80°Cde muhafaza edildi.

B. Yıkama ve ön hibridizasyon idemleri;

Slaytlar cihaza yerlektirildi ve sēasē ile akağda aęđılanan idemler uygulandē

1. İlk basamakta slaytlarēn üst kēsmēndan 5 kez 5ēer dakika %0,6đđk H₂O₂ (hidrojen peroksit) ilave edilmik CH₃OH (metanol) uygulandē ve ardēndan 8 kez %0,05đik tween içeren 1xPBS ile yękandē
2. Yękamadan sonra 2 kez 4ēer dakika %0,05đik tween içeren 0,2Mđđk HCl ile muamaele edildi. Tekrar 4 kez %0,05đik tween içeren 1xPBS ile yękandē
3. Bu idemden sonra 2 kez 10 dakika 1xPK (proteinaz K) tamponu içinde hazērlanmēk PK (proteinaz K) uygulandē Burada proteinaz Kōnēn konsantrasyonu dokunun türüne göre ayarlandē 8 kez %0,05đik tween içeren 1xPBS ile yękandē
4. Slaytlar 1 kez 10 dakika %0,05đik tween içeren %4đük PFA ile muamele edildi ve 8 kez %0,05đik tween içeren 1xPBS ile yękandē Bu akama hem RNAōnēn yerini bulmasē

için hem de hücre yapışmasını koruması için çok önemlidir. Çapraz bağlanmadan dolayı RNA'nın dokuya ulaşılabilirliğine dikkat edildi.

5. Hazırlık aşamasının son kısmında 2 kez 15'er dakika Hyb-Mix (ISH tamponu) ile muamele edilerek ön hibridizasyon yapıldı

C. Hibridizasyon işlemi; Bu sırada slaytlar 62°C'de 4,5 saat bekletildi. Bunun için her bir slayt, mililitresinde 300 ng prob içeren 300µl hyb mix ile muamele edildi.

D. Spesifik olmayan bağlanmaların giderilmesi; Prob ile muamele görmüş slaytta bulunan doku üzerine çeşitli çözeltiler uygulandı ve bundan sonra da renklendirmeden önce çeşitli spesifik reaktifler eklenip renklendirme çözeltisi ile renklendirildi. Bu şekilde slaytın arka planında, spesifik olmayan ekspresyonların önlenmesine de çalışıldı

1. Slaytlar 5 kez 6'er dakika 5xSSC ile yıkandı Ardından 5 kez 12'er dakika Formamid I çözeltisi ile yıkandı ve ardından 5'er kez 10'er dakika Formamid II çözeltisi ve 4 kez 8'er dakika 0,1xSSC ile yıkandı Bunların 3 tanesi 64°C'de ve 1 tanesi de 25°C olmak üzere yapıldı

2. 4 kez 5'er dakika %0,05 tween içeren 1xNTE ile yıkandı Daha sonra önemli bir basamak olan iyodo asetamid ile yıkama 6 kez 5'er dakika yapıldı Bu basamakta doku üzerinde bulunan enzimler ve bazı protein rezidülerinin aktiviteleri azaltıldı veya tamamen bloke edildi.

3. 4 kez 5'er dakika %0,05 tween içeren 1xNTE çözeltisi ile yıkandı ardından 2 kez 5'er dakika %0,05 tween içeren 1xTNT çözeltisi ilede yıkandı %4 oranında sheep serum içeren çözelti 6 kez 5'er dakika uygulandı

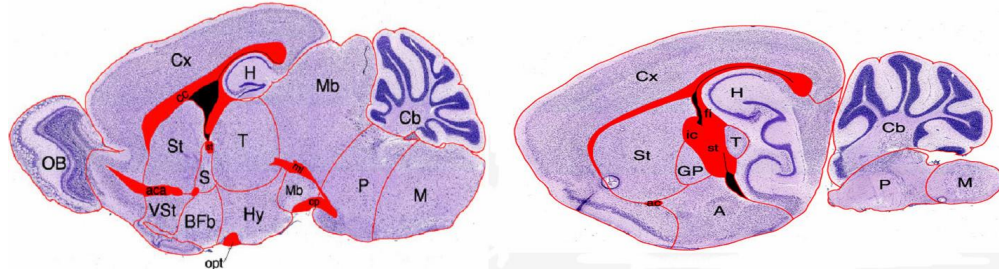
4. 4 kez 5'er dakika % 0,05 tween içeren 1xTNT çözeltisi ile yıkandı Ardından TNB bloking çözeltisi ile 2 kez 5'er dakika yıkandı Bu basamakta spesifik olmayan bağlanmalar giderildi. Ardından tekrar 2 kez 5 dakika %0,05 tween içeren 1xTNT çözeltisi ile yıkandı

5. 2 kez 5'er dakika %0,05 tween içeren maleat çözeltisi ile yıkandı ve bloking reaktifi ile 2 kez 10'er dakika ardından tekrar 2 kez 5'er dakika %0,05 tween içeren maleat çözeltisi ile yıkandı

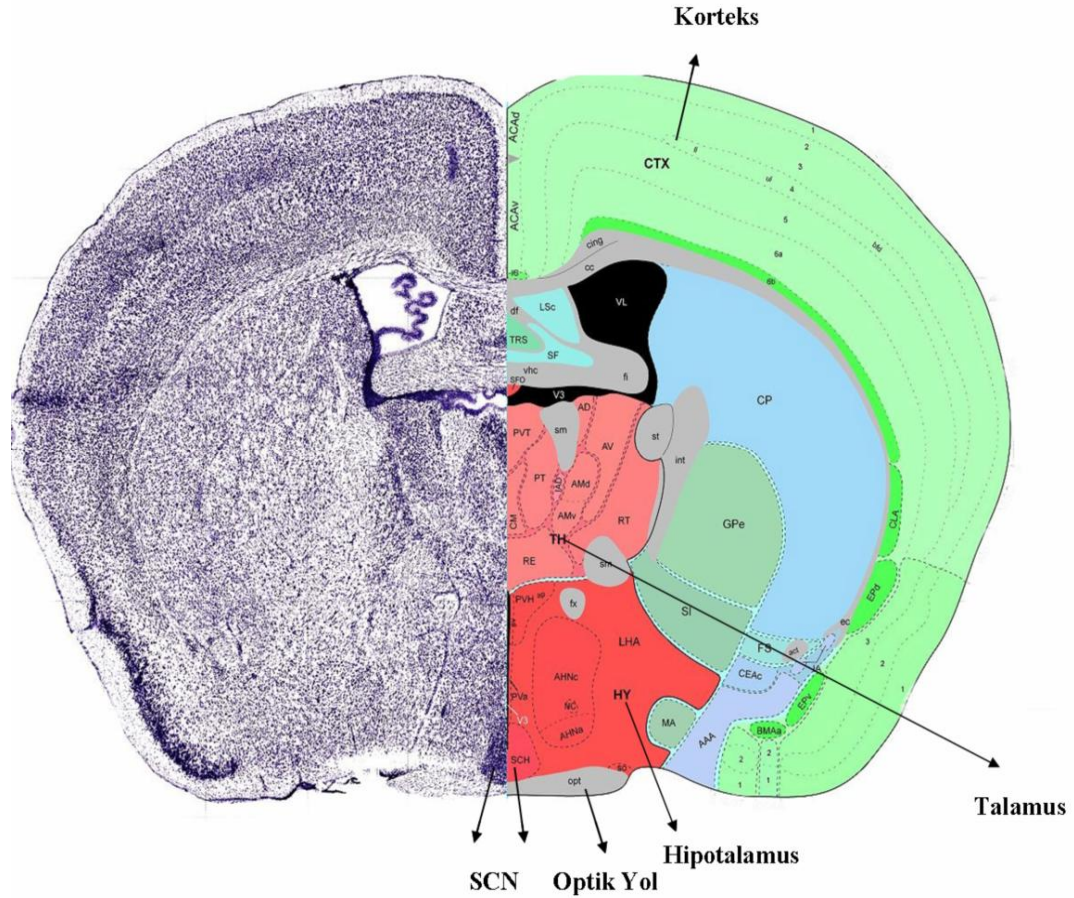
6. 2 kez 5'er dakika %0,05 tween içeren 1xTNT çözeltisi ile muamele edildi ve ardından 2 kez 5 dakikalık %0,05 tween içeren ve her 1 ml'sinde 0,5 mg levamizol ihtiva eden TMN çözeltisi ile slaytlar muamele edildi. 4 kez 5 dakika %0,05 tween içeren 1xTNT çözeltisi ile yıkandı
7. TNB bloking çözeltisi ile 4 kez 10 dakikalık yıkama yapıldı 2 kez 30'er dakika %0,05 tween içeren anti-DIG-POD (TNB çözeltisi içerisinde hazırlanmış dilüsyon faktörü 600'dür.) ile dokular ile reaksiyona sokuldu.
8. 6 kez 5'er dakika %0,05 tween içeren 1xTNT çözeltisi ile yıkandı 1 kez 30 dakika %0,05 tween içeren Tiamin-Biotin reaktifi ile doku reaksiyona sokuldu. Tiamin-Biotin reaktifi kendi özel solusyonu ile hazırlandı
9. 6 kez 5'er dakika %0,05 tween içeren maleat çözeltisi ile yıkandı Neutravidin-alkalin fosfataz (bloking reaktifinin içine dilüsyon faktörü 750 olan Neutravidin-alkalin fosfataz konarak hazırlanmış) reaktifi ile 2 kez 30'er dakika muamele edildi, ardından tekrar 6 kez 5'er dakika %0,05 tween içeren maleat çözeltisi ile yıkandı Bu işlemin ardından 4 kez 5 dakika %0,05 tween içeren 1xTNT çözeltisi ile yıkama yapıldı
10. 2 kez 5'er dakika ve her 1 ml'sinde 0,5 mg levamizol içeren TMN çözeltisi ile yıkama yapıldıktan sonra 3 kez 13'er dakika renk reaktifi ile muamele edildi. Didestile su ile 4 kez 5 dakikalık yıkama yapıldı 1 kez %0,05 tween içeren 1xNTE çözeltisi ile ve 1 kez de %1 oranında glutaraldehit içeren %4 PFA ile 10 dakikalık yıkama yapıldı
11. Son basamak olarak saf su ile 4 kez yıkama yapılarak hibridizasyon bitirildi. Bu aşamalardan sonra slaytlar temizlendi ve bir gece oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı

3.12. Gen Ekspresyon Örneklerinin Değerlendirilmesi

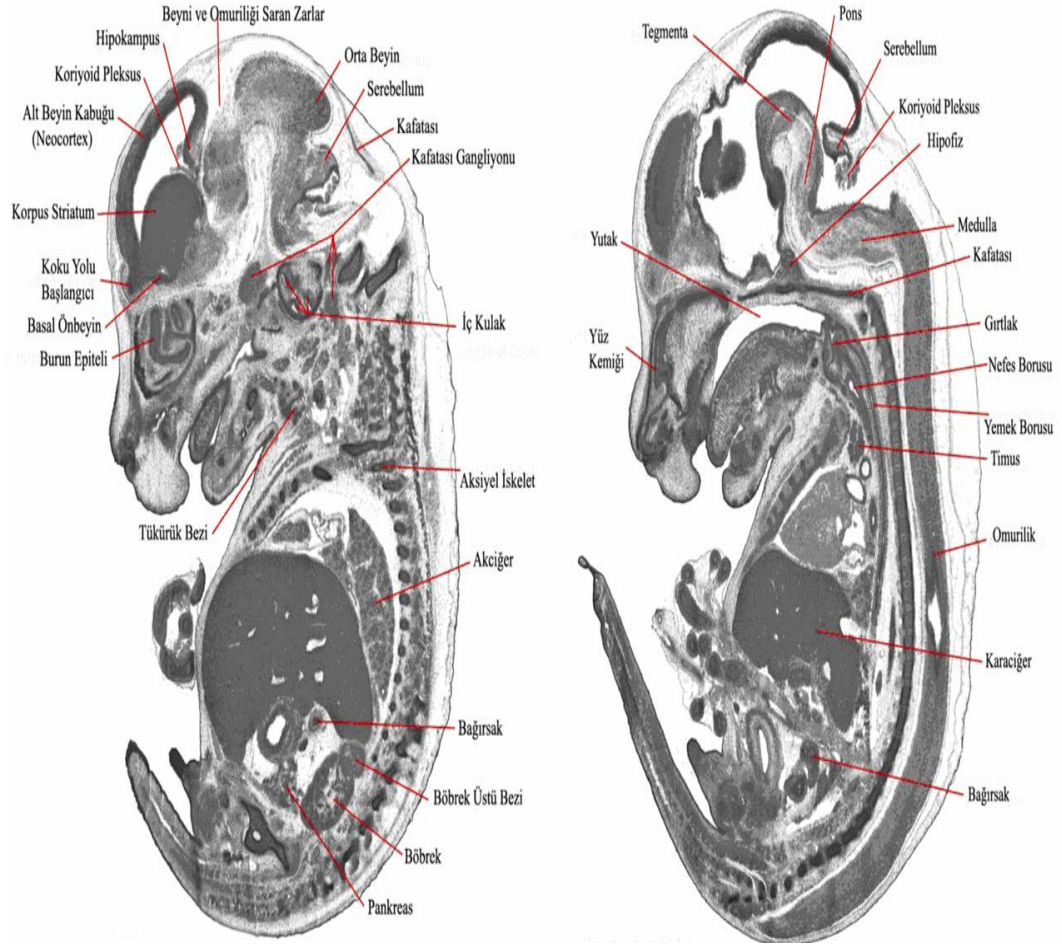
Bir gece oda sıcaklığında bekletilen slaytlar medium ile slayt kaplama cihazında kaplandı ve temizlendi. Kuruması için 37°C'de bir gece bekletildi. Bundan sonra slaytlar mikroskopta incelendi ve taranarak bilgisayar ortamına alındı Bu işlem; ilk önce slaytlar parçalar halinde tarama yapan cihazda taranması ve daha sonra mozaik oluşturma programı ile birleştirildi. Kullanılan bu *ISH* metodunda kullanılan reaktiflerden dolayı ekspresyon gözlenen kâğıtlarda mavi renkli bölgeler oluştu.



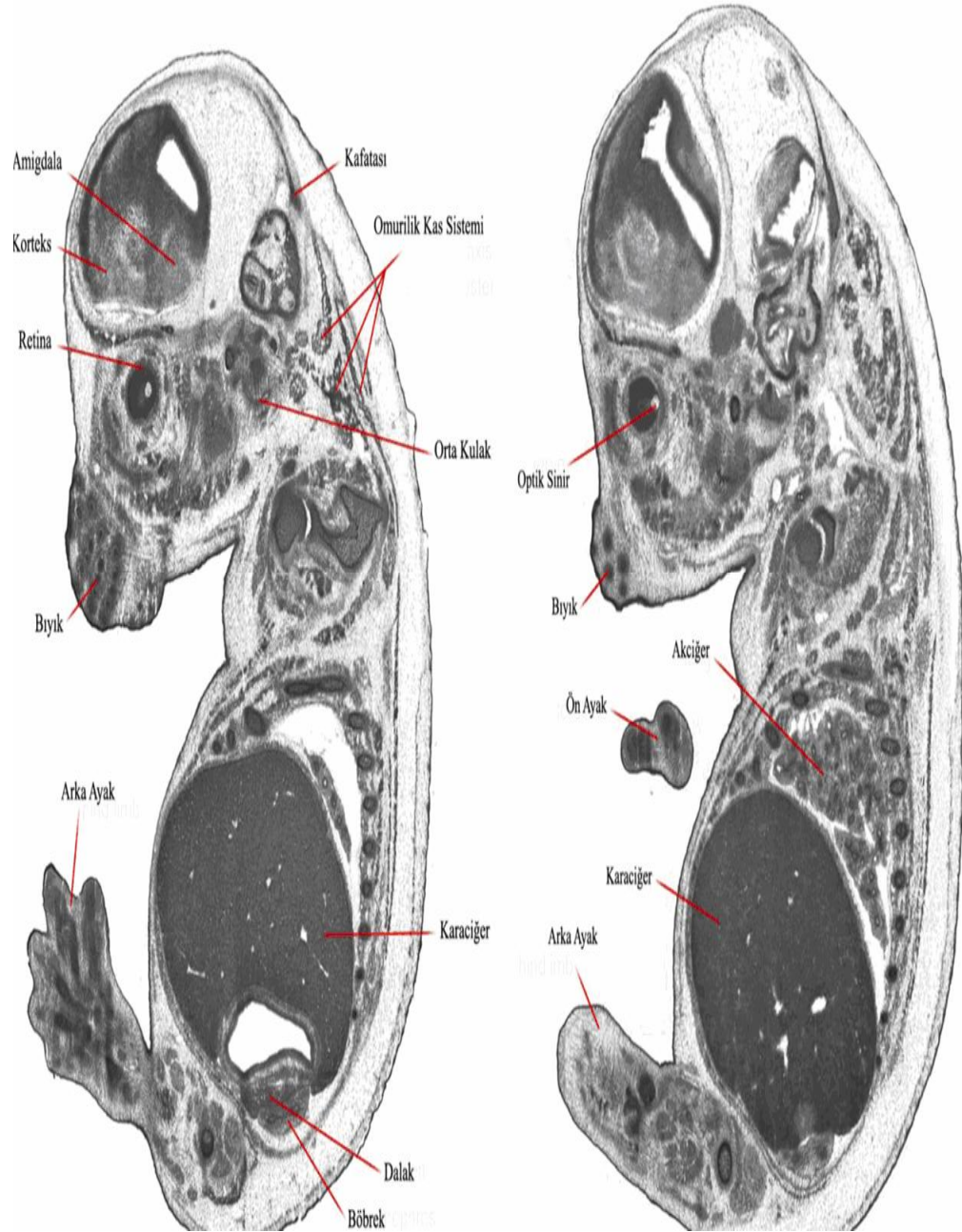
Korteks (Cx:Cortex), Striatum (St: Striatum), Basal Önbeyin (BFb: Basal Forebrain), Pons/Medulla(P:Pons/medulla boundary), Medulla (M:Medulla), Serebellum (Cb:Cerebellum), Hipotalamus (Hy:Hypothalamus), Hipokampus (H:Hippocampus), Koku Yolu Baklangēē (OB : Olfactory Bulb), Orta Beyin(Mb: Midbrain), Talamus (T:Thalamus), Optik Yol ve SCN (opt: Optik Tract)



Şekil 3.1. Sagittal ve koronal beyin kesitleri (<http://www.brain-map.org>)



Şekil 3.2. 14,5 Günlük fare embriyosu kesitleri 1 (<http://www.genepaint.org>)



Şekil 3.3. 14,5 Günlük fare embriyosu kesitleri 2 (<http://www.genepaint.org>)

3.13. Southern Blot Analizi

3.13.1. Southern blot için fare kuyruğ undan genomik DNA izolasyonu

- Fareden 0,5 cm kuyruk kesiti alēndē ve 1,5 mlđik ependorf tüpe konuldu. Kuyruk kesiti alēnacak farenin minimum 3 haftalēk olmasē gerekmektedir.
- 0,5 ml liziz tamponu ve 20 εl proteinaz K (10mg/ml) ilave edildi.
- 56°Cđde 5-15 saat arasē sürekli karēttēđarak (850rpm) inkübasyona bēakēđē
- 0,5 ml fenol/kloroform/izoamilalkol (25:24:1) ilave edildi. En az 30 kez alt-üst edilerek karēttēđē
- Oda sēaclēđēnda 15 dakika 13000 rpm de santrifüj edildi. 350 εl üst fazdan alēndē ve 1,5 mlđik temiz ependorf tüpe transfer edildi. 350 εl izopropanol ilave edilip, en az 30 kez alt-üst edilerek karēttēđē
- Oda sēaclēđēnda 5 dakika 13000rpmđde santrifüj edildi. Süpernatant kēām atēđē Çöken genomik DNA 0,5 ml %70 lik etanol ile 2 kez yēkandē
- 300 εl pH:7,5 TE tamponu iēerisinde çözüldü.

Genomik DNA izole edilirken bazē hususlara dikkat edilmelidir. Genomik DNA'nēn molekül ađ ēlēđē çok büyük olduğ undan karēttēma iēlemi nazik bir kēilde yapđmalēđē. Genomik DNA' ya TE buffer ilave edildikten sonra 56°Cđde 4 saat karēttēmalē ve sonra 37°Cđde geceboyu inkübasyona bēakēđmalēđē.

3.13.2. Embriyonik kök hücrelerinden (ES cell) genomik DNA eldesi

- şirket tarafēndan gönderilen embriyonik kök hücrelerine 0,5 ml liziz tamponu ve 10 εl proteinaz K (10mg/ml) ilave edildi.
- 55°Cđde 5-15 saat arasē sürekli karēttēđarak (850rpm) inkübasyona bēakēđē
- 0,5 ml fenol/kloroform/izoamilalkol (25:24:1) ilave edildi. En az 30 kez alt-üst edilerek karēttēđē

- Oda sıcaklığında 15 dakika 13000 rpm'de santrifüj edildi. Pipetin ucu kesildi ve 450 µl üst fazdan alındı. 1,5 ml'lik temiz ependorf tüpe transfer edildi. 50 µl 3M sodyum asetat pH:5,2 ve 450 µl izopropanol ilave edilip, en az 30 kez alt-üst edilerek karıştırıldı.
- Oda sıcaklığında 10 dakika 13000 rpm'de santrifüj edildi. Süpernatant kesim atıldı. Çöken genomik DNA 0,5 ml %70 lik etanol ile 2 kez yıkandı.
- Etanol tamamen uzaklandıktan sonra 100 µl pH:7,5 TE tamponu içerisinde çözüldü.

3.13.3. Radyoaktif prob üretimi

Tip60 nakavt fare yapışma Upstream bölgesinde bulunan LoxP diziliminin ön kısmına spesifik templeyt PCR ile uygun primerler ve doğal tip genomik DNA kullanılarak üretildi.

- 1 µl templeyt (200ng/ µl), 44 µl TE çözeltisi içerisinde ilave edilip karıştırıldı.
- 95°C'dik 5 dakika ve ardından 5 dakika buz içerisinde bekletildi.
- Denatüre edilen templeyt, random-prime reaksiyon (Rediprime II DNA Labeling System) serisine yavaşca ilave edildi. Kesinlikle pipet ile alt-üst karıştırma yapılmamalıdır.
- Karışma 5 µl izotop ([^{32} P]dCTP) ilave edildi ve en az 30 kez pipet ile alt-üst edilerek karıştırıldı. 37°C'dik 40-60 dakika inkübasyona bırakıldı.
- Karışım, illustra ProbeQuant G-50 Mikro kolonuna aktarıldı. 2 dakika 3000rpm'de santrifüj edildi. Radyoaktif prob toplama tüpüne süzülme.
- Toplama tüpüne süzülen radyoaktif probdan 1 µl alındı. Probun radyoaktif değeri CPM olarak Liquid Scintillation Counter cihazı ile ölçüldü. 1 000 000 CPM (count per minute) probumuz için iyi bir değerdir.

3.13.4. Restriksiyon enzimi ile genomik DNA'nın kesilmesi (Digestion)

Genomik DNA'nın kesilmesi için çizelge 3.6'da belirtilen karışım toplam hacim 50 µl olacak şekilde her bir numune için hazırlanmış 1,5 ml'lik ependorf tüpüne 500ng'ın tekabül ettiği hacimde Genomik DNA, 0,5 µl BSA, 5 µl buffer, 1 µl BamH1 enzimi ilave edildi. Toplam hacim distile su ile 50 µl'ye tamamlandı 37°C'de 20 saat inkübasyona bırakıldı.

Çizelge 3.6. Genomik DNA'nın kesilmesi için hazırlanan karışım

Su (distile)
Bufer (Restriksiyon Enzimine spesifik)
BSA (Bovine Serum Albumin 10mg/ml)
Restriksiyon Enzimi (BamH1)
Genomik DNA

3.13.5. Restriksiyon enzimi ile kesilen genomik DNA'nın agaroz jeline yüklenmesi ve membran'a transferi

%0,6'dan agaroz jeli TAE bufer içerisinde hazırlanmış Her 100 ml agaroz jeli için 7 µl etidyum bromür ilave edildi. Restriksiyon enzimi ile kesilen genomik DNA lara 5 µl DNA yükleme tamponu eklenip, agaroz jeline yüklendi. Elektroforezin yürütme hızı jelin uzunluğu ile birebir doğru orantıda olacak şekilde ayarlandı 2-log DNA markaları kontrol edildi. Yaklaşık 20 saat agaroz jeli yürütülen genomik DNA'nın membrana transferi aşağıdaki gibi yapıldı.

- Genomik DNA'nın yürütüldüğü jel 10 dakika depurination çözeltisi ile 10 dakika yıkanmış
- Ardından jel, 15 dakika alkaline transferaz çözeltisi ile yıkanmış
- Ve sonra 20 dakika alkaline transferaz çözeltisi ile tekrar yıkanmış Bu esnada jel ile aynı boyutta kesilen membran su ile ıslatıldı 15 dakika alkaline transferaz çözeltisi ile yıkanmış

- Sıra ile jelin, üzerine membran, 3 parça blotlama kağıdı bol miktarda kağıt ve ağırlık konuldu. Oda sıcaklığında 10-20 saat bekletildi.
- Tüm genomik DNA'nın membrana geçip geçmediğini kontrol etmek için UV ışık altında hem membran hem de jel kontrol edildi.
- Transferin gerçekleştirilmesini membran neutralization II çözeltisi ile 15 dakika yıkandı ve iki Whatman kağıdı arasında konuldu. Radyoaktif prob ile muamele edilene kadar oda sıcaklığında ve karanlıkta muhafaza edildi.

3.13.6. Hibridizasyon

- Membran rulo şeklindeki cam tüpe konuldu. 2xSSC çözeltisi ile iletildi ve kalan çözelti döklüldü.
- 10 ml hibridizasyon çözeltisi (Modified Church Buffer) tüpün içerisine konuldu. 65°C'lik döner fırında 1 saat inkübasyona bırakıldı. Her 5 dakikadan sonra tüpün içinde biriken hava gazı küküni kapalı açılarak atıldı.
- Radyoaktif prob ilave edildi. 15-20 saat 65°C'lik döner fırında inkübasyona bırakıldı.
- Prob ile hibridizasyon basamağından sonra yıkama basamağına geçildi. Yıkama işlemi 65°C'lik döner fırında yapıldı. Yıkama işleminde kullanılacak çözeltileri kullanmaya başlamadan önce 65 °C'lik su banyosunda ön ısıtma yapıldı.
- Membran %0,1 SDS ihtiva eden 2xSSC ile 2 kez 5 dakika yıkandı
- %0,1 SDS ihtiva eden 1xSSC ile 2 kez 10 dakika yıkandı
- %0,1 SDS ihtiva eden 0,1xSSC ile 4 kez 5 dakika yıkandı

Yıkama işleminden sonra iki tane Whatman kağıdı arasında alınan membran radyoaktif değeri radyoaktivite okuyucu (geiger) ile okundu. Membran kaset içerisine film ile birlikte konuldu. Membranı verdiğini radyoaktif değer ile ters orantı olarak 1-7 gün (radyoaktif değer yüksek ise daha kısa süreli inkübasyon) arasında -80°C de inkübasyona bırakıldı. -80°C den çıkarıldıktan sonra oda sıcaklığına getirildikten sonra fotoğraflandı.

3.14. PCR İle Genotipleme

Çifletirmeler sonrasında elde edilen yavru farelerin genotiplerini belirlenmesi için PCR ile genotipleme yapıldı. Cry1 mutant faresinin genotiplemesinde kullanılan primerlerin sekansları Erasmus Üniversitesi, Hücre Biyolojisi ve Genetik Bölümünden temin edildi (Van der Horst *et al.* 1999). CMV-Cre ve ROSA-Flp fareleri enstitümüzün hayvan bakım evinde stok olarak bulunmaktadır. Bu allelleri genotiplemek için kullanılan primerler standart olarak enstitümüzde mevcuttur. Tip60 Flox ve Syt10-Cre fare dizaynı Dr. Xunlei Zhao tarafından Prof. Dr. Gregor Eichele'nin laboratuvarında dizayn edildi (Şekil 4.20). Bu fareleri genotiplemek için kullanılan primerler bu yapıldıkate alınarak dizayn edildi.

Çizelge 3.7. PCR ile genotiplerede kullanılan primerler ve templeyt uzunlukları

Genotip	Primer Adı	Primer Sekansı	TM	Templeyt Uzunluğu
Flox, Doğal Tip Nakavt	GT short_Rev	GGAAGGTTCAAAATTCAGTAGGC	62°C	Nakavt: 487bp
	LoxP1 For	TCAGAAGATGCACCTTCTGCTGG		Flox: 429bp
	LoxP2 Rev	TGCTTCCGCTTCCTGAATGCTG		Doğal Tip: 331bp
Syt10Cre	Syt_For	AGACCTGGCAGCAGCGTCCGTTGG	64°C	Syt10Cre: 550bp
	Syt_Rev	AAGATAAGCTCCAGCCAGGAAGTC		Doğal Tip: 350bp
	SeGFP_For	GATCACATGGTCTGCTGGAGTTC		
Cry1 Doğal Tip	Cry1-v2_For	GCATGACCCCTCTGTCTGAT	62°C	Cry1 Doğal Tip: 2,2kb
	Cry1-Ex7_Rev	TTCTTGTCCTCAAGGGATCTG		
Cry1 Mutant	Cry1-v2_For	GCATGACCCCTCTGTCTGAT	62°C	Cry1 Mutant: 2,2kb
	Cry1-KI-NEO_For	CGCATCGCCTTCTATCGCCT		
CMV Cre	Cre_For	CGATGCAACGAGTGATGAGGTTTCG	55°C	CMV Cre: 280bp
	Cre_Rev	AGCATTGCTGTCACTTGGTCGTGG		
Flp	FLPe_For	GCATCATGTGCTGCTGAACTAACC	62°C	Flp: 300bp
	FLPe_Rev	AGTGATCTCCCAGATGCTTTTCACC		

- Genotipi belirlenecek ve 3 haftalık erginliğe ulaşmak farelerden 0,5 cm uzunluğunda kuyruk kesiti alınıp 1,5 ml'lik ependorf tüpe kondu.
- 200 µl PBDN çözeltisi ve 3 µl Proteinaz K (10mg/ml) ilave edildi.

- 55°C'de 5-20 saat karıştırılarak inkübasyona bırakıldıktan sonra 85°C'de karıştırılmadan 1 saat bekletilerek Proteinaz K'a inhibe edildi..
- Kıs süreli santrifüjden sonra PCR genotipleme için 1 μ l (100ng/ μ l) kullanıldı

3.14.1. Flox, doğal tip, nakavt ve Syt10-Cre genotiplerede kullanılan PCR karışımı ve programı

Çizelge 3.8'de ifade edilen karışım her bir genomik DNA örneği için hazırlanmış PCR programı çalıştırılarak PCR cihazına yerleştirildi. PCR işlemi sonrasında herbir tüpe 2 μ l DNA yükleme tamponu koyuldu ve %2'lik agaroz jelde, 120 voltta 25 dakika yürütüldü. UV ışık altında sonuç kontrol edildi. Herbir genotipleme için kullanılan primerlerin sekansı, templeyt uzunluğu ve T_M sıcaklığı Çizelge 3.7'de gösterildi.

Çizelge 3.8. PCR ile flox, doğal tip, nakavt ve Syt10Cre genotiplemek için hazırlanan karışım.

Didestile su	12,85
10XBufer	2 μ l
dNTP(2mM)	2 μ l
BioTherm Taq DNA pol.	0,15 μ l
GT short_Rev (20 μ mol/ μ l)	1 μ l
LoxP1 For (20 μ mol/ μ l)	1 μ l
LoxP2 Rev (20 μ mol/ μ l)	1 μ l
Kuyruk Genomik DNA'sı	1 μ l
Toplam	21 μ l

Genotipleme için kullanılan PCR programı

LID 105°C WAIT AUTO

1. PAUSE PRESS ENTER
2. T=94°C 4 dakika
3. T=94°C 25 saniye
4. T=55-64 °C 25 saniye

5. T=72°C 25 saniye
6. GOTO 3 REP 30
7. T=72°C 10 dakika
8. HOLD 4°C ENTER

Reaksiyon için eppendorf PCR (200µL) tüpü kullanıldı. PCR iklleminde ilk olarak PCR cihazının kapak sıcaklığı 105°C ayarlandı daha sonra çalışılan reaksiyon karışımının denatürasyonu için 4 dakika 94°C'de bekletildi. Bu ikllemin ardından 30 kez tekrarlanacak olan reaksiyon ikllemlerine geçildi. Burada birinci olarak 94°C de 25 s denatürasyon, primerin yapışması için sıcaklığı kullandın primerin özelliğine göre 55-64°C arasında 25 s ve polimerizasyon için 72°C'de 25 s. Bu ikllemlerin ardından son basamak olan 72°C'de 10 dakika bekletilerek primerlerin tamamen kalıp DNA'dan yani genomik DNA'dan uzaklaşmasını sağlandı.

3.14.2. Doğal tip ve mutant Cry1 genotiplerinde kullanılan PCR karışımı ve programı

Çizelge 3.9'da ifade edilen karışım Cry1 doğal tip genotiplerinde yapıldı. her bir genomik DNA için hazırlanmış ve PCR programı çalıştırılarak PCR cihazına yerleştirildi. PCR ikllemi sonrasında her bir tüpe 2µl DNA yükleme tamponu koyuldu ve %0,6'lık agaroz jelde, 120 voltta 25 dakika yürütüldü. UV ışık altında sonuç kontrol edildi. Cry1 mutant genotiplerinde yapıldı. Primer [10pmol/µl]: Cry1-Ex7_rev primeri yerine Primer [10pmol/µl]: Cry1-KI-NEO_for primeri kullanıldı. Herbir genotipleme için kullanılan primerlerin sekansı, template uzunluğu ve T_M sıcaklığı Çizelge 3.7'de gösterildi.

Çizelge 3.9. PCR ile doğ al tip ve mutant Cry1 genotiplemek için hazırlanan karışım

Didestile su	17 �l
10x Ammonium buffer	2,5 �l
dNTP [10mM]	1 �l
Primer [10pmol/�l]: Cry1-v2_fw	1 �l
Primer [10pmol/�l]: Cry1-Ex7_rev	1 �l
MgCl ₂	1 �l
AmpliqonTaq DNA pol	0,5 �l
Kuyruk Genomik DNA'sı	1 �l
Toplam	25�l

Genotipleme için kullanılan PCR programı

LID 105°C WAIT AUTO

1. PAUSE PRESS ENTER
2. T=95°C 3 dakika
3. T=95°C 30 saniye
4. T=62°C 30 saniye
5. T=72°C 4 dakika
6. GOTO 3 REP 38
7. T=72°C 10 dakika
8. HOLD 4°C ENTER

3.15. Fare Beyninden Total Proteinin Ekstrakte Edilmesi

- 9 haftalık fare beyni alınarak kullanıma kadar -80°C'de muhafaza edildi.
- Bir havan içerisinde sıvı azot ile parçalama yapıldı. Sıvı azot ilavesi en az 3 kere tekrarlandı.
- 1 Fare beyni için 3,5 ml liziz buffer ilave edildi ve 19G'dik kaba ile homojen bir karışım elde edilene kadar karıştırma işlemi yapıldı.
- Homojenat 8000 rpm, 4°C'de 20 dakika santrifüjlendi.
- Süpernatant alındı ve 40000 rpm, 4°C'de 30 dakika tekrar santrifüj edildi.

- Süpernatant alânde ve alikuatlara ayrâdâ-20°C'de kullanâdana kadar saklandâ

Liziz tamponu kullanmaya bağlamadan önce 25 ml alânde ve 10 mM 6-merkaptô etanol ve 1 tablet proteaz inhibitörü ilave edildi.

3.16. Western Blot Tekniğinin Uygulanmasâ

3.16.1. SDS-PAGE jelinin hazârlanmasâ ve yüklenmesi

Deneyin amacâna göre hangi yüzdelik jeli hazârlamamâz gerektiği i belirlendikten sonra Çizelge 3.10â göre jel hazârlandâ Jel iki kâşândan oluğu. Yükleme jeli ve ayâma jeli. Proteinler yüklenmeden önce konsantrasyon ölçümü Bradford yöntemi ile yapıdâ ve 1xSDS-PAGE yükleme tamponu ilave edildi. 95°C'dik âşâma blokunda 10 dakika bekletilerek proteinler denatüre edildi. 10 dakika sonunda numuneler buz içine transfer edilerek yüklemeden önce en az 10 dakika daha bekletildi. Numune yükleme jeline yüklendikten sonra 50 Voltta 30 dakika elektroforezde yürütüldü ve numune ayâma jeline geçmeye bağladâ ânda voltaj 120 volta yükseltildi ve 90 dakika daha yürütmeye devam edildi.

Çizelge 3.10. SDS-PAGE jel elektroforezi için kullanâlacak ayâma jeli değ erleri

Jel Yüzdesi	%6	%8	%9	%10	%12
Didestile Su	7,9 ml	6,9 ml	6,45 ml	5,9 ml	4,9 ml
%30Akril Amid	3 ml	4 ml	4,5 ml	5 ml	6 ml
1,5M Tris pH:8,8	3,8 ml	3,8 ml	3,8 ml	3,8 ml	3,8 ml
%10SDS	0,15 ml	0,15 ml	0,15 ml	0,15 ml	0,15 ml
%10 Amonyum persülfat	0,15 ml	0,15 ml	0,15 ml	0,15 ml	0,15 ml
TEMED	0,012 ml	0,009 ml	0,075 ml	0,006 ml	0,006 ml
Toplam	15 ml	15 ml	15 ml	15 ml	15 ml

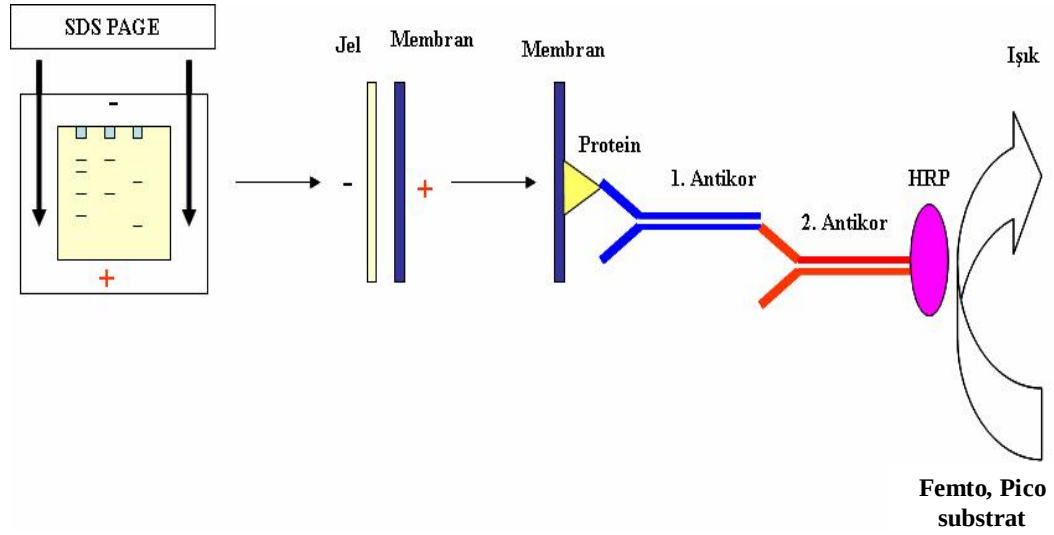
Çizelge 3.11. SDS-PAGE jel elektroforezi için kullanılacak yükleme jeli değerleri

Toplam	1 ml	2 ml	3 ml	4 ml	5 ml
Didestile Su	0,68 ml	1,4 ml	2,1 ml	2,7 ml	3,4 ml
%30Akril Amid	0,17 ml	0,33 ml	0,5 ml	0,67 ml	0,83 ml
1M Tris pH:6,8	0,13 ml	0,25 ml	0,38 ml	0,5 ml	0,63 ml
%10SDS	0,01 ml	0,02 ml	0,03 ml	0,04 ml	0,05 ml
%10 Amonyum persülfat	0,01 ml	0,02 ml	0,03 ml	0,04 ml	0,05 ml
TEMED	0,001 ml	0,002 ml	0,003 ml	0,004 ml	0,005 ml

3.16.2. Jeldeki proteinin membrana transferi ve film edilmesi

SDS-PAGE jeli üzerinde molekül ağırlığına göre ayrılan proteinler membrana transfer edildi. Bunun için sandviç takımı kullanıldı. Bundan sonraki basamakları aşağıda maddeler halinde verilmiştir.

- Membranlar kullanılmadan önce metanol ile 5 dakika muamele edildikten sonra transfer buffer ile de 5 dakika muamele edildi.
- Sandviç takımının içerisine sıra ile 2 parça blot kağıdı, jel, membran, 2 parça blot kağıdı konuldu ve takım kapatıldı.
- 4°C'de içerisinde transfer buffer olan tankın içine kondu ve 400 amper'de 70 dakika elektriksel alana kondu.
- Membran 10 dakika TBST ile muamele edildi.
- 1 saat oda sıcaklığında blokama çözeltisi (%5 Skim milk powder) ile muamele edildi.
- 4°C'de 1 gece antikor ile inkübasyona bırakıldı.
- Membran 6 kez 5 dakika TBST ile yıkandı.
- Oda sıcaklığında 1 saat HRP antikoruna inkübasyona bırakıldı.
- Membran 6 kez 5 dakika TBST ile yıkandı.
- Femto ve Pico substratları kullanılarak antikorun kimyasal sinyal oluşturmaya sağlandı.
- Membranın filmi çekildi.



Şekil 3.4. Western blot tekniğinin şematik ifadesi.

3.17. Antikor Geliştirilmesi

Karakterize etmeye çalıştığımız Tip60 geni alternatif splicing sonucunda ekzon 5'i kaybederek b izoformunu oluşturduğunu ve Ü izoformu ise bu olaya maruz kalmadığından dolayı ekzon 5'i içerdiğini belirtmiştik. Bu sebepten dolayı iki farklı antikor üretmeye çalıştık. Sadece ekzon 5'e spesifik olan Tip60Ex5 ve her iki izoformda spesifik olan Tip60Nt antikorlarını üretmeye çalıştık.

Tip60Ex5 antikorunu üretmek için, belirttiğimiz üzere Ekzon5'e spesifik peptit dizilimini içeren kışın GST füzyon protein olarak klonlama yöntemi ile elde edildikten sonra, 2 farklı tavıcana enjekte edildi. Tip60Nt antikorunu üretmek içinde aynı strateji izlenerek N terminal kısmı spesifik peptit dizilimini içeren kışında GST füzyon protein olarak klonlama yöntemi ile elde edildi ve 2 farklı tavıcana enjekte edildi. Bu işlemler Pineda Antikörper-Service şirketine yaptırıldı. 120 günlük immünizasyondan sonra şirketin gönderdiği serumlar için western blot yapılarak antikorların amacımıza uygunluğu test edildi.

N Terminal

Tip60b 1 MAEVGEIIEGCRLPVLRRNQDNEDEWPLAEILSVKDISGRKLFYVHYIDFNKRLDEWVTH
Tip60a 1 MAEVGEIIEGCRLPVLRRNQDNEDEWPLAEILSVKDISGRKLFYVHYIDFNKRLDEWVTH

Tip60b 61 ERLDLKKIQFPKKEAKTPTKNGLPGSRPGSPEREV-----
Tip60a 61 ERLDLKKIQFPKKEAKTPTKNGLPGSRPGSPEREVPASAQASGKTLPIPVQITLRFNLPK

Ekzon 5

Tip60b 96 -----K RKVEVVSPATPVPSETAPASVFPQNGAARRAV
Tip60a 121 EREAI PGGE PDQPLSSSSCLQPNHRSTK RKVEVVSPATPVPSETAPASVFPQNGAARRAV

Tip60b 129 AAQPGRKRKSNCLGTDEDSQDSSDGIPSAPRMTGSLVSDRSHDDIVTRMKNIECIELGRH
Tip60a 181 AAQPGRKRKSNCLGTDEDSQDSSDGIPSAPRMTGSLVSDRSHDDIVTRMKNIECIELGRH

Çinko Parmak Motifi

Tip60b 189 RLKPWYFSPYPQELTTLPVLYLCEFCCLKYGRSLKCLQRHLTKCDLRHPPGNEIYRKGTIS
Tip60a 241 RLKPWYFSPYPQELTTLPVLYLCEFCCLKYGRSLKCLQRHLTKCDLRHPPGNEIYRKGTIS

Tip60b 249 FFEIDGRKNKSYSQNLCLLAKCFLDHKTLYYDTPDPLFYVMTEYDCKGFHIVGYFSKEKE
Tip60a 301 FFEIDGRKNKSYSQNLCLLAKCFLDHKTLYYDTPDPLFYVMTEYDCKGFHIVGYFSKEKE

Asetil CoA Bağlama Bölgesi

Tip60b 309 STEDYNVACILTLPPYQRRGYRKLLIEFSYELSKVEGKTGTPEKPLSDLGLLSYRSYWSQ
Tip60a 361 STEDYNVACILTLPPYQRRGYRKLLIEFSYELSKVEGKTGTPEKPLSDLGLLSYRSYWSQ

Tip60b 369 TILEILMGLKSESGERPQITINEISEITSIKKEDVISTLQYLNININYYKGQYILTLSEDI
Tip60a 421 TILEILMGLKSESGERPQITINEISEITSIKKEDVISTLQYLNININYYKGQYILTLSEDI

LxxLL Motifi

Tip60b 429 VDGHERAMLKRLLRIDSKCLHFTPKDWSKRGKW
Tip60a 481 VDGHERAMLKRLLRIDSKCLHFTPKDWSKRGKW

Şekil 3.5. Antikor üretiminde kullanılan Tip60 proteininin amino asit dizilimi.

3.18. Tip60Ex5 Antikorumun Spesifikliğinin Kontrolü

1. Kullanılan ve tavıkan 2âden üretilen Tip60Ex5 antikorumun konsantrasyonu 24,3 ϵ g/ ϵ l ve antikoru bloklamak için kullandđđđđđ Tip60Ex5 GST füzyon proteinin konsantrasyonu 1,8 ϵ g/ ϵ l olarak hesaplandı

2. Western blot yapđırken proteinleri transfer ettiğimiz membranē içerisinde antikor ihtiva eden bloklayıcı çözeltisi ile gece boyu inkübasyona bırakıldı. Bu deneyde ilk olarak Tip60Ex5 antikorunu, Tip60Ex5 GST füzyon proteini ile bloke edilip membrandaki Tip60 proteinin Üzoförünü algılamasını engellemek için bloklayıcı (%5 Normal Goat Serum) çözeltisinin içerisinde aynı konsantrasyonda Tip60Ex5 antikor ve Tip60Ex5 GST füzyon proteini ilave edildi. İki saat oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. Proteinlerin transfer edildiği membran bu 2 saatlik inkübasyondan sonra muamele edildi. Bu işleme paralel olarak aynı özelliklere sahip membran sadece Tip60Ex5 antikoruna karşı inkübasyona bırakıldı.
3. SDS-PAGE jelinin (akrilamid jeli) her bir kuyusuna 10 µg protein ekstraktı eklendi. Yüklenen örneklerin toplam hacmi 20 µl ve bu miktara tamamlamak için 1xSDS-PAGE yükleme tamponu kullanıldı.
4. Diğer deney basamakları 3.16.2'de anlatılan western blot basamakları ile aynı şekilde yapıldı.

3.19. Tip60Nt Antikörünün Saflaştırılması

- 3 mg peptit 50 µl DMSO içerisinde çözöldü ve bir hacim PBS çözeltisi ile 500 µl'ye tamamlandı. 2 mg SMCC ile aktive edilmiş BSA (Maleimide activation of carrier protein and conjugation of sulfhydryl-peptide) ilave edildi. 3 saat oda sıcaklığında yavaş bir şekilde çalkalanarak inkübasyona bırakıldıktan sonra bir hacim PBS çözeltisi ile 1 ml'ye tamamlandı.
- K7 matriksi ile 2 saat oda sıcaklığında yavaş bir şekilde çalkalanarak inkübasyona bırakıldı.
- Sıvı kışın atıldı ve 1M Tris tamponuyla (pH:7-8 arası) ile 1 saat oda sıcaklığında yavaş bir şekilde çalkalanarak inkübasyona bırakıldı.
- Matriks 5 ml'lik kolona alındı ve sıvı kışın atıldıktan sonra 4°C'de PBS (pH: 7,2) çözeltisi ile yıkama yapıldı ve yaklaşık olarak 5 ml PBS (pH: 7,2) çözeltisi kullanıldı.
- 10 ml Tip60Nt antikor (Serum olarak) ilave edildi ve 4°C'de 1 gece yavaş bir şekilde çalkalanarak inkübasyona bırakıldı.

- 4°C'de serum atıld ve PBS (pH: 7,2) çözeltisi ile yıkama yapıld (yaklaşık olarak 20 ml PBS (pH: 7,2) çözeltisi kullanıldı)
- 4°C'de PBS (pH: 4,8) çözeltisi ile ikinci yıkama yapıld (yaklaşık olarak 10 ml PBS (pH: 4,8) çözeltisi kullanıldı)
- 4°C'de 100 mM Glisin (pH: 2,6) çözeltisi ile elüatlar alındı Elüat almaya başlamadan önce elüsyon için kullanılacak 1,5 ml'lik ependorf tüplerine 200 µl Tris (pH: 8,8) çözeltisi konuldu ve her bir tüp için toplam elüsyon hacmi 1 ml olacak şekilde toplandı (Yaklaşık olarak 10 tüp elüat toplandı).
- Elüatların 280 nm'de absorbansına bakıldı Belli bir tüp sayısına kadar (5. tüp) absorbans devamlı yükseldi ve daha sonra ani bir düşüş (5. tüpten sonra) gösterdi.
- İlk beş tüpteki elüatlar için diyaliz işlemi yapıld
- Kolon PBS (pH: 7,2) ile yıkandı 3 mM NaN₃ kolon içerisine konuldu ve bu şekilde 4°C'de muhafaza edildi.

3.19.1. Saflaştırılan antikor için diyaliz işlemi

1. 20 cm uzunluğunda diyaliz torbası %0,3'dük H₂SO₄ çözeltisi ile 80°C'de 1 dakika ısıtıldı
2. 60°C sıcaklıktaki su içerisinde 2 dakika yıkandı
3. %0,3'dük H₂SO₄ çözeltisi içerisinde 80°C'de 1 dakika ısıtıldı
4. 60°C sıcaklıktaki su içerisinde tekrar 2 dakika yıkandı
5. Yaklaşık 5 ml elüat diyaliz torbasının içerisine konuldu ve milliQ su ile hazırlanmış 1xPBS'e karıştı gece boyu diyalize bırakıldı Bu esnada 3 saat ara ile PBS çözeltisi 2 kez değiştirildi.
6. Antikor alikuatlarına ayrıldı -80°C'de muhafaza edildi.

3.19.2. Tip60Nt antikorunun spesifikliği için kontrolü

1. Tavşan 2'den üretilen ve epitop kolonu ile saflaştırılan Tip60Nt antikorunun konsantrasyonu Bradford yöntemi ile 0,84 µg/µl olarak hesaplandı Antikoru bloklamak için kullandığımız peptidin konsantrasyonu ise 1,8 µg/µl

2. Western blot yapđırken proteinleri transfer ettiğimiz membranē içerisinde antikor ihtiva eden bloklama çözeltisi ile 4°C’de gece boyu inkübasyona bēakmāttđk. Bu deneyde ilk olarak Tip60Nt antikorunu, saflaķtırma iķleminde kullandđđmēz peptit ile bloke edip membrandaki Tip60 proteinin Ő ve 6 izoformlarēnē algđamasēnē engellemek için bloklama (%5 Normal Goat Serum) özeltisinin içerisine aynē konsantrasyonda olacak ķekilde Tip60Nt antikorunu ve peptit ilave edildi. 1,5 saat oda sēaclđđđnda inkübasyona bēakēddē Proteinlerin transfer edildiği membran bu 2 saatlik inkübasyondan sonra 4°C de gece boyu muamele edildi. Bu iķleme paralel olarak aynē özellikler sahip membran sadece Tip60Nt antikoruna karkē 4°C de gece boyu inkübasyona bēakēddē
3. SDS-PAGE jelinin (akrilamid jeli) her bir kuyusuna 10 εg protein ekstraktē yüklendi. Yüklenen örneklerin toplam hacmi 20 εl ve bu miktara tamamlamak için 1xSDS-PAGE yükleme tamponu kullanēddē
4. Diğer deney basamaklarē 3.16.2’de anlatđđan western blot basamaklarē ile aynē ķekilde yapēddē

3.20. Antikor Ėe Doku Boyamasē

3.20.1. Kesitlerin fikse ve dehidre edilmesi

7 εm kalēnlđđđda OCT (frozen section) beyin kesitleri hazēlandē Aķađđdaki gibi fikse edildi.

Fiksasyon Basamađđē

1. %4đđđk PFA ile 15 dakika inkübasyon
2. %0,9đđđk NaCl ile 2 dakika inkübasyon
3. %0,9đđđk NaCl ile 2 dakika inkübasyon

Dehidrasyon Basamağ ę

1. 1xPBS ile 2 dakika inkübasyon
2. %0,9đluk NaCl ile 2 dakika inkübasyon
3. %30đluk Etanol ile 2 dakika inkübasyon
4. %50đlik Etanol ile 2 dakika inkübasyon
5. %70đlik Etanol ile 2 dakika inkübasyon
6. %80đlik Etanol ile 2 dakika inkübasyon
7. %95đlik Etanol ile 2 dakika inkübasyon
8. %100đük Etanol ile 2 dakika inkübasyon
9. %100đük Etanol ile 2 dakika inkübasyon
10. 30°Cđik fēānda 3 dakkika bekletildi.

Daha sonra slaytlar antikor ile doku boyama iğlemi için -80°Cđde muhafaza edildi.

3.20.2. Slaytlarē floresan olarak boyanmasē

- -80°Cđde saklanan kesitler (slayt) 15 dakika oda sēaclē ānda bekletildi.
- Slaytlar 37°Cđik fēānda 1 saat bekletildi.
- 45 dakika oda sēaclē ānda 1xPBS çōzeltisi ile muamele edildi.
- Slaytlar 1xTBS (pH: 9,0) çōzeltisi ile 60°Cđik su banyosunda 5 saat inkübe edildi.
- 1xPBS çōzeltisi ile kēsa süreli yēkandē
- Bloklama Basamağ ē %10đluk FCS çōzeltisi, 1xPBS çōzeltisi ile hazēlanēp oda sēaclē ānda 1 saat slaytlarla inkübe edildi.
- 1. Antikoru inkübe asamağ ē %10đluk FCS çōzeltisi içerisinde istenilen oranda 1. antikorlar seyreltildi ve 4°C gece boyu inkübasyona bērakēdē Tip60Ex5 antikoru 1/50 oranēnda seyreltildi.
- Slaytlar 1xPBS çōzeltisi ile 3 kez 5 dakika yēkandē
- 2. Antikoru inkübe basamağ ē Alexa 488 antikoru %10đluk FCS çōzeltisi ile 1/500 oranēnda seyreltildi ve slaytlarla 1 saat oda sēaclē ānda muamele edildi.
- Slaytlar 1xPBS çōzeltisi ile 3 kez 5 dakika yēkandē

- DAPI ile boyama basamağı 0,5 mg/ml konsantrasyonuna sahip DAPI stok'u dd su içerisinde 1/100 oranında seyreltildi. Oda sıcaklığında 3 dakika slaytlar ile inkübe edildi.
- Slaytlar 1xPBS çözeltisi ile 3 kez 5 dakika yıkandı
- Slaytlar dd su ile 3 kez 5 dakika yıkandı
- Slaytlar medium ile kaplanıp 4°C'de karanlık bir ortamda saklandı

3.21. İmmunopresipitasyon (antikor ile çöktürme)

3.21.1. İmmunopresipitasyon için fare beyninden total proteinin ekstrakte edilmesi

İmmunopresipitasyon için hazırlanan liziz tamponunu kullanmaya başlamadan önce her 10 ml liziz tamponu için, 2ml dd suda çözülen 1 tablet proteaz inhibitörü çözeltisinden 0,6 ml ilave edildi.

- Bir fare beyni için 2 ml hazırlanan liziz tampon ve proteaz inhibitör çözeltisinden ilave edildi.
- Mikro pestil ile doku homojen hale gelinceye kadar ezildi.
- 4°C'de ultrasonikasyon ile 3 dakika organelleri parçalama işlemi yapıldı
- 4°C'de ve 5000 rpm de 5 dakika santrifüj yapıldı
- Son olarak Bradford yöntemi ile konsantrasyon ölçümü yapıldı ve kullanılmayacak protein alikuatları ayrılarak -80°C'de muhafaza edildi.

3.21.2. İmmunopresipitasyon protokolü

- 2 ml lik ependorf tüpüne 100 µl beads (protein G-agaroz) konuldu.
- Liziz tampon ve proteaz inhibitör çözeltisinden 500 µl ilave edildi. 4°C'de ve 5000 rpm de 30 saniye santrifüjlendi. Süpernatant atıldı Bu işlem 3 kez tekrarlandı (bu işlemler sıcaklık değişiminden çok çabuk etkilendiğinden dikkatli olunmalıdır ve mümkün ise buz üzerinde çalışmalıdır).

- Son yıkama basama  ndan sonra tüpe 200  l liziz tampon ve proteaz inhibitör çözeltisi ve   ng r len oranda antikor eklendi. Tip60 ve Cry1 antikorlar  1/50 oranında eklendi.
- 4 C'de 3 saat boyunca Protein G-Agaroz ile antikorlar inkübasyona b rak ld . Böylece antikorlar beadslere ba  land .
- 3 saat inkübasyonun sonunda tüpe direkt olarak 500  l soğuk (ice cold) 1XPBS eklendi.
- 4 C'de ve 5000 rpm'de 1 dakika santrifüjlendi ve süpernatant at ld . Bu işlem 3 kez tekrarlandı.
- Süpernatant iyice uzakla  rd ktan sonra 10-15 ng protein ekstraktı eklendi. 4 C'de gece boyu (yakla k 12-14 saat) dönme dolap içerisinde inkübasyona b rak ld . Bu basamakta kulland     n z antikor spesifik oldu  u proteine ba  land .
- Tüpe direk olarak 500  l soğuk (ice cold) 1xPBS eklendi ve 4 C 5000 rpm'de 1 dakika santrifüjlendi. Bu yıkama işlemi minimum 5 kez tekrarlandı.
- Süpernatant k   n iyice uzakla  rd ktan sonra 100  l (başlangıçta ekledi imiz protein G-agaroz miktarı kadar olacak şekilde) 3xSDS-PAGE yükleme (loading) tamponu ilave edildi.
- 95 C'de 10 dakika kaynat ld ktan sonra buz içerisinde minimum 10 dakika bekletildi. Böylece kompleks olarak çöken proteinler denatüre olarak birbirinden ayr ld .
- 3.16. de belirtildiği gibi western blot işlemi uygulandı. Western blot işleminde membran  antikor ile inkübasyonunda Tip60 1/5000 oranında Cry1 ise 1/2000 oranında bloklama çözeltisi ile seyreltildi.

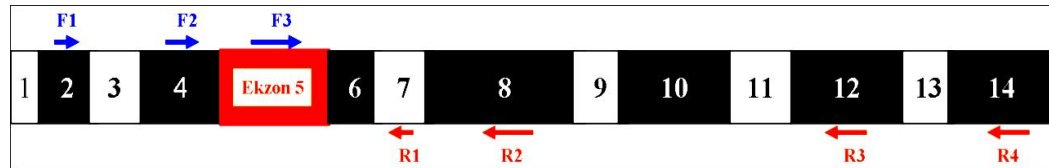
4. ARAşTIRMA BULGULARI

4.1. Alternatif Splicing Sonucu Tip60b'nin Ekzon5 i Kaybettii nin RT-PCR Ile Gösterilmesi

Ekzon5'in alternatif splicing sonucu silinmesini göstermek amacı ile RT-PCR yapıldı Yetişkin fare beyni (sıra 1), E14,5 (sıra 2), ve E18,5 (sıra 3), dokularından mRNA izole edildi ve revers transkriptaz enzimi ile cDNA lar haz rlan . Daha sonra  izelge 4.1 de belirtilen primerler kullanıldı( ekil 4.2 ve 4.3).

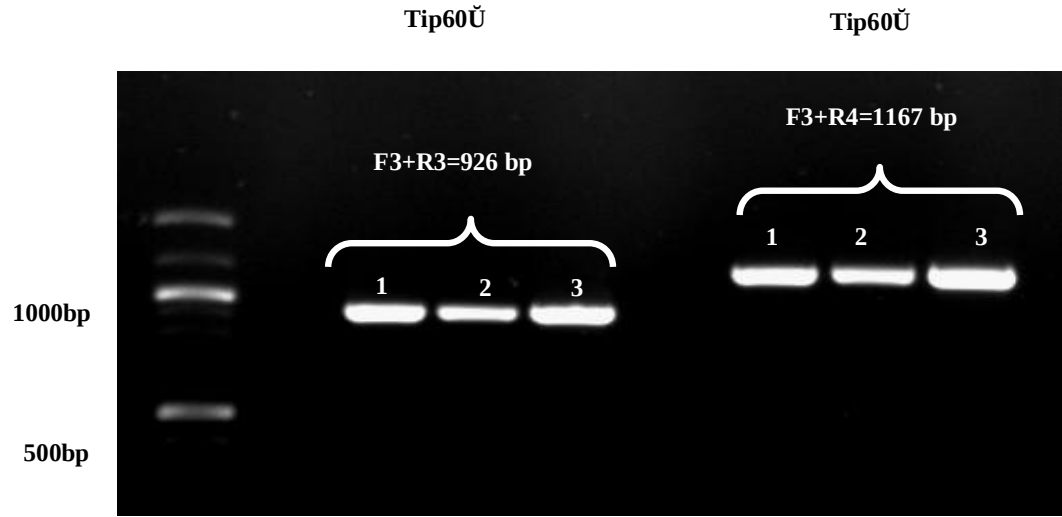
Çizelge 4.1. RT-PCR da kullanılan primerler.

Forward Primer 1 (F1)	TGCTGCGGCGCAACCAGGAC
Forward Primer 2 (F2)	TGACTCACGAGCGGCTGGAC
Forward Primer 3 (F3)	TCCCGGTCCAGATCACACTC
Revers primer 1 (R1)	CTGGACGGAAGCGGAAATCT
Revers primer 2 (R2)	CGACATTGTCACCCGGATGA
Revers primer 3 (R3)	GCCTCCTATCCTACCGAAGT
Revers primer 4 (R4)	CGGCTCCTTCGGATTGACT



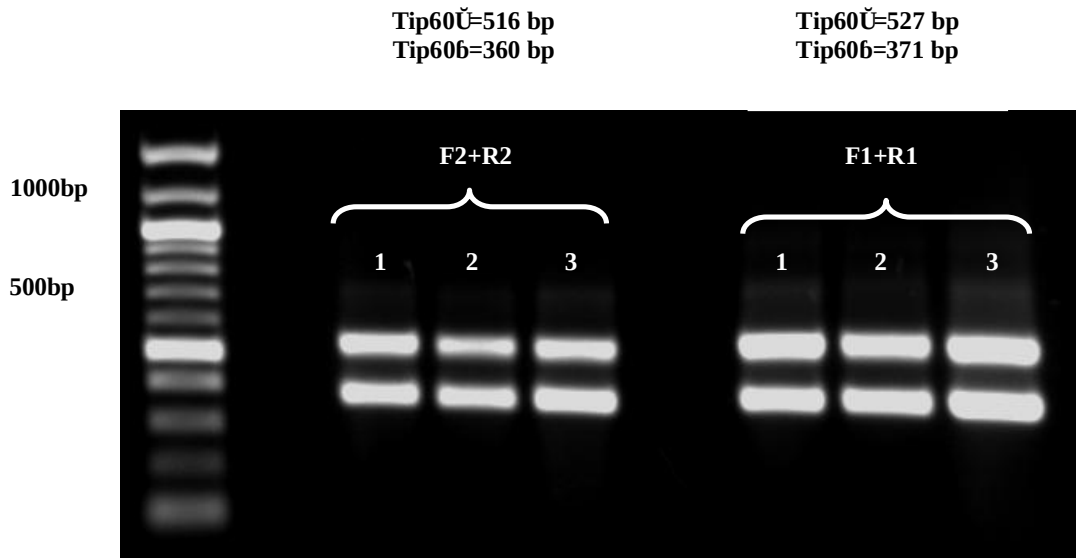
Şekil 4.1. Ekzon5'in alternatif splicing sonucu silindi  ini göstermek amacı ile dizayn edilen primerlerin konumları

F3 primeri ekzon 5 içinde bir dizilimde oldu  u için F3, R3 ve R4 primerleri kullan ld     zaman Tip60  izoformuna ait tek bant elde edildi. Çünkü Tip60b izoform Ekzon5  içermez ( ekil 4.2).



Şekil 4.2. F3, R3 ve R4 primerleri kullanılarak yapılan PCR sonucu.

F1, F2, R1 ve R2 primerleri kullanıldığında 2 farklı band elde edildi. Çünkü primerlerin kalıp DNA (cDNA) da bağlandığı bölgeler ekzon 5'teki bölgelerde ve dolayısıyla hem Tip60Ü (Ekzon5 içeren) hemde Tip60b (Ekzon 5 içermeyen) ya ait templeytlar elde edildi. İki band arasındaki fark ise Ekzon 5 (156bp) kadardır (Şekil 4.3).

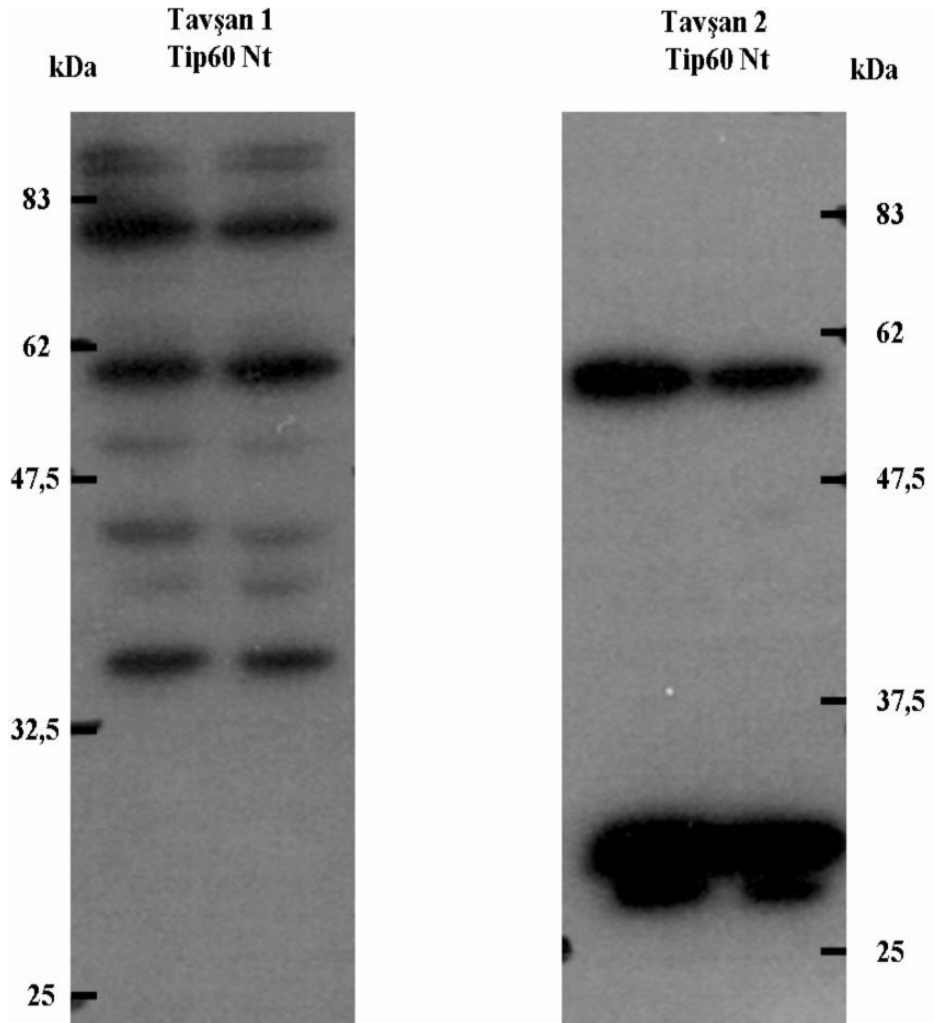


Şekil 4.3. F1, F2, R1 ve R2 primerleri kullanılarak elde edilen PCR sonucu.

ATGGCGGAGGTGGGGGAGATAATCGAGGGCTGCCGCCTGCCCGTGCTGCGGCGCAACCAGGACAACGAAG
 ATGAGTGGCCCCTGGCTGAGATCCTGAGCGTGAAGGACATCAGTGGCCGAAAGCTTTTCTATGTCCATTA
 CATTGACTTCAACAAACGTCTGGATGAATGGGTGACTCACGAGCGGCTGGACTTAAAGAAGATCCAATTT
 CCCAAGAAAGAGGCCAAGACACCTACCAAGAACGGACTTCCTGGGTCCCGCCCCGGCTCTCCCGAAAGAG
 AGGTGCCGGCCTCCGCCAGGCCAGCGGGAAGACCTTGCCAATCCCGGTCCAGATCACACTCCGCTTCAA
 CCTGCCCAAGGAGCGGGAGGCCATCCAGGTGGCGAGCCTGACCAGCCGCTCTCCTCCAGCTCCTGCCTG
 CAACCCAACCAACGCTCAACGAAACGGAAGGTGGAGGTGGTTTCACCAGCAACCCCAGTGCCCAGCGAGA
 CAGCCCCAGCCTCGGTTTTCCCTCAGAATGGGTGAGCCGTAGGGCAGTGGCAGCCCAGCGTGGACGGAA
 GCGGAAATCTAATTGCTTGGGCACTGATGAGGATTCTCAGGACAGCTCAGATGGAATACCGTCAGCACCA
 CGAATGACTGGCAGTCTGGTGTCTGACCGGAGCCACGACGACATTGTACCCGGATGAAGAACATTGAGT
 GTATTGAGCTTGGCCGGCACCGCCTCAAGCCGTGGTACTTCTCCCCGTACCCACAAGAGCTTACCACGCT
 ACCCGTCTCTACCTGTGCGAATTTTGCCTCAAATATGGCCGTAGCCTCAAGTGTCTGCAACGCCACTTG
 ACCAAATGTGATCTTCGGCACCCCTCCAGGCAATGAAATTTACCGCAAGGGCACCATCTCCTTTTTTGAGA
 TTGATGGACGGAAAAACAAGAGTTACTCACAAAACCTGTGTCTTCTGGCCAAGTGTTTCTGGACCACAA
 AACACTGTACTATGACACTGACCCCTTCCTCTTCTACGTAATGACGGAGTATGACTGCAAAGGTTTCCAC
 ATCGTGGGCTACTTCTCCAAGGAAAAGGAATCCACAGAAGATTACAATGTGGCCTGCATCTTGACTCTGC
 CTCCTTACCAGCGCCGGGGCTATGGCAAGCTGCTTATTGAGTTCAGCTATGAACTCTCGAAAGTAGAAGG
 GAAGACCGGAACTCCTGAGAAACCCCTGTCAGATCTTGCCCTCCTATCCTACCGAAGTTACTGGTCCCAA
 ACCATCTTGGAGATCCTGATGGGGCTGAAGTCGGAGAGCGGGGAGAGGCCACAGATCACCATCAATGAGA
 TCAGTGAAATCACTAGTATCAAGAAAGAAGATGTCATCTCCACACTGCAGTATCTCAACCTCATCAATTA
 CTACAAGGGCCAGTATATCCTAACTCTGTCAGAAGACATCGTGGATGGGCATGAGCGGGCTATGCTCAAG

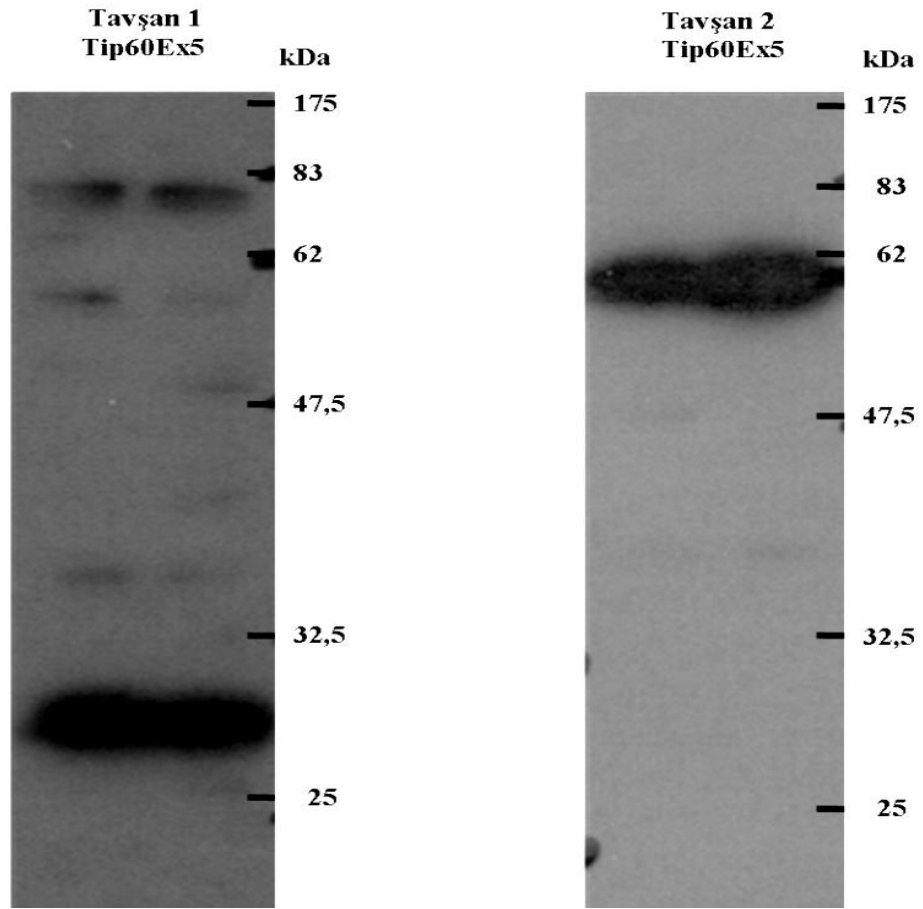
4.2. Antikor e gili alāmalar

Tip60 Ex5 antikorunu üretmek için, belirttiğimiz üzere Ekzon 5’e spesifik kēām GST füzyon proteini olarak üretildi ve 2 farklı tavkına enjekte edildi. Tip60Nt antikorunu üretmek için de N terminal kēma spesifik kēām GST füzyon proteini olarak üretildi ve 2 farklı tavkına enjekte edildi. Bu işlemler Pineda Antikörper-Service kirketine yaptıēddē 120 günlük immünizasyondan sonra kirketin gönderdiği serumlar için western blot yapılarak antikorların amacēmēza uygunluğu test edildi (ekil 4.5)



Şekil 4.5. İki farklı tavkın için üretilen Tip60Nt antikoru sonuçları %12’lik SDS-PAGE jeli (akrilamid jeli) kullanēddē

Yapılan western blot analizi sonucuna göre hem tavşan 1'den hemde tavşan 2'den üretilen Tip60Nt antikorlarē sadece istediğimiz Tip60 proteinin Ő ve 6 izoformlarēna değil aynı zamanda spesifik olmayan bağlanmalarē da yapıyordu. Bu nedenle bu antikorlar için saflaştırma yapmamız gerekiyordu. Yapılan western blot analizi sonucuna göre tavşan 2'den üretilen Tip60Ex5 antikorı sadece istediğimiz Tip60Ő protein izoformuna (60kDa) spesifik ve tek bant verdiğinden protein ekspresyon analizlerinde kullanabilmek için oldukça iyi bir antikordu. Fakat tavşan 1'den üretilen Tip60Ex5 antikorı için aynıkeyleri söyleyemeyiz (şekil 4.6).



şekil 4.6. İki farklı tavşan için üretilen Tip60Ex5 antikorı sonuçlarē %12'lik SDS-PAGE jeli (akrilamid jeli) kullanıldē

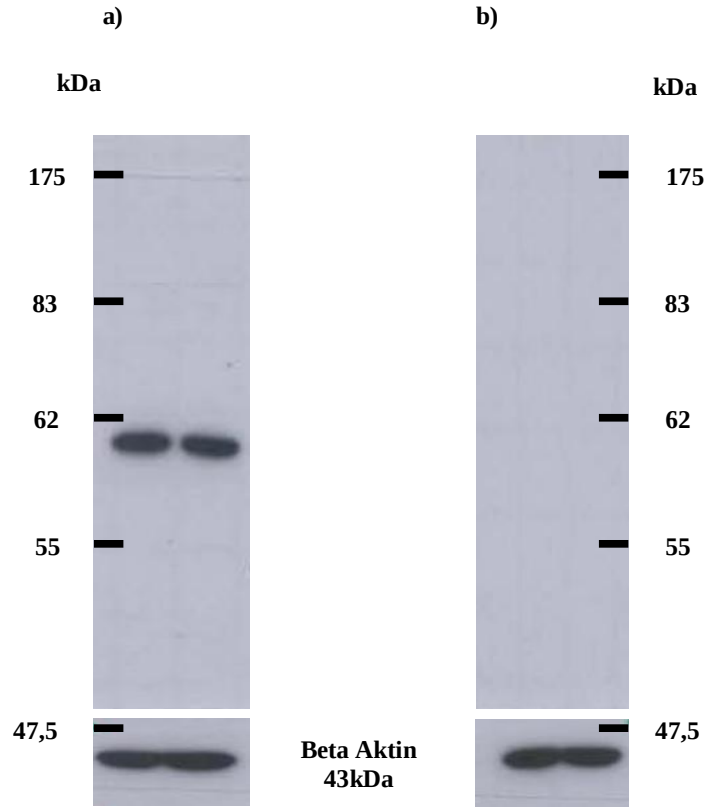
4.2.1. Tip60Ex5 antikorunun spesifikliğinin kontrolü

Tavıkan 2'den üretilen Tip60Ex5 antikorunun Tip60 proteinine spesifikliğini göstermek için bloklayıcı deneyi yapıldı

Tip60Ex5 antikorunu bloklamak için Tip60Ex5 GST füzyon proteini kullanıldı. Çünkü Tip60Ex5 antikorunu tavıkta üretmek için ekzon 5'e spesifik olan peptid GST füzyon proteini olarak üretildikten sonra tavığa enjekte edilmikti. Eğer Tip60Ex5 antikoru Tip60 proteinine spesifik ise GST füzyon proteini Tip60Ex5 antikorunu algılayıp bloke etmelidir. Böylece Tip60 proteinin Tip60Ex5 antikoru tarafından algılanması engellenmiş olur.

Şekil 4.7'de gösterilen sonuç yukarıda ifade ettiğimiz bilgiler ışığında Tip60Ex5 antikoru amaçlandığı gibi sadece Tip60 proteinine spesifiktir diyebiliriz. Şekil 4.7.a'da proteinleri transfer ettiğimiz membran bloklayıcı çözeltisi içerisindeki Tip60Ex5 antikoru ile inkübe edildi. Bu antikor sadece Tip60 (60kDa) proteinini algıladı. Şekil 4.7.b'de ise Tip60Ex5 antikoru bloklanmadığı için hiçbir bantı algılayamadı. Bu iki sonuç karşılaştırıldığında zaman zaman Tip60Ex5 antikorumuzun sadece istediğimiz proteine spesifik olduğunu ve protein ekspresyon analizleri için kullanılabilir olduğunu sonucuna varabiliriz.

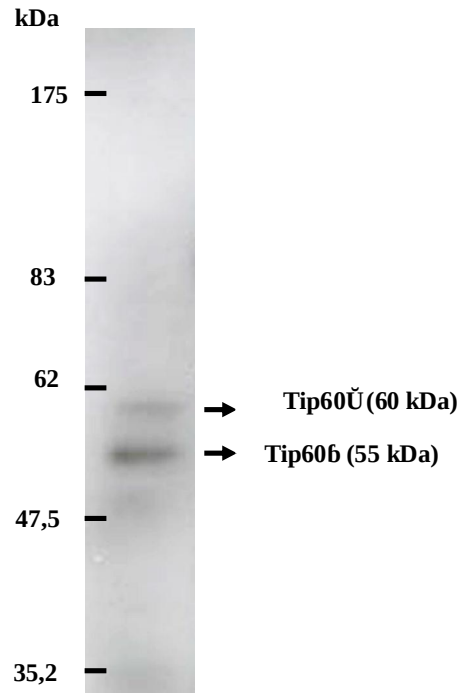
Bu deneyde, SDS-PAGE jelinin (akrilamid jeli) her bir kuyusuna yüklenen protein miktarının ekiti olduğunu göstermek amacıyla beta aktin kullanıldı. Böylece daha kesin karşılaştırma yapabilmeye olanak sağlandı.



Şekil 4.7. Tip60Ex5 antikorunun, Tip60Ex5 GST füzyon proteini ile bloklanması %9'luk SDS-PAGE jeli (akrilamid jeli) kullanıldığında

4.2.2. Tip60Nt antikorunun saflaştırılması

Şekil 4.5'de gösterilen western blot analizi sonucuna göre hem tavkan 1'den hem de tavkan 2'den üretilen Tip60Nt antikorları sadece istediğimiz Tip60 proteinin α ve β izoformlarına değil aynı zamanda spesifik olmayan bağlanmalar da yapıyordu. Bu nedenle tavkan 2'den üretilen Tip60Nt antikorunu protein ekspresyon analizlerinde kullanabilir hale getirmek için saflaştırma işlemi yapıldı. Tip60 proteinin N terminal ucuna spesifik NH₂-CR LPV LRR NQD NED EW-COOH peptidi BioScience şirketine sipariş edildi. Bölüm 3.20'de belirtildiği üzere saflaştırma işlemi için epitop kolonu oluşturuldu. Sonuç western blot analizi ile kontrol edildi. Sonuçlara göre tavkan 2'den üretilen Tip60Nt antikoru saflaştırma işleminden sonra sadece Tip60 proteinin α (60kDa) ve β (55Kda) izoformlarına spesifik olduğunu gösterildi (Şekil 4.8).



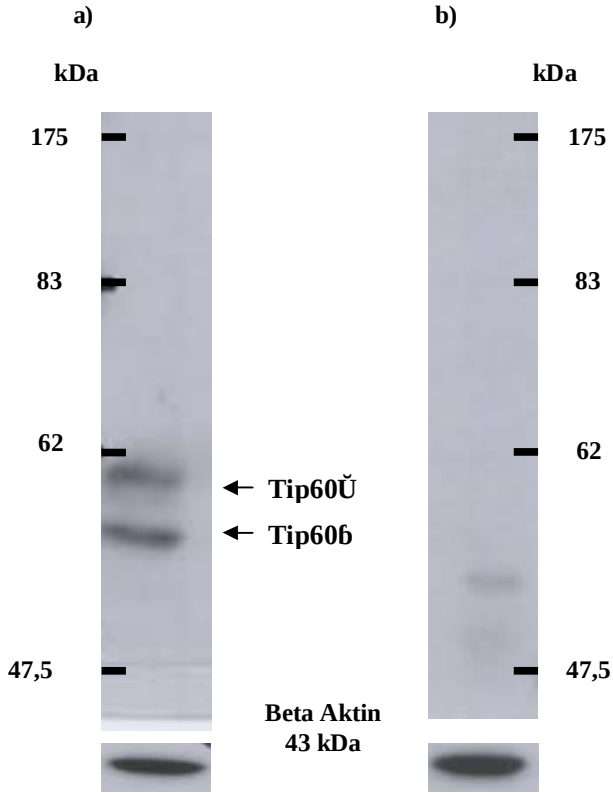
Şekil 4.8. Tavşan 2'den üretilen Tip60Nt antikoru için yapılan saflaştırma işleminin western blot ile kontrolü. %12'lik SDS-PAGE jeli (akrilamid jeli) kullanıldı

4.2.3. Saflaştırılan Tip60Nt antikorunun spesifikliinin kontrolü

Saflaştırılan Tip60Nt antikorunun spesifikliini kontrol edildi. Bölüm 3.19.2'de belirtildiği üzere saflaştırmada kullanılan peptit ile bloklama deneyi yapıldı

Şekil 4.9'da gösterilen sonuç yukarıda ifade ettiğimiz bilgiler ışığında Tip60Nt antikoru amaçlandığı gibi sadece Tip60Ü ve Tip60b proteinlerine spesifiktir diyebiliriz. Şekil 4.9.a'da proteinleri transfer ettiğimiz membran bloklama çözeltisi içerisindeki Tip60Nt antikoru ile inkübe edildi. Bu antikor sadece Tip60Ü (60kDa) ve Tip60b (55kDa) proteinlerini algıladı Şekil 4.9.b'de ise Tip60Ex5 antikoru bloklandığı için hiçbirkeyi algılayamadı Bu iki sonuç karşılaştırıldığında zaman Tip60Nt antikorumuzun sadece istediğimiz proteinlere spesifik olduğunu ve protein ekspresyon analizleri için kullanılabilir olduğunu sonucuna varabiliriz.

Bu deneyde, SDS-PAGE jelinin (akrilamid jeli) her bir kuyusuna yüklenen protein miktarının ekit olduğunu göstermek amacıyla beta aktin kullanıldı. Böylece daha kesin kuantitasyon yapılabilme olanakları sağlandı.

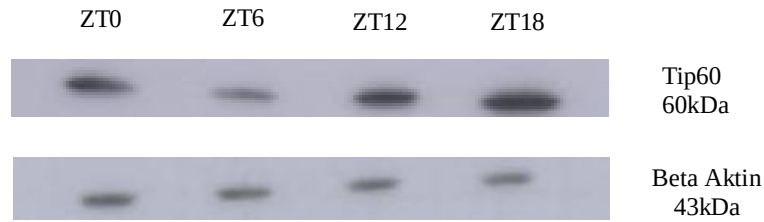


Şekil 4.9. Tip60Nt antikorunun, Tip60 proteinin N-terminal ucuna spesifik peptit ile bloklanması %9'luk SDS-PAGE jeli (akrilamid jeli) kullanılarak

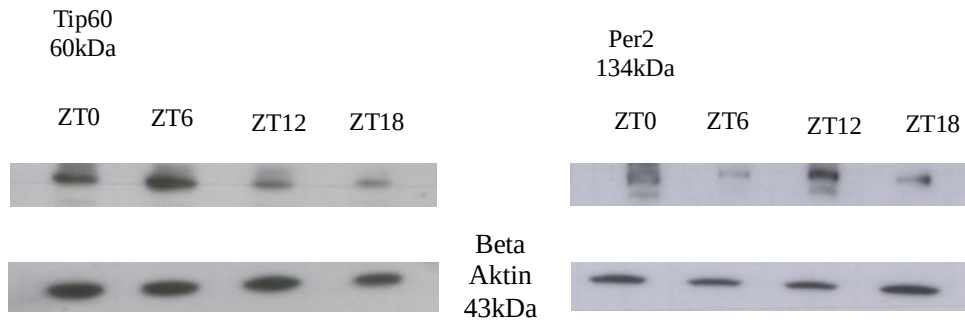
4.2.4. Beyin dokusunda ve beyin SCN Bölümünde Tip60 protein ekspresyonunun farklı zaman birimlerinde incelenmesi

BL6N genetik arka planına sahip 9 haftalık doğrudan al tip erkek fareler, dark etkenlerden izole edilmiş kabinlerde bir günün 24 saatte oluktuğu 12 saat ışık-12 saat karanlık (IK:12:12) döngüsünde 10-15 gün arasında muhafaza edildi. İlk kez verilmeye başlandıktan sonra zaman birimi ZT0 olarak kabul edildi ve her 6 saatte boynu kesilerek öldürülen fareden beyin dokusu alındı. Toplam 4 farklı zaman birimine ait beyinlerden protein izole

edildi. Tip60Ex5 antikorunu kullanarak Tip60 protein ekspresyonunun gün içindeki değişimi western blot metodu ile incelendi (Şekil 4.10). Benzer işlem 4 farklı zaman birimine ait SCN dokusu toplanması için de yapıldı. SCN beynin çok küçük bir kısmı olduğu için dolayısıyla her bir zaman birimi için en az iki farenden alınan SCN dokusu protein ekstraksiyonu için kullanıldı. Western blot metodu ile Tip60 protein ekspresyonunun gün içindeki değişimi SCN dokusunda incelendi (Şekil 4.11). SCN beyin hipotalamusunun ventral kısmında çok küçük bir kısımda konumlanmaktadır. Bu kısmın tam ve doğru olarak alındığından emin olmak için Per2 antikorunu pozitif kontrol olarak kullanıldı (Şekil 4.11). Per2 proteini beyinde sadece SCN'de eksprese olan bir proteindir ve gün içerisinde gösterdikçe olduğu ekspresyon değişimi bilinmektedir (Reppert and Weaver 2001). Western blot çalışmalarında β -aktin antikorunu kullanarak her bir zaman birimi için SDS jeline yüklenen protein miktarını ek olarak gösterildi ve kantitatif analiz yapma imkanı sağlandı.

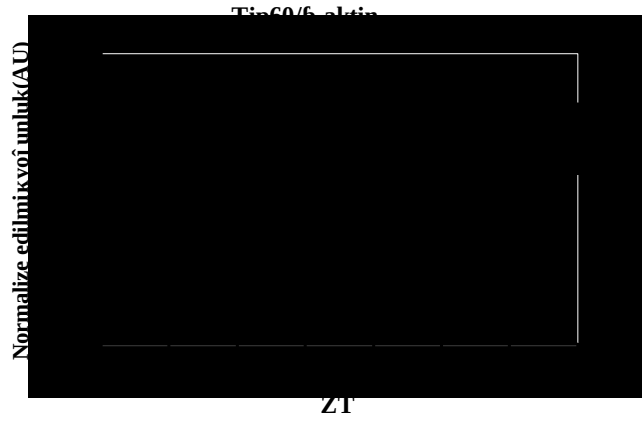


Şekil 4.10. Tip60Ex5 antikorunu kullanarak Tip60 protein ekspresyonunun gün içindeki değişiminin beyin dokusunda gösterilmesi. %9'luk SDS jeli (akrilamid jeli) kullanıldı.



Şekil 4.11. Tip60Ex5 antikorunu kullanarak Tip60 protein ekspresyonunun gün içindeki değişiminin SCN dokusunda gösterilmesi. %9'luk SDS jeli (akrilamid jeli) kullanıldı.

Elde edilen western blot sonuçlarında Tip60 ve β -aktin proteinlerine ait bandların yoğunluk (density)ları ImageJ programı kullanılarak ölçüldü. Beyin (Şekil 4.12) ve SCN (Şekil 4.13) dokuları için Tip60/ β -aktin oranları normalize edilerek hesaplandı. Elde edilen grafikteki 4 farklı zaman birimlerine ait değerlerin önemlilik derecesi COSOPT analiz metodu kullanılarak hesaplandı (Panda *et al.* 2002). Tip60 proteinin beyin dokusunda gün içerisinde farklı zaman birimlerinde kantitatif ekspresyonu önemli bir şekilde farklılık göstermesine karşın SCN dokusu için aynı durum söylenemez.



Şekil 4.12. Western blot metodu ile beyin dokusunda farklı zaman birimlerinde kantitatif analizi yapılan Tip60 protein ekspresyon değerlerinin β -aktin proteinine karşı normalize edilip grafik olarak gösterilmesi. * = pMMC-Beta<0,1= Önemli



Şekil 4.13. Western blot metodu ile SCN dokusunda farklı zaman birimlerinde kantitatif analizi yapılan Tip60 protein ekspresyon değerlerinin β -aktin proteinine karşı normalize edilip grafik olarak gösterilmesi.

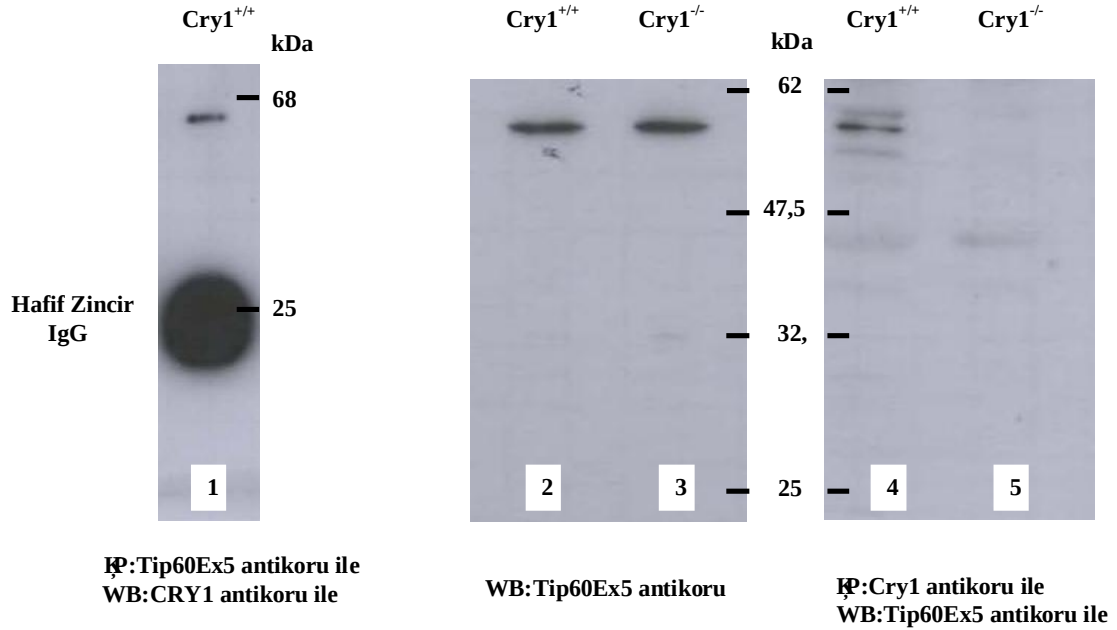
4.2.5. İmmunopresipitasyon (İP)

Tip60 ve Cry1 proteinlerinin birbirleri ile olan ilişkilerini in vitro olarak göstermek için Tip60Ex5 ve Cry1 antikorları kullanılarak immunopresipitasyon (İP) yapıldı. Bu amaçla BL6N genetik bekrandına sahip doğ al tip (wild type) ve C57/BL6N (BL6N) genetik bekrandına sahip homozigot Cry1 mutant fare beyinleri kullanıldı. Farelerden alınan beyinlerden total protein elde etmek için 3.21.1'de belirtilen protein ekstraksiyon metodu kullanıldı. Bradford yöntemi ile konsantrasyonları ölçüldü ve 3.21.2'de belirtildiği gibi İP yapıldı.

Bir numaralı figür için yapılan İP deneyinde, doğ al tip (wild type) fare beyninden elde edilen total protein ekstraktındaki Tip60 proteinine spesifik Tip60Ex5 antikoru kullanılarak Tip60 proteini çöktürüldü. Çöktürme sonrasında kayet Tip60 proteini ekstrakt içinde kompleks olarak bulunuyor ise kompleks olarak çöker. Eğer çöktürülen Tip60 proteini hiçbir protein ile ilişkisi yok ise Tip60Ex5 antikoru ile beraber sadece Tip60 proteini çöker. Western blot öncesi numunenin 95°C'de kaynatılması sonucu antikor-protein etkileşimi dahil tüm etkileşimler denatüre edilerek kaldırıldı. Jele yüklenip daha sonra membrana transfer edilen numune Cry1 antikoru ile muamele edildi. Elde edilen sonuç Tip60 proteini ile Cry1 proteinin fare beyinde birbiri ile olan ilişkisini in vitro olarak göstermektedir (Şekil 4.14 hat 1). Çünkü Cry1 antikorunun bağlandığı Cry1 proteini, Tip60 proteini ile etkileşimi olduğundan çöktürme sonrasında hala ekstrakt içerisinde mevcuttur.

Bu deney sonucunu doğrulamak ve kesinleştirmek için homozigot Cry1^{-/-} mutant fare ve doğ al tip fare beyinlerinden total protein ekstrakte edildi. Western blot için Tip60Ex5 antikoru ile kullanıldı. Elde edilen sonuca göre hem homozigot Cry1^{-/-} mutant fare hem de doğ al tip fare beyin total protein ekstraktında Tip60 proteinin mevcut olduğu gösterildi (Şekil 4.14. hat 2,3). Cry1 antikoru kullanılarak hem homozigot Cry1^{-/-} mutant fare hemde doğ al tip fare beyinden ekstrakte edilen total proteinden Cry1 proteini çöktürüldü. Protein çöktürmesi sonrasında yapılan western blot sonucu doğ al tür farelerde Cry1-Tip60 ilişkisi gösterildi. Negatif kontrol olarak kullanılan mutant

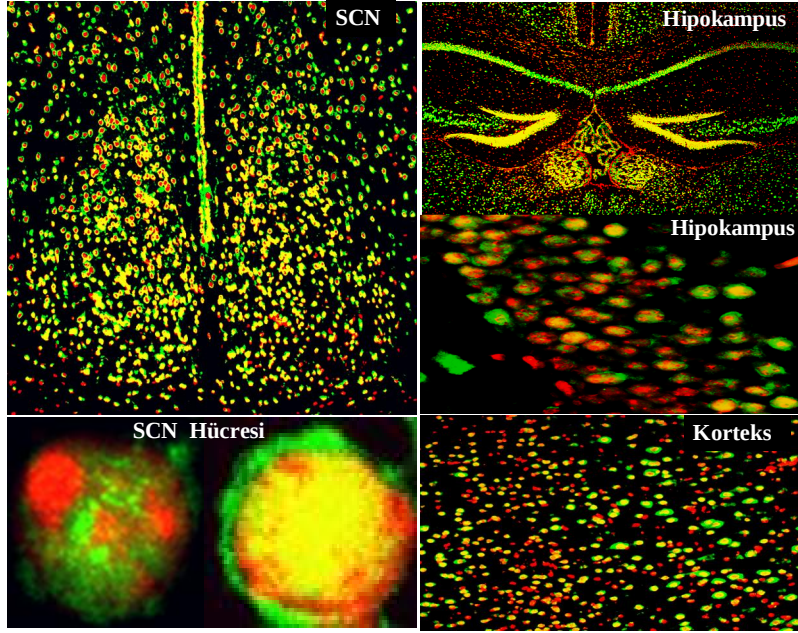
farelerde ise Cry1 proteini olmadığ  ndan herhangi bir etkilekimden de söz edilemez. Dolay s  ile herhangi bir ilikkinin olmadığ   western blot analizi ile gözlendi ( ekil 4.14. hat 4,5).



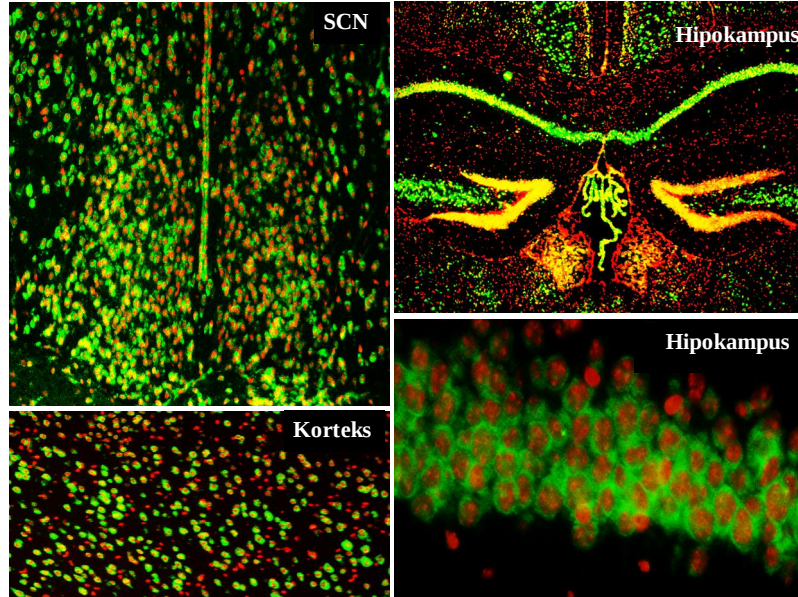
Şekil 4.14. Tip60 proteininin Cry1 proteini ile ilikkisinin g sterildiğ i   sonuc .

4.2.6. Antikor ile doku boyama

DAPI boyas n n çekirdekteki DNA`y  boyaması sonucunda k m z  bölgeler olur . Normalde DAPI boyas mavi renkte floresans sinyal verir, fakat sonucu daha da görünür hale getirmek için bilgisayar programı ile sinyal k m z ya çevrildi. Beyin dokusunda Tip60 proteinine bağlanan Tip60 antikor  Alexa 488 ile konjüge olmak ikinci bir antikor ile alg dan , dolayısıyla 488nm de yekil sinyal verir. Dokunun farklı floresan lensler altında fotoğrafları çekildikten sonra birbiri üzerine gelecek şekilde (Merge) bilgisayar programı ile  ak         K m z  renk hücrenin çekirdeğini, yekil renk hücrenin sitoplazmas n  ve turuncu renk ise k m z  ve yekil renklerin birbiri ile  ak        sonucu olur  ve proteinin çekirdekte de bulunduğunu gösterir.



Şekil 4.15. Koronal OCT beyin kesitlerinde Tip60 protein ekspresyonunun Tip60Ex5 antikoru ile tetkiki.



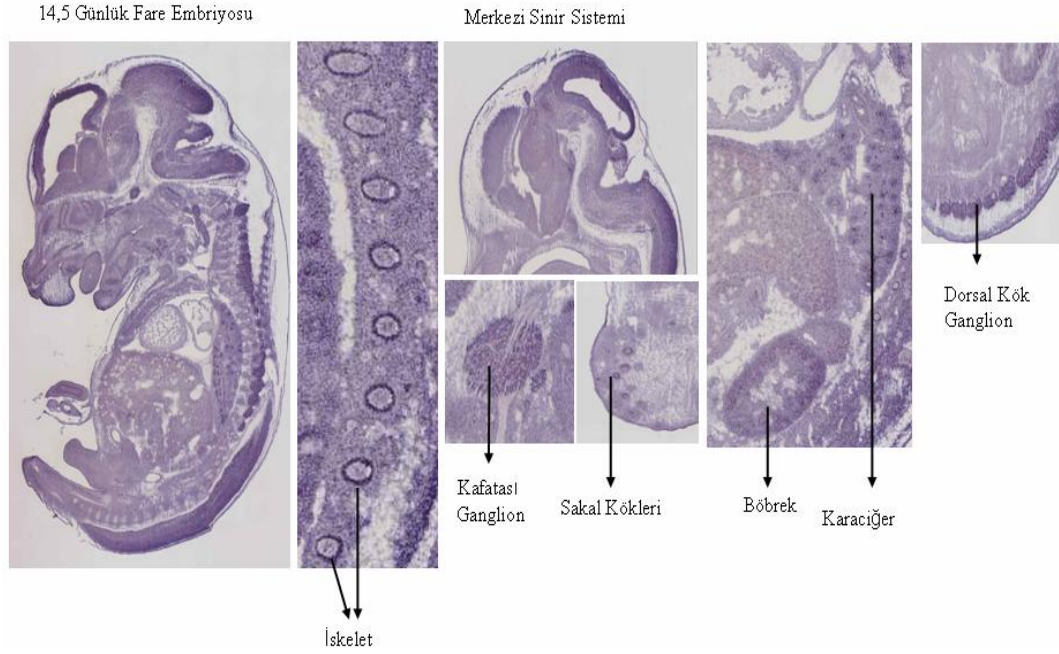
Şekil 4.16. Koronal OCT beyin kesitlerinde Tip60 proteinin ekspresyonunun Tip60Nt antikoru ile tetkiki.

şekil 4.15'de gösterilen sonuçta Tip60Ex5 antikoru ile ve şekil 4.16'da gösterilen sonuçta ise Tip60Nt antikoru kullanılarak Tip60 proteinin beyin hangi kşnlarında eksprese olduğu u doku boyaması yapılarak gösterildi. Genel olarak bu proteinin beyinde yaygın bir ekspresyona sahip olduğu u fakat hipokampus, korteks ve biyolojik saat için önemli bir kşn olan SCN de kuvvetli ekspresyon gözlemlendi. Proteinler sitoplazmadaki ribozomlar tarafından sentezlenir. Sonuçta bakıldığında hem sitoplazmik hem de çekirdekte Tip60 proteinine ait sinyaller görünmektedir. Bu bilgilerin ışığında, sitoplazmada sentezlenen Tip60 proteinin bir şekilde çekirdeğe geçtiğini ve çekirdekle ilgili bir vazifeye sahip olabileceğini göstermektedir.

4.3. Tip60 Geni İçin İn Situ Hibridizasyon Sonuçları

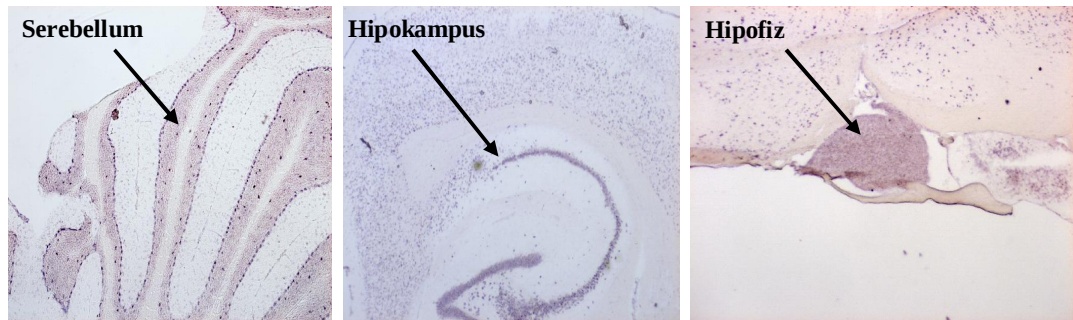
Girik kısmında belirtildiği üzere Tip60 proteini metabolizmada geniş yelpazede önemli fonksiyonlara sahiptir. Homozigot Tip60 nakavt fareleri hayatsal faaliyetlerini devam ettiremiyor ve embriyonik dönemde ölüyorlardı. Bu sebeplerden dolayı bu proteinin gen seviyesinde ekspresyon analizlerini incelemek istedik. Farklı dönem ve dokularda ekspresyon analizleri *ISH* analizi metodu ile yapıldı.

14,5 günlük embriyonik dönemde yaygın bir şekilde ekspresyon gözlemlendi. şekil 4.17'de gösterildiği üzere merkezi sinir sisteminde, karaciğerde, böbrekte, iskeletlerde, sakal kökleri, kafatası gangliyon hücrelerinde ve dorsal kök ganglion hücrelerinde spesifik ekspresyon gözlemlendi.



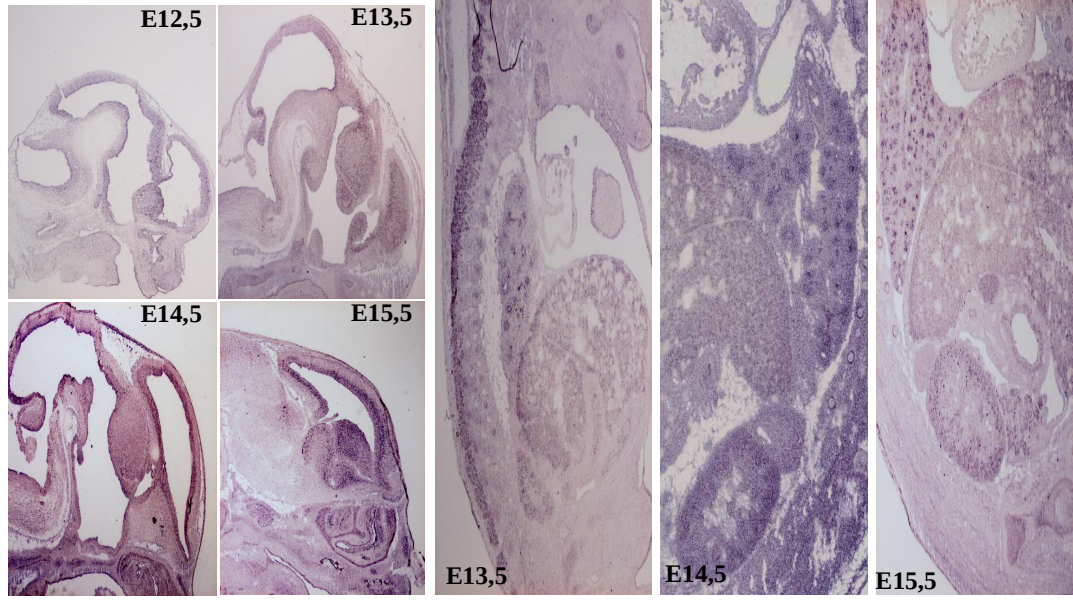
Şekil 4.17. 14,5 günlük fare embriyosu için yapılan *ISH* analiz sonuçları

Yetişkin fare beyni için yapılan *ISH* analizinde serebellum, hipokampus ve hipofizde baskın ekspresyon gözlenmesine karşın yine de yaygın bir ekspresyon gözlemlendi (Şekil 4.18).



Şekil 4.18. Yetişkin fare beyni için yapılan *ISH* analiz sonuçları

Farklı dönemlerdeki fare embriyolarında yapılan *ISH* analizleri de yukarıda 14,5 günlük dönem için belirtilen ekspresyonlar ile paralellik gösterdi (Şekil 4.19).

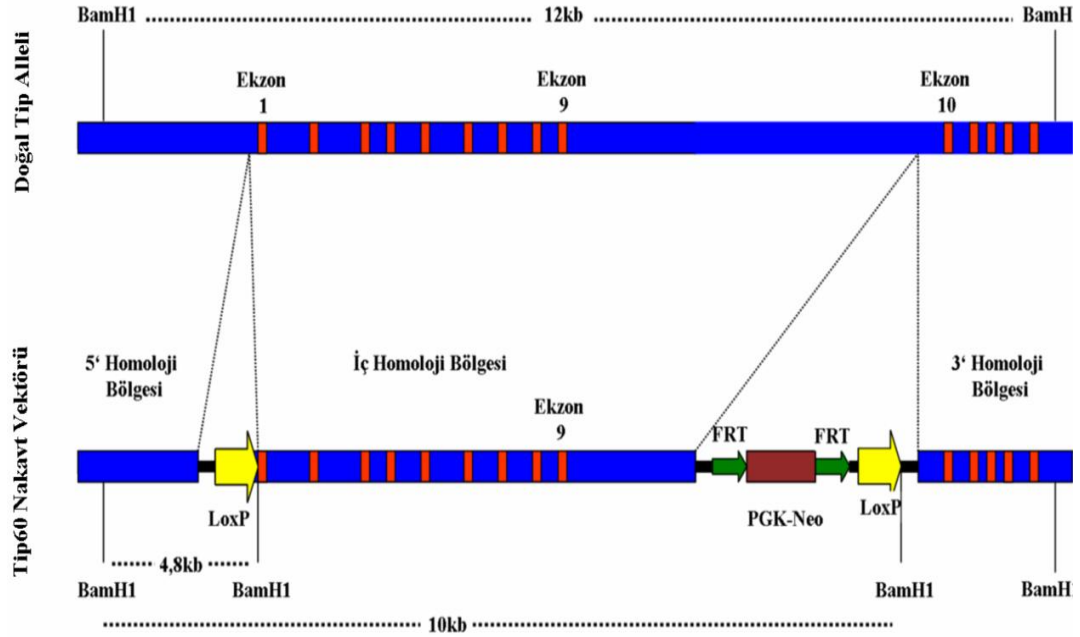


Şekil 4.19. Değ ikik zamanlardaki fare embriyolarēiçin yapıdan *ISH* analiz sonuçlarē

4.4. Nakavt Fare Dizaynē

Genomik DNA üzerinde, hedeflediğimiz bölgeyi, istediğimiz hücre tipinde silebilmek için Cre/LoxP sistemi kullanıldē

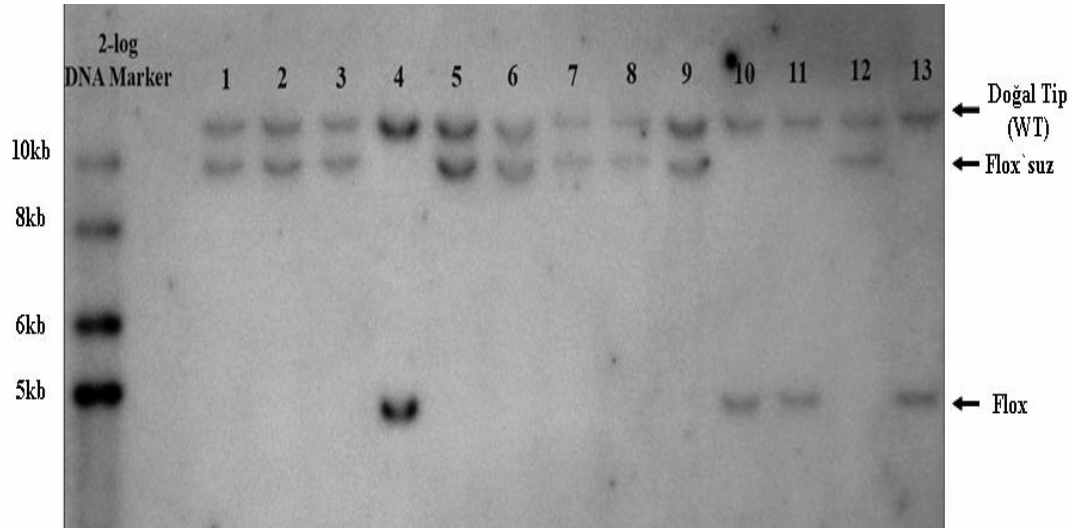
Klonlama yapacağımız vektöre Tip60 genini içeren 12kb lik genomik bölge ile beraber gen üzerinde silmeyi hedeflediğimiz bölgenin sınırlarına iki tane LoxP (locus of X over P1) dizilimi yerleştirildi. İlk birinci ekzonun önüne ve diğeri ekzon 9 ile ekzon 10'ın arasına konuldu. Böylece Cre rekombinazlar kullanılarak hedeflediğimiz bu bölgede silme yapma imkanımız olacaktē. Ekzon 9 ile ekzon 10 arasındaki LoxP dizilimi önüne antibiyotik direnç marker geni olan Neomycin geni eklendi. Ayrıca bu neomycin geninin başlangıcına ve sonuna konulan FRT dizilimi sayesinde bu marker genini istediğimiz zamanda genomdan çıkarma avantajē sağlandı. Bu kısma kadarki işlemler Dr. Xunlei Zhou tarafından Prof. Dr. Gregor Eichele'nin laboratuvarında yapıldē



Şekil 4.20. Tip60 doğ al tip alleli ve kontrollü nakavt fare eldesi için dizayn edilen Tip60 nakavt vektörü. Karmaze renk ekzonlar, sarı renkli oklar LoxP dizilimlerini, yeşil renkli oklar FRT dizilimlerini, kahverengi renkli kase ise PGK-Neo-bGH-pA dizilimini ifade etmektedir.

Klonladığımız Tip60 nakavt vektörü Polygene kirketi tarafından lineer hale getirildi ve transfeksiyon metodu ile konakçı hücre olan 129/Sv genetik bekrandena sahip embriyonik kök hücrelere (ES Cell) transfer edildi. Transfeksiyonun gerçekleştirdiği hücrelerin seçilip ayıklanmasında neomycin geni marker görevi gördü. Embriyonik kök hücre genomik DNA ile vektöre klonlanıp lineer hale getirilen Tip60 homoloji bölgeleri ile homoloji gösterdiğinden genetik değişik-tokuk gerçekleşti. Homolog (Homologous Recombination) veya homolog olmayan (non-homologous Recombination) rekombinasyon olarak adlandırılan genetik değişik-tokuk işleminin hedeflediğimiz doğ rultuda olup olmadığımızın kontrol edilmesi için kirket tarafından 13 farklı embriyonik kök hücre klonu gönderildi. Her bir kök hücre klonundan genomik DNA izole edildi (3.13.2). BamH1 restriksiyon enzimi ile bu genomik DNAlar için kesme (Digestion) yapıldı (3.13.4). 5. homoloji bölgesindeki dizilime spesifik radyoaktif prob üretildi (3.13.3). Yapılan southern blot işlemi ile 4,10,11,13 numaralı embriyonik kök hücreleri için hem doğ al tip bandı (12,2 kb) hemde Flox bandı (4,8kb) gözlemlendi. Bunların dışındaki embriyonik kök hücreleri için doğ al tip bandı (12,2 kb) ve Flox'suz doğ al tip bandı (10 kb) gözlemlendi (Şekil 4.21). Homolog

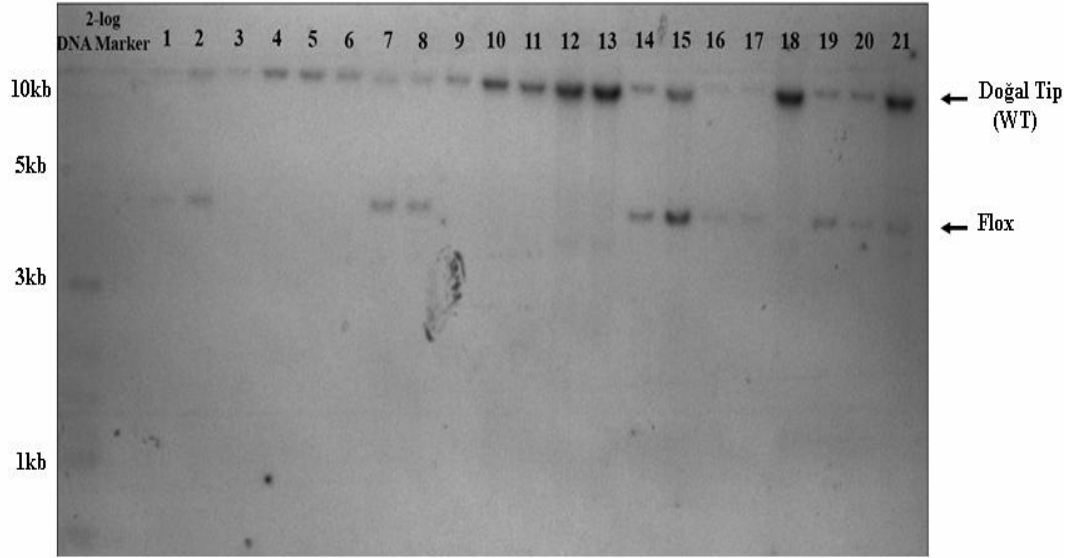
rekombinasyonun 5' ile 3' homologji bölgeleri arasında olmasi istediğimiz genetik deşik tokuk stratejisidir. Bu durumda istenilen genetik deşik tokukun olduğu allel 4,8 kb büyüklüğünde band verir. Fakat homolog rekombinasyon iç homologji ve 3' homologji bölgeleri arasında olur ise bu allelden gelecek bandın büyüklüğü 10 kb olacaktır. Bu şekilde olan homolog rekombinasyon ile LoxP dizilimlerinden sadece ikincisi entegre olacağından arzu edilmeyen durumdur.



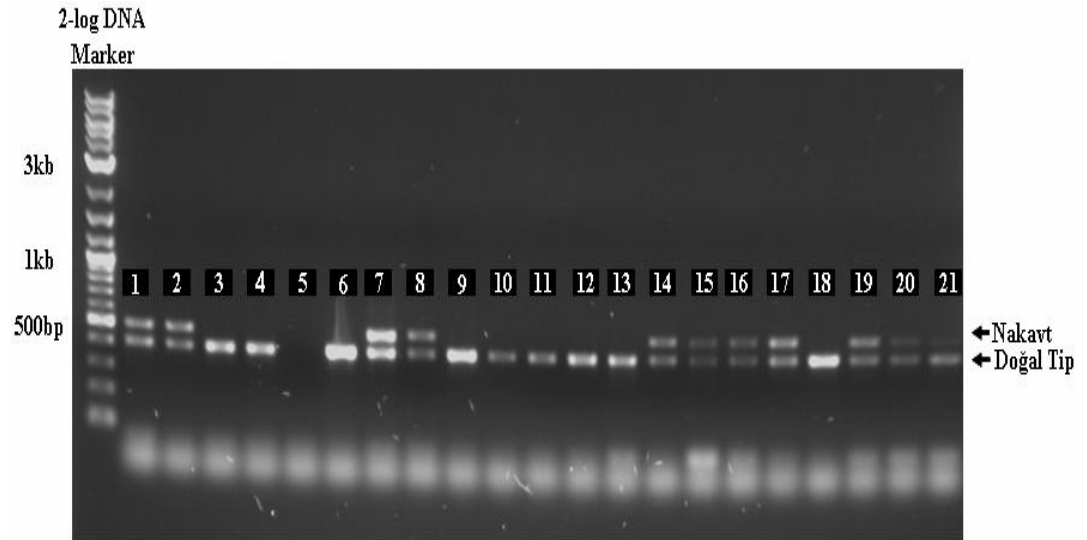
Şekil 4.21. Homolog rekombinasyon (Homologous Recombination) basamağından southern blot metodu ile kontrolü. Floxx allelinden gelen (4,8 kb), Floxsuz allelden gelen (10 kb) ve doğal tip allelden gelen (12 kb) bandların yerleri oklar ile gösterilmiştir.

Homolog rekombinasyon basamağı istediğimiz gibi sonuç veren embriyonik kök hücreler Polygene kırketi tarafından blastom hücrelerine mikro enjeksiyon ile aktararak chimeric fareler elde edildi. Chimeric farelerin çiftleştirilmesi sonucu elde edilen yavru farelerin kuyruklarından biyopsi alınarak genomik DNA izole edildi (3.13.1). BamH1 restriksiyon enzimi ile bu genomik DNAlar için kesme (Digestion) yapıldı 5' homologji bölgesindeki dizilime spesifik radyoaktif prob üretildi ve southern blot yapıldı (Şekil 4.22). Ayrıca primerGTshort-C_ For ve primer GTshort_Rev primerleri kullanılarak PCR ile de genotipleme yapıldı (Şekil 4.23). 20. ve 21. kuyuya chimeric farelerden elde edilen genomik DNAlar pozitif kontrol olarak yüklendi. Diğer kuyulara yüklenen 19 genomik DNA ise bu chimeric farelerden doğal yavrulardan elde edildi. Elde edilen sonuçlar ile 1.,2.,7.,8.,14.,15.,16.,17.,19. kuyulara yüklenen 9 genomik DNAın hem doğal tip (12 kb) hemde Floxx (4,8Kb) bandı içerdiği gösterildi.

Böylece kullanılan embriyonik kök hücrelerden ekey hücreleri geliken chimeric fareler tespit edildi.



şekil 4.22. Ekey hücre hattē transformasyonu (germ line transmission) basamağ ınē southern blot metodu ile kontrolē. Flox allelinden gelen (4,8 kb) ve Doğ al tip allelden gelen (12 kb) bandlarē yerleri oklar ile gösterilmiştir.



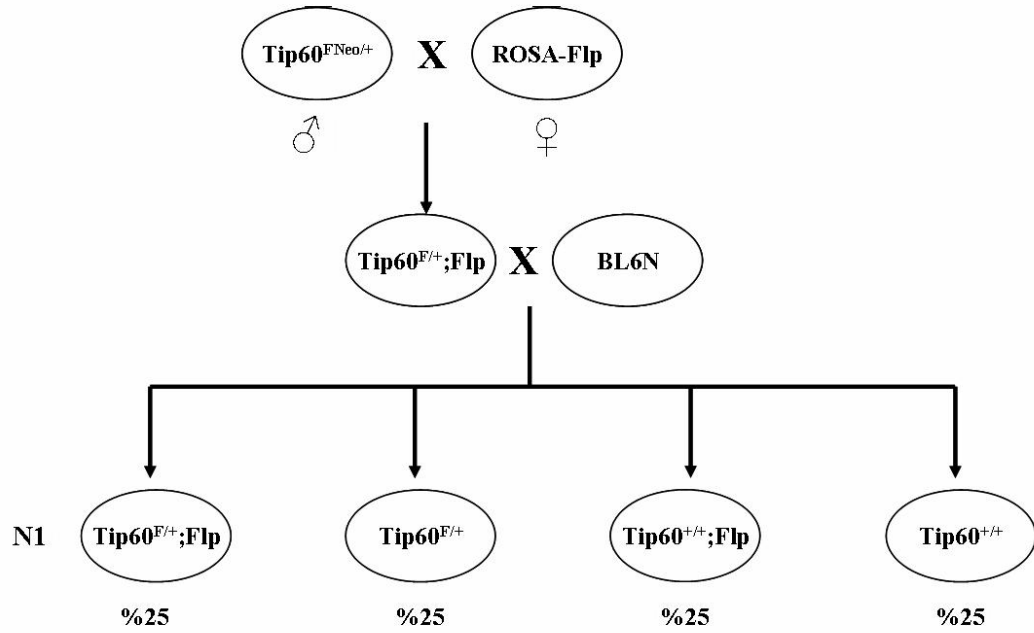
şekil 4.23. Ekey hücre hattē transformasyonu (germ line transmission) basamağ ınē PCR genotipleme metodu ile kontrolē. Flox allelinden gelen (500bp) ve Doğ al tip allelden gelen (400bp) bandlarē yerleri oklar ile gösterilmiştir.

Davranış analizi deneylerinde daha iyi lokomotor aktivite gösterdiği için C57/BL6N (BL6N) genetik bekrandına sahip fareler tercih edilir. Bizim de amacımız bu C57/BL6N genetik backgrounduna sahip Tip60 fareleri deneylerimizde kullanmak. Fakat elde edilen 9 tane Tip60^{Flox/+} faresi 129/Sv genetik bekrandına sahip olduğu için bu fareleri doğrudan tip BL6N genetik bekrandına sahip doğrudan tip fareler ile geri çaprazlama (backcross) yapacağız. Kabul edilebilir seviyede saf C57/BL6N background elde edebilmemiz için en az 7 jenerasyon (N7) iletmemiz 2 yıllık bir süreç gerektirir. Zamandan tasarruf etmek için ilk deneyler karışık (Mix) bekrand fareler ile yapılacaktır. Kuvvetli fenotip elde edilmesi bekrand dezavantajını ortadan kaldıracak fakat zayıf fenotip elde edilmesi bu fenotipin bekrand probleminden kaynaklanabileceği ihtimalini doğurur. Bu durumda deney sonuçları kabul edilebilir seviyede saf bekrand elde edildikten sonra kesinlikle tekrarlanmalı ve doğru rulanmalıdır.

4.4.1. Neomycin antibiyotik direnç marker geninin genomdan silinmesi ve

Tip60^{Flox/Flox} fare hattının elde edilmesi

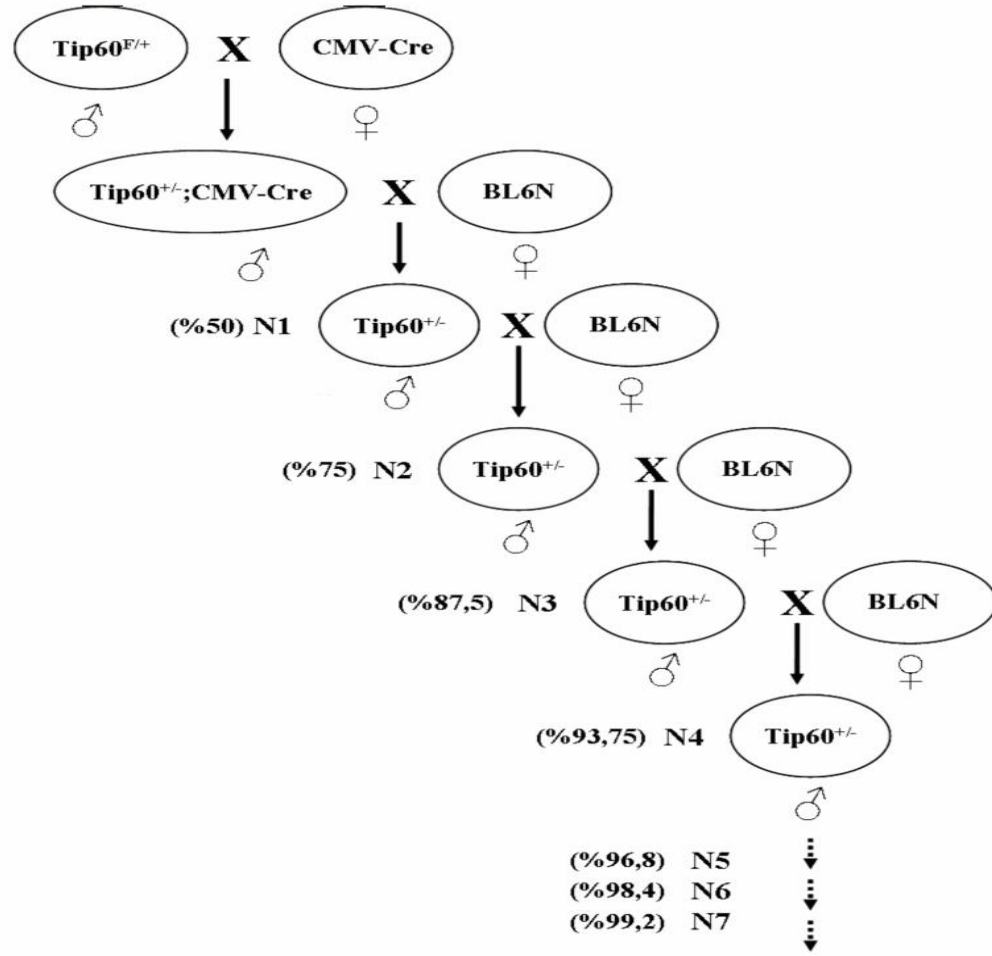
Eğer hücre hattı transformasyonu (germ line transmission) basamağı sonrasında elde edilen 9 Tip60^{Flox/+} farelerinin genomundaki Tip60 geninin içine yerleştirilen neomycin antibiyotik direnç marker geni ekstra fenotip verebilir. Bu sebepten dolayı neomycin genini farelerin genomundan silmek için Rosa lokus promotörü kontrolü altında Flp rekombinaz tüm hücre türlerinde eksprese eden transgenik fare hattı ile çaprazlama (Çifletirme) yapıldığında Flp rekombinaz eksprese olduğu hücre tiplerinde FRT dizilimlerini tanıyarak iki FRT dizilimi arasında kalan bölgeleri siler. Bu çaprazlama ile Neomycin geni bu sayede genomdan uzaklaştırıldı (Şekil 4.24).



Şekil 4.24. Neomycin antibiyotik direnç marker geninin farelerin genomundan silmek için izlenen çaprazlama stratejisi. Çaprazlamalardan elde edilen farklı genotipteki yavruların Mendel kanununa göre dağılım oranları yüzde oranlar olarak gösterilmiştir.

4.4.2. Heterozigot $Tip60^{+/+}$ farelerinin elde edilmesi

Neo geni silinmiş $Tip60^{Flox/+}$ fareleri (N1 jenerasyon), hem koloniyi büyütmek hem de $Tip60^{+/+}$ faresini elde etmek için çaprazlamada kullanıldığında $Tip60^{Flox/+}$ faresi CMV-Cre rekombinaz faresi ile çaprazlandığında CMV promotörü tüm memeli hücre türlerinde yüksek seviyede ekspresyon verme özelliğine sahiptir. Dolayısıyla CMV-Cre rekombinaz faresi her hücre türünde Cre rekombinazı ekspres edeceğinden $Tip60^{Flox}$ allelini Loxp dizilimleri üzerinden her hücre türünde silecektir. Elde edilen hibrit fareler ($Tip60^{+/+};CMVCre$) BL6N genetik bekrandına sahip doğuştan tip fareler ile en az 7 jenerasyon geri çaprazlama (backcross) yapılarak saf BL6N genetik bekrandına çevrilmelidir (Şekil 4.25).

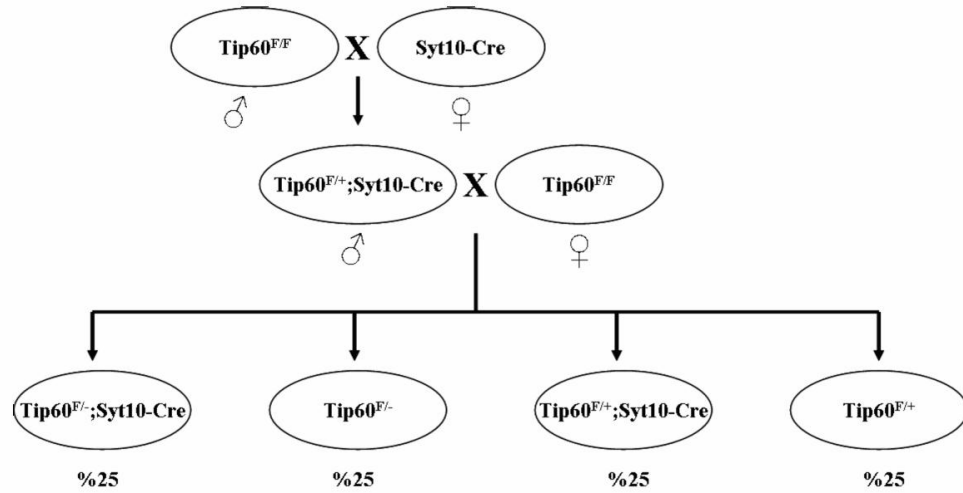


Şekil 4.25. Heterozigot *Tip60* fare elde edilmesinde izlenen çaprazlama stratejisi. Gösterilen yüzde oranlar geri çaprazlama sırasında elde edilen her jenerasyonun genomik bekrandının saf BL6N bekrandına göre saflığı en yüksek olarak göstermektedir.

4.4.3. SCN'de spesifik kontrollü nakavt farelerinin elde edilmesi

Tip60 genini sadece SCN bölgesine spesifik olarak silmek için Dr. Xunlei Zhou tarafından Prof. Dr. Gregor Eichele'nin laboratuvarında dizayn edilmiş *Syt10-Cre* rekombinaz transgenik faresini (yayınlanmamış data) kullanılarak Beyinin diğer bölgelerine nazaran SCN'de daha kuvvetli ve spesifik olarak eksprese olan *Syt10* (synaptotagmin 10) geninin promotörünün kontrolü altında eksprese olan Cre rekombinaz, *Tip60* Flox allelindeki LoxP dizilimleri arasındaki genomik bölgeyi SCN

bölgesine spesifik olarak silecektir. İlk olarak Homozigot Flox Tip60 fare Syt10-Cre faresi ile çaprazlanır. Bu basamaktan sonra dikkat edilmesi gereken husus, Syt10 geninin aynı zamanda erkek eke hücrelerinde eksprese olmasından dolayı çaprazlamalarda erkek Tip60;Syt10-Cre kullanıldığında Tip60 Flox alleli doğacak yavruların her hücresinde Cre rekombinaz tarafından silinecektir. Bu genomik değişim eke hücrelerinde de olacağından sonraki jenerasyonlara da aktarılır. Dişi eke hücrelerinde Syt10 geni eksprese olmadı için çaprazlamalarda dişi Syt10-Cre kullanıldığında böyle bir durum olmayacaktır.



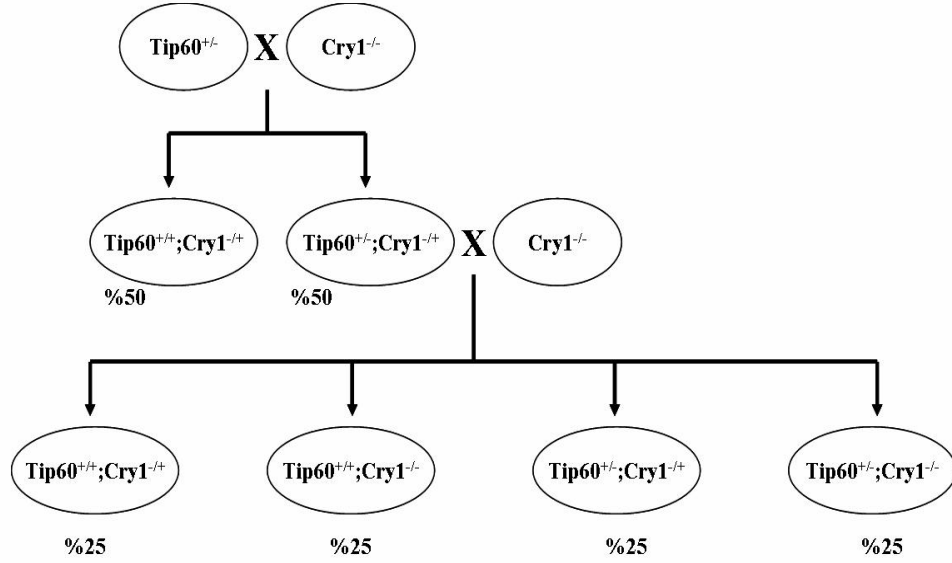
Şekil 4.26. SCN-spesifik kontrollü nakavt farelerinin elde edilmesinde kullanılan çaprazlama stratejisi. Çaprazlamalardan elde edilen farklı genotipteki yavruların Mendelian kanununa göre dağılım oranları yüzde oranlar olarak gösterilmiştir.

Tip60^{F/-};Syt10-Cre genotipine sahip fareler yukarıda belirtilen şekilde gösterildiği şekilde elde edildikten sonra bu fareler SCN-spesifik Tip60 nakavt deneylerimizde kullanılacaktır.

4.4.4. Cry1^{-/-}Tip60^{+/-} farelerinin elde edilmesi

Cry1 nakavt fare hattı Erasmus Üniversitesi, Hücre Biyolojisi ve Genetik Bölümünden temin edildi (Van der Horst *et al.* 1999). Şekil 4. 27 de gösterilen çaprazlama stratejisi

ile $Tip60^{+/-}Cry1^{-/-}$ genotipli fareler elde edildi. Bu genotipe sahip fareler daha sonra davranış analizi deneylerinde kullanıldi



şekil 4.27. $Cry1^{-/-}Tip60^{+/-}$ Farelerinin elde edilmesinde kullanılan çaprazlama stratejisi. Çaprazlamalardan elde edilen farklı genotipteki yavruların Mendelian kanununa göre dağıtım oranları yüzde oranlar olarak gösterilmiştir.

4.5. Davranış Analizi Sonuçları

4.5.1. $Tip60^{+/-}$, $Cry1^{-/-}$, $Cry1^{-/-}Tip60^{+/-}$ ve doğ al tip fareler için yapılan davranış analizi sonuçları

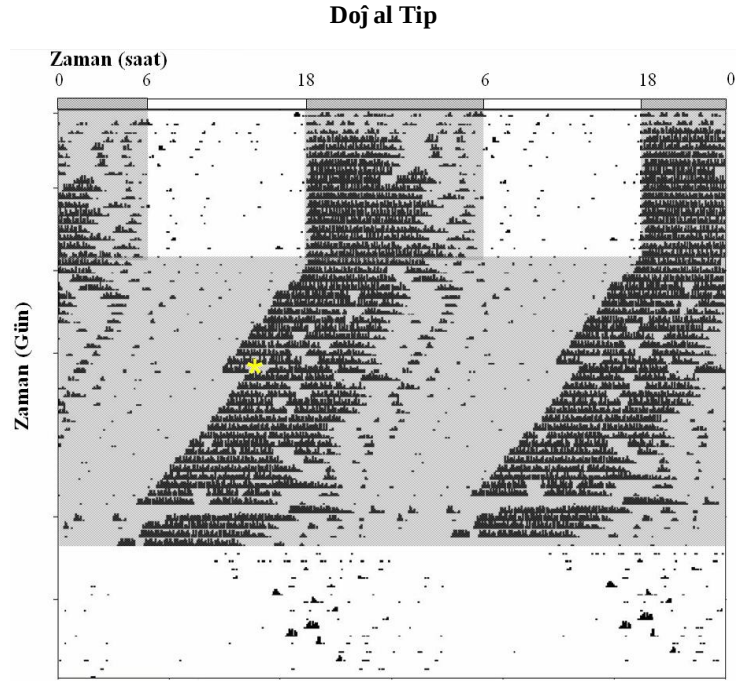
Dışi fareler menstruasyon dönemlerinde istikrarsız lokomotor aktivite gösterdiklerinden dolayı davranış analizi deneylerinde 2-5 aylık erkek fareler kullanıldı. Her bir koku bandı kafesine bir fare konuldu ve dış ortamdan izole edilmiş kutulara yerleştirildi. Kutulara 350 lux kıddetindeki ışık girişi ve kafeslerdeki her bir farenin göstermiş olduğı lokomotor aktivitesinin aktogram olarak kayı edilmesi MATLAB bilgisayar programı ile yapıldı.

DT, Tip60^{+/-}, Cry1^{-/-} ve Tip60^{+/-}Cry1^{-/-} için yapılan davranış analizlerinde *Aschoff tip 1* protokolü uygulandı Fareler ilk olarak bir günün 24 saatten oluktuğu 12 saat ışık-12 saat karanlık (IK:12:12) döngüsünde 10-15 gün arastında tutulduktan sonra bilgisayar programı vasıtasıyla kutulara ışık girişi kesilerek sürekli karanlık (SK) transfer edildi. Minimum 2 hafta sürekli karanlık a maruz bırakıldıktan sonra her bir fare için periyot (Ü hesaplandı ve CT14 zaman aralığında 15 dakika 380 lux ışık verme (Light pulse) deneyi yapıldı Minimum 2 hafta daha sürekli karanlıkta bekletilen fareler 20 lux kiddetinde ışık olduğı sürekli aydınlık (SA) ortamda 2 hafta tutularak tau (Ü değ ikimi gözlemlendi.

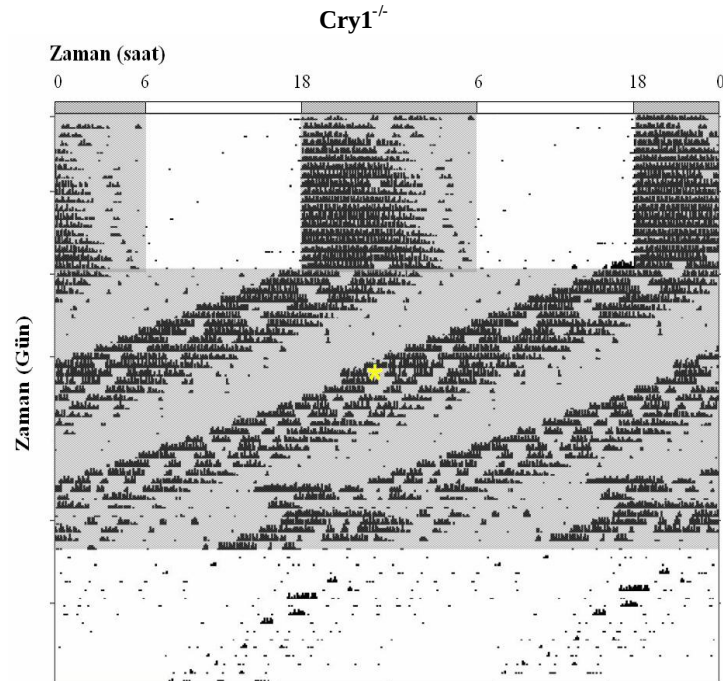
Yapılan davranış analizi sonuçlarına göre, sürekli karanlık altında doğı al tip fareler için periyot uzunluğu (Ü 23,4 saat (şekil 4. 28), Cry1 nakavt fareler için 22,1 saat (şekil 4. 29), heterozigot Tip60 fareler için 23,35 saat (şekil 4.30) ve Tip60^{+/-}Cry1^{-/-} fareleri için 22,54 saat (şekil 4.31) olarak gözlemlendi. Cry1 nakavt farelerin periyot uzunluğu sürekli karanlık (SK) altında önemli derecede kşaldığı van der Horst ve arkadaşları tarafından 1999 yılında yapılan çalışmada gösterilmiştir. Bu deneyde Cry1 nakavt fareler pozitif kontrol olarak kullanıldı Yapılan t-test analizi sonucuna göre SK altında Tip60^{+/-}Cry1^{-/-} farelerinin göstermiş olduğı periyot uzunluğu (Ünun DT ve Tip60^{+/-} fareler ile karşılaştırıldığında önemli derecede kşaldığı gözlemlenirken Tip60^{+/-} farelerde ise önemli bir değ ikililiğ in olmadığı gözlemlendi (şekil 4.32a).

SK altında kısa süreli ışık verme (350 lux) deneyinden sonra yapılan t-test analizine göre Cry1^{-/-} fareleri için aktif fazın baklama zamanı (onset)ın DT, Tip60^{+/-} ve Tip60^{+/-}Cry1^{-/-} farelere göre önemli oranda ertelendiği (phase delay), DT, Tip60^{+/-} ve Tip60^{+/-}Cry1^{-/-} farelerinde ise önemli bir değ ikimin olmadığı gözlemlendi. Burada ilginç olan nokta Tip60^{+/-}Cry1^{-/-} ile Cry1^{-/-} fareleri karşılaştırıldığında zaman, Cry1 geni fare genomundan silindiğinde ışık verme sonrası aktif fazın baklama zamanının önemli derecede kaymasına rağmen ekstradan Tip60 geninin heterozigot olarak silinmesi faz kaymasedeğ erinin DT farelere yaklaşmasına sebep olmasıdır (şekil 4.32c).

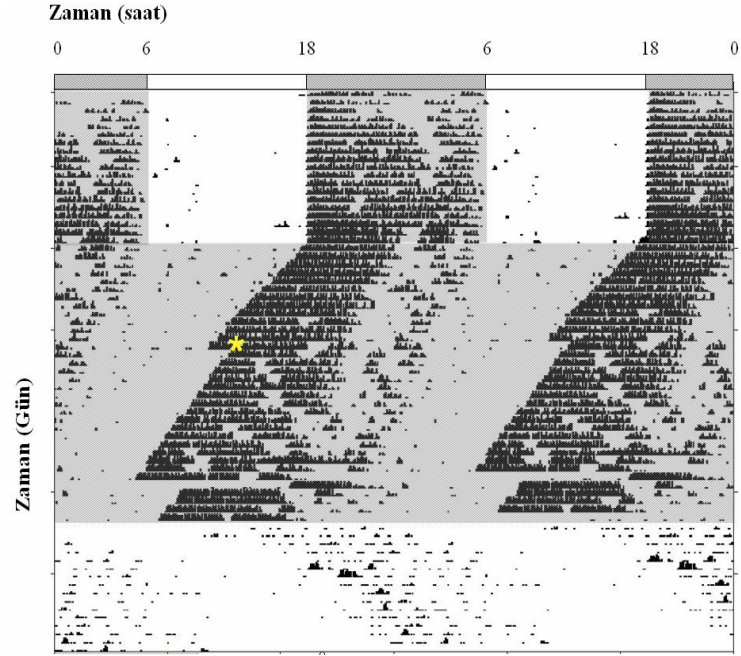
20 lux Sürekli aydınlık (SA) altında Tip60^{+/-}, Tip60^{+/-}Cry1^{-/-} ve Cry1 farelerin göstermiş olduğı periyot uzunluğunun doğı al fareler ile hemen hemen aynı olduğı ve önemlilik ifade etmedüğü t-test analizi ile gösterildi (şekil 4.32b).



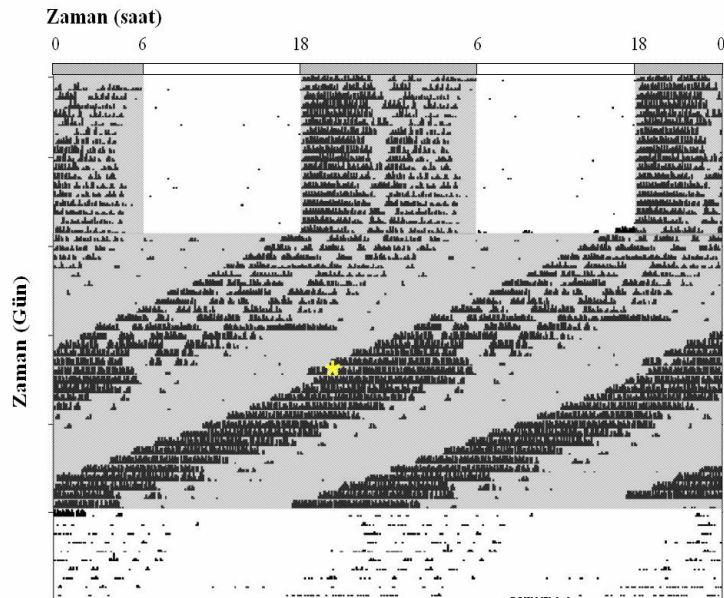
Şekil 4.28. Doğ al tip (DT) fare için yapılan davranış analizi sonucunun aktogram olarak ifadesi. Sarı renkteki yıldıız ikareti kısa süreli aktif olduğunu verildiği CT14 zamanına göstermektedir.



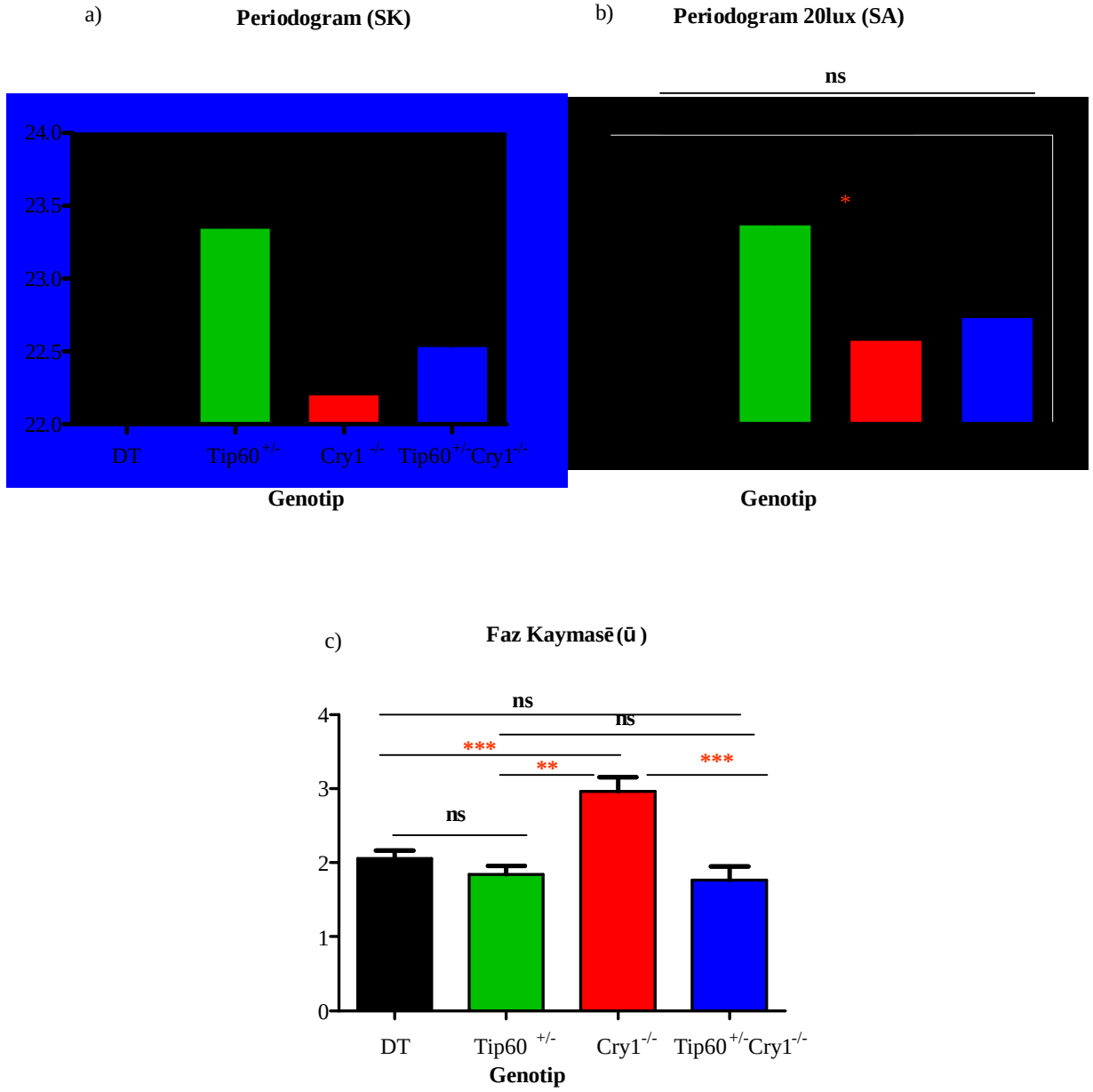
Şekil 4.29. Cry1 nakavt fare için yapılan davranış analizi sonucunun aktogram olarak ifadesi. Sarı renkteki yıldıız ikareti kısa süreli aktif olduğunu verildiği CT14 zamanına göstermektedir.

Tip60^{+/-}

Şekil 4.30. Heterozigot Tip60 fare için yapılan davranış analizi sonucunun aktogram olarak ifadesi. Sarı renkteki yıldız ikareti kısa süreli aktiflik verildiği CT14 zamanına göstermektedir.

Tip60^{+/-} Cry1^{-/-}

Şekil 4.31. Cry1^{-/-}Tip60^{+/-} nakavt fare için yapılan davranış analizi sonucunun aktogram olarak ifadesi. Sarı renkteki yıldız ikareti kısa süreli aktiflik verildiği CT14 zamanına göstermektedir.



Şekil 4. 32. Tip60^{+/-}, Cry1^{-/-}, Cry1^{-/-} Tip60^{+/-} ve Doğ al Tip Fareler için periodogram ve faz kayması grafikleri.

*a) Tip60^{+/-}, Cry1^{-/-}, Cry1^{-/-} Tip60^{+/-} ve doğ al tip farelerin sürekli karanlık altında gösterdikleri periyot uzunluğı u.

b) Tip60^{+/-}, Cry1^{-/-} ve doğ al tip farelerin sürekli aydınlık altında gösterdikleri periyot uzunluğı u.

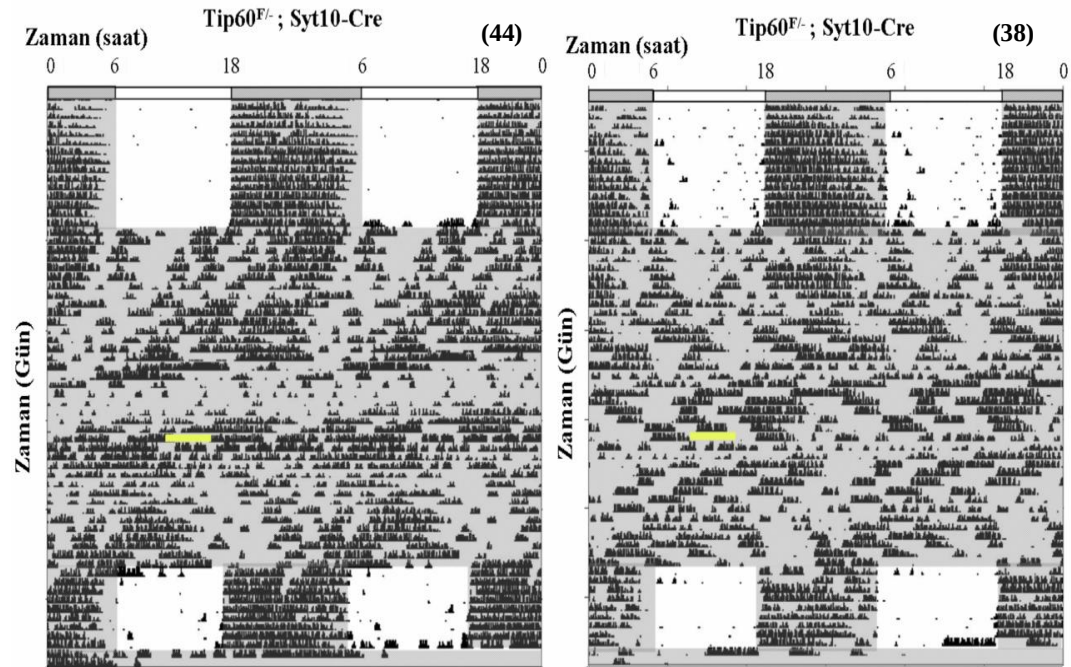
c) Tip60^{+/-}, Cry1^{-/-} ve doğ al tip farelerin kısa süreli ışık verildikten sonra gösterdikleri faz değ ikimi (Phase Delay).

Kırmızı yıldız olarak ifade edilen değerler t-test analizi sonucu elde edilen p değerlerini ifade etmektedir. Önemlilik derecesine göre yıldız sayısı 1 ile 3 arasında doğ ru orantıda olarak değ ikmektedir. p<0,05= *, p<0,01= **, p<0,001= ***

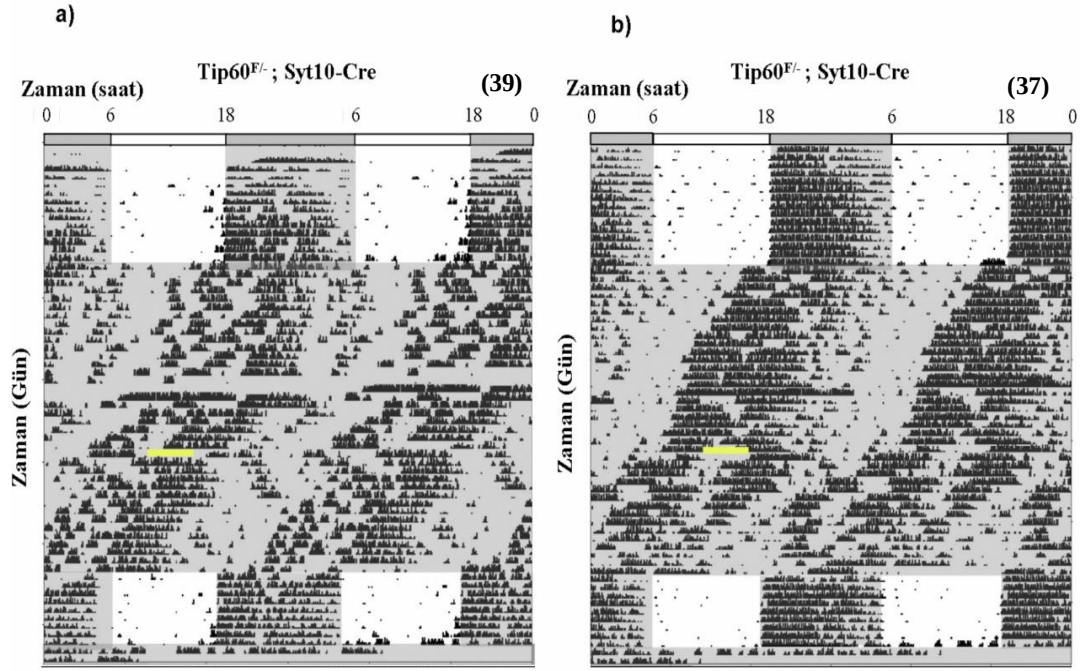
4.5.2. SCNê spesifik kontrollü nakavt fareleri için yapıdan davranış analizi sonuçları

SCNê spesifik Tip60 kontrollü nakavt fareler için yapıdan davranış analizi deneylerinde 2-5 aylık erkek ve Tip60^{F/-};Syt10-Cre genotipindeki fareler kullanıldı. Fareler önce etkenlerden izole edilmeli ve 6 saat ışık girişinin kontrollü olarak yapıldığı kabinlerde 15 gün süre ile IK 12:12 döngüsünde bekletildikten sonra SK döngüsüne transfer edildi ve en az 2 hafta muhafaza edildi. Doğal tip fareler SK altında ritmik davranış gösterirken SCNê spesifik Tip60 kontrollü nakavt fareler çeşitlilik gösteren fenotipler gözlemlendi.

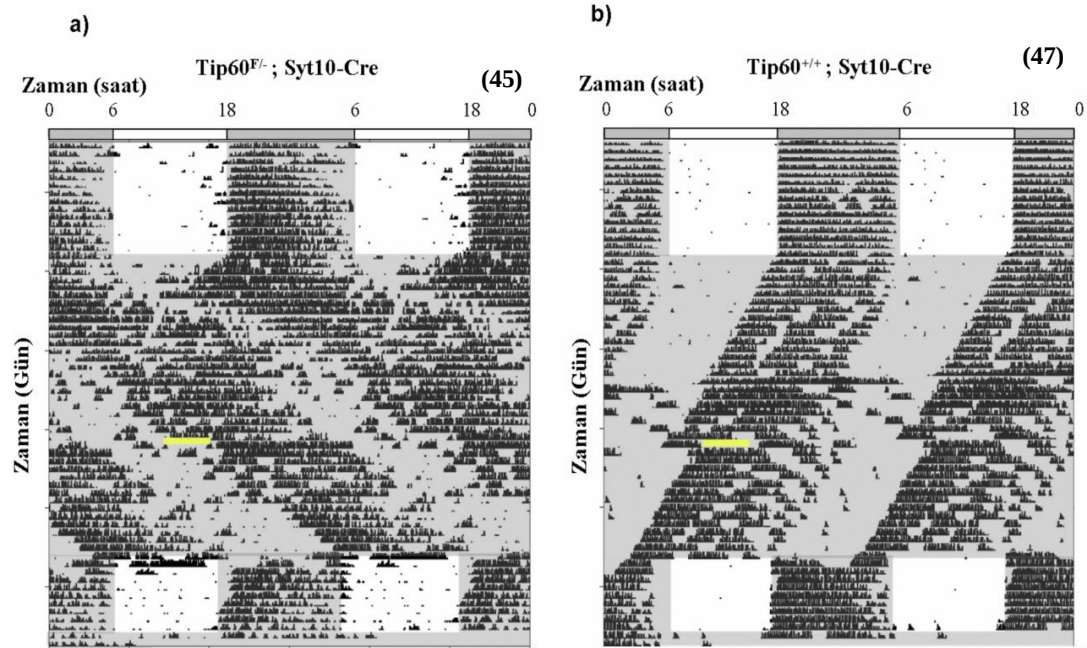
Bir kısım SCNê spesifik Tip60 kontrollü nakavt fareler SK altında belli bir süre ritmik lokomotor aktivite gösterdikten sonra aritmik lokomotor aktivite göstermeye başladı (Şekil 4.33a). Bir kısım fareler ise SK altında direkt aritmik lokomotor aktivite gösterdi (Şekil 4.33b).



Şekil 4.33. SCNê spesifik Tip60 kontrollü nakavt fareler için yapıdan davranış analizi sonucunun aktogram olarak ifadesi. Sarı renk ile gösterilen kısım 6 saat ışık verme ikeleminin yapıldığı zaman aralığı ifade etmektedir.



şekil 4.34. SCNö spesifik Tip60 kontrollü nakavt fareler için yapıdan davranış analizi sonucunun aktogram olarak ifadesi. Sarı renk ile gösterilen kışm 6 saat ışık verme iğleminin yapıldığ ızaman aralığ ını ifade etmektedir.



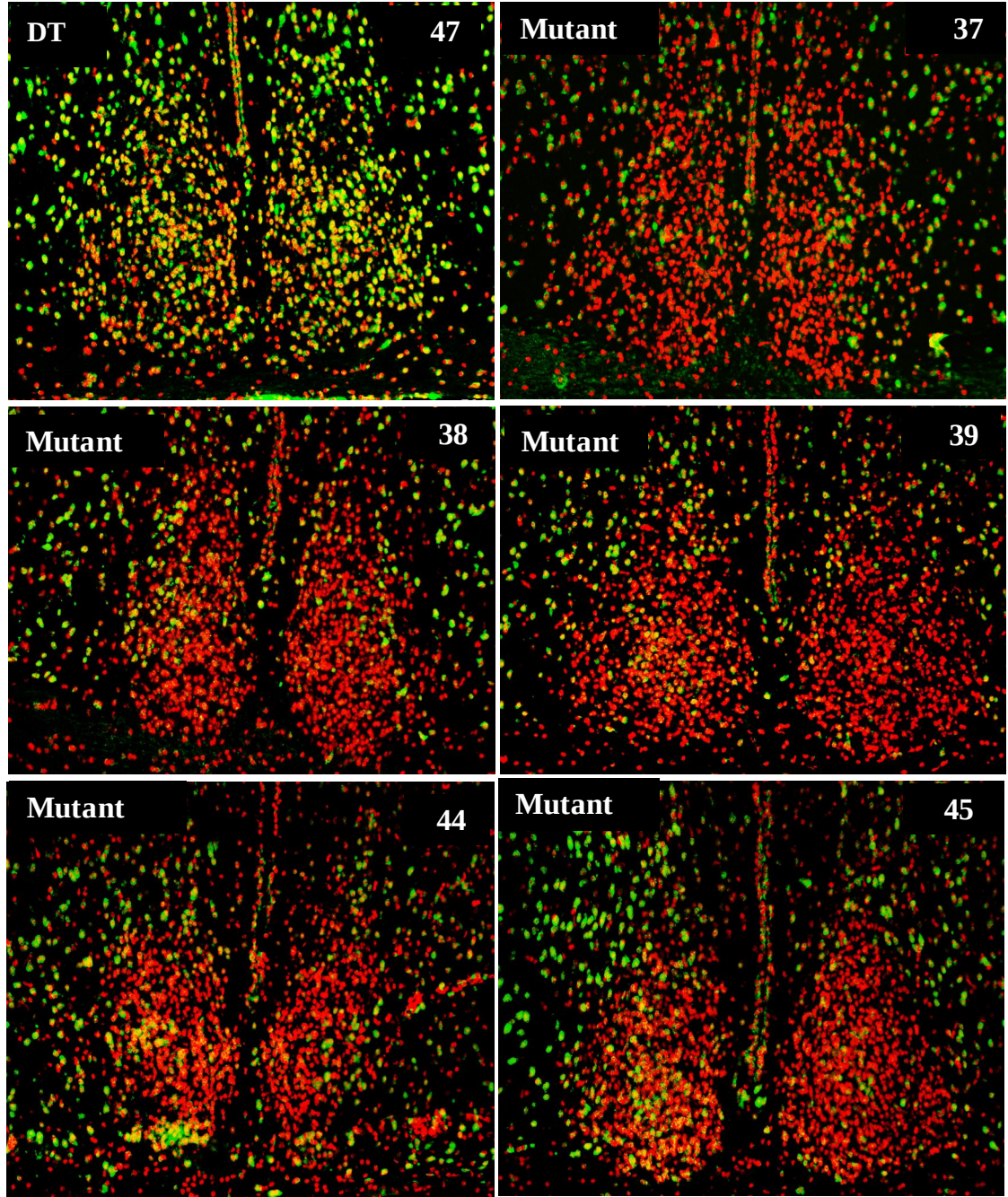
şekil 4.35. SCNö spesifik Tip60 kontrollü nakavt fareler ve doğ al tip fareler için yapıdan davranış analizi sonucunun aktogram olarak ifadesi. Sarı renk ile gösterilen kışm 6 ışık verme iğleminin yapıldığ ızaman aralığ ını ifade etmektedir.

Bir kēān SCNēe spesifik Tip60 kontrollü nakavt fareler SK altēda lokomotor aktivite periyodik olmasēna raĵmen aktif fazēn baklangēç zamanē (onset) günlük farklık gösterirken (ķekil 4.34 a ve b), bir kēān mutant fareler ise uzun tau (Ű) gösterdiĵi gözlemlendi (ķekil 4.35a). Elde edilen sonuçlar ile doĵal tip farelerden elde edilen sonuçlar (ķekil 4.35b) karkādaķēddē ē zaman, Tip60 geninin SCN bölgesinde silinmesi sirkadian sistemin stabilitesini bozulmasēna sebep olduĵunu göstermektedir.

Gözlenen fenotiplerin stabilliĵini kontrol etmek amacē ile 6 saat boyunca 350 lux āā a maruz bēakēdan fareler tekrar SK ortama transfer edildi. SK ortamda fareler aritmik davranēk gösterdiklerinden dolayı āāk verme deneyi için belirli bir zaman aralē ē belirlemek mümkün olmayacaĵından gün içindeki herhangi bir vakitte kutulardaki tüm fareler āāa maruz bēakēdē Fareler āāk verme deneyi öncesi göstermik olduklarē fenotipleri sonrasēnda da gösterdiĵi gözlemlendi.

4.5.3. Davranēk analiz deneyinde fenotip gösteren Tip60;Syt10-Cre fareleri için yapēdan antikor ile doku boyamasēsonuçlarē

Tip60;Syt10-Cre fareler SK altēda aritmik davranēk gösterdiklerinden dolayı belirli bir zaman birimine ait beyin dokusu alēnabilmesi için *Aschoff tip2* protokolü uygulandē 6 saatlik āāk verme deneyinden sonra SK altēda 2-3 hafta muhafaza edilen fareler IK (12:12) döngüsüne transfer edildi ve 7-10 gün bekletildi. Tekrar SK ortama transfer edildikten 1 gün sonra aynē zaman biriminde tüm farelerin boynu kēēarak öldürüldü ve beyin dokularē alēndē OCTōye gömülen beyinlerden 7εmōlik SCN kesitleri krayostat cihazē ile hazēlandē ve Tip60Ex5 antikorı ile doku boyamasē yapēddē Böylece ritmik davranēk gösteren DT fareler ile fenotip gösteren Tip60;Syt10-Cre fareler arasēnda protein seviyesinde kēyaslama yapēddē (ķekil 4.36). Fenotip gösteren farelerin SCN bölgesinde, Syt10 geninin promotorunun kontrolü altēda eksprese olan Cre rekombinazēn Tip60 Flox alleindeki LoxP dizilimleri arasēndaki genomik bölgeyi etkili bir ķekilde sildiĵi gözlemlendi.



Şekil 4.36. Tip60;Syt10-Cre fare beyinlerinden hazırlanan koronal OCT beyin kesitleri için yapılan doku boyama sonuçları

* Resimler üzerindeki numaralar ile aktogram üzerindeki numaralar aynı olduğu sonuçlar aynı fareden elde edildiğini ifade etmektedir.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

İlk olarak HIV (Human immunodeficiency virus)-1 Tat interaktif protein olarak 1996'da karakterize edilen Tat-interaktif protein (Tip60)'nin metabolizmada transkripsiyonu düzenlediği, DNA tamir basamağında görev aldığı, apoptosiz, hücrel cevaplar üretilmesi ve hücre döngüsü gibi birçok nükleer aktiviteye sahip olan nükleer bir protein olduğundan bahsedilmektedir (McAllister *et al.* 2002; Doyon and Côté 2006). Daha sonraki yıllarda yapılan çalışmalarda Tip60 proteinin nükleer fonksiyonlara sahip bir protein olduğu vurgulanmış, fakat bazı durumlarda sitoplazmada lokalize olarak içsel membran reseptörleri ile etkileşim kinaz metabolizması veya gen ekspresyonlarındaki down regüle edebileceği önerilmiştir (Sapountzi *et al.* 2006). Ürettiğimiz ve spesifikliğini bloklayıcı deneyi ile kontrol ederek oluşturduğumuz Tip60Ex5 ve Tip60Nt antikorlarıyla yetiştirilen fare OCT beyin kesitleri doku boyama deneyi yapıldığında Tip60 proteinin her iki formunun hem sitoplazmada hemde çekirdekte lokalize olduğu gösterildi. Bu sonuçtan yola çıkarak, Tip60 proteinin nükleer fonksiyonun yanı sıra sitoplazmik fonksiyonlara sahip bir protein olduğunu ifade edebiliriz. Ayrıca ZT0, ZT6, ZT12, ZT18 olmak üzere 4 farklı zaman birimine ait beyin ve SCN dokuları için western blot yöntemi ile yaptığımız protein ekspresyon analiz sonuçları doğrultusunda, Tip60 proteininin beyin dokusundaki ekspresyonun ZT18 zaman biriminde maksimum seviyeye ulaştığı ve gün içerisindeki ekspresyonunun önemli derecede saygınlık etmesine karşın SCN kısmında Tip60 protein ekspresyonunun gün boyunca hemen hemen aynı seviyede olduğu gösterildi.

McAllister ve arkadaşları northern blot metodu ile yaptıkları gen ekspresyon analizinde, Tip60 geninin E7, E11, E15 ve E17 embriyonik dönemlerde eksprese olduğu, erişkin dönem için ise testis, kalp, beyin, karaciğer ve kalpte yüksek derece eksprese olduğu akciğerde ise daha düşük oranda eksprese olmasına karşın kaslarda ve dalakta ekspresyon gözlemlenmemiştir (McAllister *et al.* 2002). *In situ* hibridizasyon metodu ile E12,5, E13,5, E14,5 ve E15,5 embriyonik dönemler için yaptığımız ekspresyon analizi ile yaygın bir ekspresyon gözlemlenmesine karşın, merkezi sinir sisteminde, karaciğerde, böbrekte, iskeletlerde, sakal kökleri, kafatası gangliyon

hücrelerinde ve dorsal kök ganglion hücrelerinde spesifik ekspresyonlar gözlemlendi. Yetiştiren (P56) beyin için ise yine yaygın bir ekspresyon gözlemlenmesine karşın serebellum, hipokampus ve hipofiz için çok spesifik ekspresyonlar gözlemlendi.

Yapılan birçok çalışmada, asetilasyon, metilasyon, fosforilasyon, ubiquitinasyon ve ADP-ribozilasyon gibi birçok transkripsiyon sonrası modifikasyonların sirkadian sistem üzerindeki etkileri incelenmiştir. 2003 yılında fare karaciğer periferik saati üzerine yapılan çalışmada merkez sirkadian sisteminin transkripsiyon seviyesinde düzenlenmesinde H3 asetilasyonunun önemi belirtilmiştir. CLOCK-BMAL koaktivatör kompleksinin bir bileşeni olan histon asetil transferaz p300'ün tetiklediği BMAL-CLOCK transkripsiyonunun Cry1 tarafından inhibe edildiği gösterilmiştir (Etchegaray *et al.* 2003). 2007 yılında fare karaciğer periferik saati üzerine yapılan diğer bir çalışmada sirkadian mekanizmasında BMAL1 tarafından düzenlenen gen ekspresyonlarının düzenli bir şekilde devam edebilmesi için BMAL1'in asetilenmesinin gerekli olduğu gösterilmiştir (Hirayama *et al.* 2007).

Birçok metabolik fonksiyonu olan Tip60'un bu kadar sirkadian sistemde fonksiyonu olup olmadığına dair herhangi bir araştırma yapılmamıştır. Tip60 geninin sirkadian sistemde olabilecek fonksiyonunu göstermek amacıyla ürettiğimiz Tip60Ex5 ve Tip60Nt antikorları kullanılarak İmmunopresipitasyon (antikor ile çöktürme) yapıldı ve Tip60 proteinin Cry1 proteini ile direkt etkileşim içinde olduğu gösterildi.

Moleküler düzeyde bu ilişkiyi göstermek için mutant fareler geliştirildi. Homozigot Tip60 fareler embriyonik dönemde ölmektedir (yayınlanmamış data). Bu sebepten dolayı davranış analizinde Tip60^{+/-} fareler kullanıldı fakat Işık-Karanlık(12:12), Sürekli Karanlık, kısa süreli ışık verme deneyi ve Sürekli Aydınlık altında herhangi bir fenotip gözlenmedi. Geliştirdiğimiz Cry1^{-/-}Tip60^{+/-} ikili mutant fareler ise IK12:12 altında doğal tip fareler ile aynı olan davranışları gösterdi. Sürekli Karanlık altında gösterdiği periyot uzunluğu (Ü DT fareler ile karşılaştırıldığında önemli derece kısalma göstermesine karşın Sürekli Aydınlık altında doğal tip farelere ile hemen hemen aynı uzunlukta tau (Ü gösterdi. SCN'de spesifik Tip60^{F/+};Sy10-Cre fareler için yapılan davranış analizinde ise

çok önemli ve çeşitlilik gösteren fenotipler gözlemlendi. Işık-Karanlık döngüsünden Sürekli Karanlık ortama transfer edilen bir kışın Tip60^{F/-}; Syt10-Cre fareler direk aritmik davranış göstermeye başladık, bir kışın fareler doğal tip farelere göre daha uzun tau (Ú) gösterdi, diğer bir kışın fareler ise belli bir zaman ritmik davranış gösterdikten sonra aritmik davranış göstermeye başladı fakat ritmik davranış gösterirken de aktif fazın başlangıç (onset) zamanının günlük farklılık gösterdiğini gözlemlendi.

Sonuç olarak; bu tez kapsamında aşağıdaki bulgular elde edilmiştir.

1. Fare beyinde, Tip60 proteinin hem çekirdekte hemde sitoplazmada eksprese olduğunu ve 24 saat süresince ekspresyonunun sürekli olarak devam ettiğini gösterildi.
2. Tip60 proteinin beyin ve SCN dokularındaki günlük ekspresyonları gösterildi.
3. ~~K~~ *in vivo* olarak Tip60 proteini ile Cry1 proteininin etkileşimi gösterildi.
4. Moleküler düzeyde, sirkadian sistemin düzenli olarak devam edebilmesi için Tip60'ın gerekli olduğunu elde ettiğimiz ilk davranış analizi datalarına göre söyleyebiliriz.
5. Farelerde, Tip60 geninin çekitli embriyonik dönemlerdeki ve erişkin (P56) dönemdeki fare beyinde *ISH* yöntemiyle gen ekspresyonları gösterildi.

KAYNAKLAR

- Akhtar, A., Zink, D., & Becker, P. B., **(2000)**. Chromodomains are 748 protein-RNA interaction modules. *Nature*, 407, 405-409.
- Albrecht, U. and Foster, R.G., **(2002)**. Placing ocular mutants into a functional context: a chronobiological approach. *Methods*, 28, 465-477
- Albercht, U., Eichele, G., **(2003)**. The mammalian circadian clock. *Current opinion in genetics & development*, 13(3), 271-7.
- Allen Institute for Brain Science, <http://www.brain-map.org>.
- Alvarez, B., Dahlitz, M.J., Vignau, J., Parkes, J.D., **(1992)**. The delayed sleep phase syndrome: clinical and investigative findings in 14 subjects. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, 55, 665-670
- Balsalobre, A., **(2002)**. Clock genes in mammalian peripheral tissues, *Cell Tissue Res*, 309, 193-9.
- Balsalobre, A., Damiola, F., and Schibler, U. **(1998)**. A serum shock induces circadian gene expression in mammalian tissue culture cells. *Cell*, 93, 929-37.
- Bell-Pedersen, D., Cassone, V. M., Earnest, D. J., Golden, S. S., Hardin, P. E., Thomas, T. L., and Zoran, M. J., **(2005)**. Circadian rhythms from multiple oscillators: lessons from diverse organisms. *Nat Rev Genet*, 6, 544-556.
- Buijs, R. M., and Kalsbeek, A. **(2001)**. Hypothalamic integration of central and peripheral clocks. *Nat Rev Neurosci*, 2, 521-526.
- Bunney, W.E., Bunney, B.G., **(2000)**. Molecular clock genes in man and lower animals: possible implications for circadian abnormalities in depression. *Neuropsychopharmacology*, 22(4), 335-45. Review.
- Canan S., **(2001)**, <http://www.sinancanan.net/bilimsel/ritim.htm>
- Cashmore, A.R., Jarillo, J.A., Wu, Y.-J., and Liu, D., **(1999)**. Cryptochromes: blue light receptors for plants and animals. *Science*, 284, 760-765.
- Cermakian, N., and Sassone-Corsi, P., **(2000)**. Multilevel regulation of the circadian clock, *Nat Rev Mol Cell Biol*, 1, 59-67.
- Damiola F, Le Minh N, Preitner N, Kornmann B, Fleury-Olela F, Schibler U., **(2000)** Restricted feeding uncouples circadian oscillators in peripheral tissues from the central pacemaker in the suprachiasmatic nucleus. *Genes Dev*, 14, 2950-2961.
- Darlington, T. K., Wager-Smith, K., Ceriani, M. F., Staknis, D., Gekakis, N., Steeves, T. D.L., Weitz, C. J., Takahashi, J. S., and Kay, S. A., **(1998)**. Closing the circadian loop: CLOCK-induced transcription of its own inhibitors *per* and *tim*. *Science*, 280, 1599-603.
- Doyon, Y., Côté, J., **(2004)**. The highly conserved and multifunctional NuA4 HAT complex. *Current Opinion in Genetics & Development*, 14, 147-154
- Dunlap, J.C., **(1999)**. Molecular bases for circadian clocks. *Cell*, 9, :271-290.
- Eldebiran, A., Toros, H. ve Ken, O., **(2003)**. Biyolojik ritim, III. Atmosfer Bilimleri Sempozyumu, 19-21 Mart, KTÜ, İstanbul. ISBN.975-561-236-X.
- Etchegaray, J.P., Lee, C. Wade, P.A., Reppert, S.M., **(2003)**. Rhythmic histone acetylation underlies transcription in the mammalian circadian clock. *NATURE*, 421, 177-82

- Fu, L., Pelicano, H., Liu, J., Huang, P., Lee, C., **(2002)**. The Circadian Gene *Period2* Plays an Important Role in Tumor Suppression and DNA Damage Response *In Vivo*. *Cell*, 111, 41i 50.
- Garaulet, M., Madrid, J.A., **(2009)**. Chronobiology, genetics and metabolic syndrome. *Current opinion in lipidology*, 20, 127-34
- Gaughan, L., Brady, M.E., Cook, S., Neal, D.E., Robson, C.N., **(2001)**. Tip60 is a co-activator specific for class I nuclear hormone receptors. *J. Biol. Chem.* 276, 46841i 46848.
- Gekakis, N., Staknis, D., Nguyen, H. B., Davis, F. C., Wilsbacher, L. D., King, D. P., Takahashi, J. S., and Weitz, C. J., **(1998)**. Role of the CLOCK protein in the mammalian circadian mechanism, *Science*, 280, 1564-9.
- Genepaint Atlas. <http://www.genepaint.org/>
- Goldman, B. D., **(2001)**. Mammalian photoperiodic system: formal properties and neuroendocrine mechanisms of photoperiodic time measurement. *J Biol Rhythms*, 16, 283-301
- Gorrini, C., Squatrito, M., Luise, C., Syed, N., Perna, D., Wark, L., Martinato, F., Sardella, D., Verrecchia, A., Bennett, S., Confalonieri, S., Cesaroni, M., Marchesi, F., Gasco, M., Scanziani, E., Capra, M., Mai, S., Nuciforo, P., Crook, T., Lough, J., Amati, B., **(2007)**. Tip60 is a haplo-insufficient tumour suppressor required for an oncogene-induced DNA damage response. *Nature*, 448, 1063-1067
- Griffin, E. A., Jr., Staknis, D., and Weitz, C. J., **(1999)**. Light-independent role of CRY1 and CRY2 in the mammalian circadian clock. *Science*, 286, 768-71.
- Gu, Y. Z., Hogenesch, J. B., and Bradfield, C. A., **(2000)**. The PAS superfamily: sensors of environmental and developmental signals. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 40, 519-61.
- HélèneDuez and Bart Staels, (2007). Rev-erbalpha gives a time cue to metabolism. *FEBS Lett.* **(2007)** Aug 24
- Herzig U., Cadenas C., Sieckmann F., Sierralta W., Thaller C., Visel A. and Eichele G., **(2001)**. Development of high-throughput tools to unravel the complexity of gene expression patterns in the mammalian brain. In: *Complexity in Biological Information Processing*. Bock G. and Goode J., eds. Novartis Foundation Symposium 239 (John Wiley & Sons, Chichester), pp. 129-149
- Herzog, E. D., and Tosini, G., **(2001)**. The mammalian circadian clock shop, *Semin Cell Dev Biol*, 12, 295-303.
- Hirayama, J., Sahar, S., Grimaldi, B., Tamaru, T., Takamatsu, K., Nakahata, Y., Sassone-Corsi P., **(2007)**. CLOCK-mediated acetylation of BMAL1 controls circadian function. *Nature*, 450, 1086-90
- Hirota, T. And Fukada, Y., **(2004)**. Resetting Mechanism of Central and Peripheral Circadian Clocks in Mammals. *Zoological Science*, 21 , .359-368
- Hogenesch, J. B., Gu, Y. Z., Jain, S., and Bradfield, C. A., **(1998)**. The basic-helix-loop-helix-PAS orphan MOP3 forms transcriptionally active complexes with circadian and hypoxia factors, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 5474-9.
- Hogenesch, J. B., Gu, Y. Z., Moran, S. M., Shimomura, K., Radcliffe, L. A., Takahashi, J. S., and Bradfield, C. A., **(2000)**. The basic helix-loop-helix-PAS protein MOP9 is a brainspecific heterodimeric partner of circadian and hypoxia factors. *J Neurosci (Online)* 20, RC83.

- Honma, S., Ikeda, M., Abe, H., Tanahashi, Y., Namihira, M., Honma, K., and Nomura, M., **(1998)**. Circadian oscillation of BMAL1, a partner of a mammalian clock gene Clock, in rat suprachiasmatic nucleus, *Biochem Biophys Res Commun*, 250, 83-7.
- Ikeda, M., Sagara, M., and Inoue, S., **(2000)**. Continuous exposure to dim illumination uncouples temporal patterns of sleep, body temperature, locomotion and drinking behavior in the rat, *Neurosci Lett*, 279, 185-9.
- Ikura, T., Ogryzko, V.V., Grigoriev, M., Groisman, R., Wang, J., Horikoshi, M., Scully R., Qin J. and Nakatani Y., **(2000)**. Involvement of the TIP60 Histone Acetylase Complex in DNA Repair and Apoptosis. *Cell*, 102, 463i 473
- Jin, X., Shearman, L. P., Weaver, D. R., Zylka, M. J., de Vries, G. J., and Reppert, S. M., **(1999)**. A molecular mechanism regulating rhythmic output from the suprachiasmatic circadian clock. *Cell*, 96, 57-68.
- Jud, C., Schmutz, I., Hampp, G., Oster, H., Albrecht, U., **(2005)**. A guideline for analyzing circadian wheel-running behavior in rodents under different lighting conditions. *Biological procedures online* 7(1), 101-116.
- Kalsbeek, A., and Buijs, R. M., **(2002)**. Output pathways of the mammalian suprachiasmatic nucleus: coding circadian time by transmitter selection and specific targeting. *Cell Tissue Res*, 309, 109-18.
- Kamine, J., Elangovan, B., Subramanian, T., Coleman, D., & Chin-nadurai, G., **(1996)**. Identification of a cellular protein that specifically interacts with the essential cysteine region of the HIV-1 Tat transactivator. *Virology*, 216, 357i 366.
- Kay, S. A., **(1997)**. As time PASses: the first mammalian clock gene. *Science*, 276, 1093.
- Keha, E.E., Küfrevioğlu, Ö.Ç, **(2004)**, Biyokimya, Aktif Yayınları, Erzurum.
- Kennaway, D.J., **(2005)**. The role of circadian rhythmicity in reproduction. *Human Reproduction Update*, 11, 91i 101
- Kim, J.H., Kim, B., Cai, L., Choi, H.J., Ohgi, K.A., Tran, C., Chen, C., Chung, C.H., Huber, O., Rose, D.W., Sawyers, C.L., Rosenfeld, M.G., Baek, S.H., **(2005)**. Transcriptional regulation of a metastasis suppressor gene by Tip60 and beta-catenin complexes. *Nature*, 434, 921-26.
- Klug, W.S, Cummings, R.M., ve grupları **(2003)** Genetik Kavramalar (Çeviri: C. Öner) Palme yayıncılık
- Kondratov, R.V., Kondratova, A.A., Gorbacheva, V.Y., Vykhovanets, O.V., Antoch, M.P., **(2006)**. Early aging and age-related pathologies in mice deficient in BMAL1, the core component of the circadian clock. *GENES & DEVELOPMENT*, 20, 1868i 73
- Kume, K., Zylka, M. J., Sriram, S., Shearman, L. P., Weaver, D. R., Jin, X., Maywood, E. S., Hastings, M. H., and Reppert, S. M., **(1999)**. mCRY1 and mCRY2 are essential components of the negative limb of the circadian clock feedback loop. *Cell*, 98, 193-205.
- Legube, G., & Trouche, D., **(2003)**. Identification of a larger form of the histone acetyl transferase TIP60. *Gene*, 310, 161i 168
- McAllister, D., Merlo, X., Lough, J., **(2002)**. Characterization and expression of the mouse tat interactive protein 60 kD (TIP60) gene. *Gene*, 289, 169i 176

- Miller BH, Olson SL, Turek FW, Levine JE, Horton TH, Takahashi JS. **(2004)**. Circadian *Clock* Mutation Disrupts Estrous Cyclicity and Maintenance of Pregnancy. *Current Biology*, 14, 1367i 1373
- Miyamoto, Y., and Sancar, Y. **(1998)**. Vitamin B2-based blue-light photoreceptors in the retinohypothalamic tract as the photoactive pigments for setting the circadian clock in mammals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 6097i 6102.
- Monica Gallego and David M. Virshup. **(2007)**. Post-translational modifications regulate the ticking of the circadian clock. *Nature Reviews*, Volume 8, 139-148.
- Moore, R. Y., and Eichler, V. B. **(1972)**. Loss of a circadian adrenal corticosterone rhythm following suprachiasmatic lesions in the rat, *Brain research* 42, 201-6.
- Murr R, Loizou JI, Yang YG, Cuenin C, Li H, Wang ZQ, Herceg Z. **(2005)**. Histone acetylation by Tip60 modulates loading of repair proteins and repair of DNA double-strand breaks. *Nature Cell Biology* 8, 91-99
- Nevo, E., Guttman, R., Haber, M., and Erez, E. **(1982)**. Activity patterns of evolving mole rats, *J Mammal* 63, 453-463.
- Nordentoft, I., & Jorgensen, P. **(2003)**. The acetyltransferase 60 kDa trans-acting regulatory protein of HIV type 1-interacting protein (TIP60) interacts with the translocation E26 transforming specific leukaemia gene (TEL) and functions as a transcriptional co-repressor. *Biochem. J.*, 374, 165i 173.
- Oishi, K., Fukui, H., and Ishida, N. **(2000)**. Rhythmic expression of BMAL1 mRNA is altered in Clock mutant mice: differential regulation in the suprachiasmatic nucleus and peripheral tissues, *Biochem Biophys Res Commun* 268, 164-71.
- Oishi, K., Sakamoto, K., Okada, T., Nagase, T., and Ishida, N. **(1998)**. Humoral signals mediate the circadian expression of rat period homologue (rPer2) mRNA in peripheral tissues, *Neurosci Lett* 256, 117-9.
- Oster H, Maronde E, Albercht U. **(2002)** The circadian clock as a molecular calendar. *Chronobiology international* May;19(3):507-16.
- Oster H, Maronde E, Albrecht U. The circadian clock as a molecular calendar. *Chronobiol Int.* **(2002)** May;19(3):507-16. Review.
- Panda, S., Antoch, M. P., Miller, B. H., Su, A. I., Schook, A. B., Straume, M., Schultz, P. G., Kay, S. A., Takahashi, J. S., and Hogenesch, J. B. **(2002)**. Coordinated transcription of key pathways in the mouse by the circadian clock, *Cell* 109, 307-20.
- Paul E. Hardin and Wangjie Yu, **(2006)**, Circadian Transcription: Passing the HAT to CLOCK, *Cell* 125, May 5, 424-426
- Phillip L. Lowrey and Joseph S. Takahashi. **(2004)**. Mammalian Circadian Biology: Elucidating Genome-Wide Levels of Temporal Organization. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 5:407i 41
- Pittendrigh, C. S. **(1993)**. Temporal organization: reflections of a Darwinian clock-watcher, *Annu Rev Physiol* 55, 16-54.
- Polevoda, B., & Sherman, F. **(2002)**. The diversity of acetylated proteins. *Genome Biol.*, 3 [reviews].
- Ralph, M.R., Foster, R.G., Davis, F.C., and Menaker, M. **(1990)**. Transplanted suprachiasmatic nucleus determines circadian period. *Science* 247, 975i 978
- Ran, Q., & Pereira-Smith, O. M. **(2000)**. Identification of an alternatively spliced form of the Tat interactive protein (TIP60), TIP60(beta). *Gene*, 258, 141i 146.

- Raphael Margueron, Patrick Trojer ve Danny Reinberg, The key to development: interpreting the histone code?, *Current Opinion in Genetics & Development* **(2005)**, 15:163-176
- Rensing, L., Meyer-Grahl, U., and Ruoff, P., **(2001)**. Biological timing and the clock metaphor: oscillatory and hourglass mechanisms. *Chronobiol Int*, 18, 329-69.
- Reppert, S. M., **(1998)**. A clockwork explosion!, *Neuron*, 21, 1-4.
- Reppert, S.M, Weaver, D.R., **(2001)**. Molecular analysis of mammalian circadian rhythms. *Annu. Rev. Physiol.*, 63, 647-76.
- Ripperger, J. A., Shearman, L. P., Reppert, S. M., and Schibler, U., **(2000)**. CLOCK, an essential pacemaker component, controls expression of the circadian transcription factor DBP. *Genes Dev*, 14, 679-89.
- Ripperger, J.A. and Schibler, U., **(2001)**. Circadian regulation of gene expression in animals. *Current Opinion in Cell Biology*, 13, 357-362
- Rudic, R.D., McNamara, P., Curtis, A.M., Boston, R.C., Panda, S., Hogenesch, J.B., Fitzgerald, G.A., **(2004)**. BMAL1 and CLOCK, Two Essential Components of the Circadian Clock, Are Involved in Glucose Homeostasis. *PLoS Biology*, 2, 1893-99
- Sack, R.L., **(2009)**. The pathophysiology of jet lag. *Travel medicine and infectious disease*, 7, 102-10
- Sapountzi, V., Logan, I.R., Robson, C.N., **(2006)**. Cellular functions of TIP60. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 38(9), 1496-509.
- Schibler, U. and Sassone-Corsi, P., **(2002)**. A web of circadian pacemakers. *Cell* 111, 919-922.
- Schibler, U., Ripperger, J. and Brown, S.A., **(2003)**. Peripheral Circadian Oscillators in Mammals: Time and Food. *J Biol Rhythms*, 18; 250
- Schwartz, W. J., de la Iglesia, H. O., Zlomanczuk, P., and Illnerova, H., **(2001)**. Encoding le quattro stagioni within the mammalian brain: photoperiodic orchestration through the suprachiasmatic nucleus. *J Biol Rhythms*, 6, 302-11.
- Sensi, S., Pace-Palitti, V., Guagnaro, M.T., **(1993)**. Chronobiology in endocrinology. *Ann Ist Super Sanita*, 23:613-631.
- Silver, R., LeSauter, J., Tresco, P. A., and Lehman, M. N., **(1996)**. A diffusible coupling signal from the transplanted suprachiasmatic nucleus controlling circadian locomotor rhythms, *Nature*, 382, 810-3.
- Stephan, F. K. and Zucker, I., **(1972)**. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 69, 1583-1596.
- Sterner, D.E., Berger, S.L., **(2000)**. Acetylation of histones and transcription-related factors. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 64, 435-459.
- Storch, K., Lipan, O., Leykin, I., Viswanathan, N., Davis, F., Wong, W., and Weitz, C., **(2002)**. Extensive and divergent circadian gene expression in liver and heart, *Nature* 417, 78-83.
- Tang, Y., Luo, J., Zhang, W., Gu, W., **(2006)**. Tip60-Dependent Acetylation of p53 Modulates the Decision between Cell-Cycle Arrest and Apoptosis Molecular. *Cell*, 124, 827-839.

- Thresher, R.J., Vitaterna, M.H., Miyamoto, Y., Kazantsev, A., Hsu, D.S., Petit, C., Selby, C.P., Dawut, L., Smithies, O., Takahashi, J.S., and Sancar, A., **(1998)**. Role of mouse cryptochrome blue-light photoreceptor in circadian photoresponses. *Science*, 282, 1490-1494.
- Toh, K. L., Jones, C. R., He, Y., Eide, E. J., Hinz, W. A., Virshup, D. M., Ptacek, L. J., and Fu, Y. H., **(2001)**. An hPer2 phosphorylation site mutation in familial advanced sleep phase syndrome. *Science* 291, 1040-1043.
- Turek FW, Joshu C, Kohsaka A, Lin E, Ivanova G, McDearmon E, Laposky A, Losee-Olson S, Easton A, Jensen DR, Eckel RH, Takahashi JS, Bass J., **(2005)**. Obesity and Metabolic Syndrome in Circadian Clock Mutant Mice. *Science*, 308, 1043-45
- Ukai-Tadenuma, M., Kasukawa, T. and Ueda, H.R., **(2008)**. Proof-by-synthesis of the transcriptional logic of mammalian circadian clocks. *Nature cell biology*, 10 (10), 1154-63
- Utley, R. T., & Cote, J. **(2003)**. The MYST family of histone acetyltransferases. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 274, 203-236.
- Van den Pol, A. N., Finkbeiner, S. M., and Cornell-Bell, A. H., **(1992)**. Calcium excitability and oscillations in suprachiasmatic nucleus neurons and glia in vitro. *J Neurosci*, 12, 2648-64.
- Van der Horst, G.T.J., Muijtens, M., Kobayashi, K., Takano, R., Kanno, S.-I., Takao, M., De Wit, J., Verkerk, A., Eker, A.P.M., Leenen, D.V., et al., **(1999)**. Mammalian Cry1 and Cry2 are essential for maintenance of circadian rhythms. *Nature*, 398, 627-630.
- Vitaterna, M. H., King, D. P., Chang, A. M., Kornhauser, J. M., Lowrey, P. L., McDonald, J. D., Dove, W. F., Pinto, L. H., Turek, F. W., and Takahashi, J. S., **(1994)**. Mutagenesis and mapping of a mouse gene, Clock, essential for circadian behavior. *Science* 264, 719-25.
- Wilsbacher, L.D., Yamazaki, S., Herzog, E.D., Song, E.J., Radcliffe, L.A., Abe, M., Block, G., Spitznagel, E., Menaker, M., Takahashi, J.S., **(2002)**. Photic and circadian expression of luciferase in mPeriod1-luc transgenic mice in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99:489-494.
- Xiao, H., Chung, J., Kao, H. Y., & Yang, Y. C., **(2003)**. TIP60 is a co-repressor for STAT3. *J. Biol. Chem.*, 278, 11197-11204.
- Yamazaki, S., Numano, R., Abe, M., Hida, A., Takahashi, R., Ueda, M., Block G.D., Sakaki, Y., Menaker, M., Tei, H., **(2000)**. Resetting central and peripheral circadian oscillators in transgenic rats. *Science*, 288:682-685

ÖZGEÇMİŞ

1980 yēānda Erzurum`da doĵ du. İlk, orta ve lise öĵrenimini Erzurum`da tamamladē 1998 yēānda girdiĵ i Atatürk Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümüōnden 2002 yēānda mezun oldu. Yüksek Lisans eĵitimini Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalēānda 2005 yēānda tamamladē Aynē yēā doktora eĵitimine Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalēānda baēladē ve Mart 2006`dan beri doktora programēādaki tüm laboratuvar çālēmalarēēē Max-Planck Enstitüsü Genler ve Davranēk Bölümünde (Max Planck Institute for biophysical Chemistry Department of Genes and Behavior, Almanya, Göttingen) yapmēātē.