



**TİP60 GENİNİN FARE KARACİĞER
DOKUSUNDAKİ İNFLAMASYON YOLAĞI
ÜZERİNE ETKİSİNİN GEN VE PROTEİN
SEVİYESİNDE ARAŞTIRILMASI**

Şeyda Nur ÇAKIR

Yüksek Lisans Tezi

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Genetik Bilim Dalı

Doç. Dr. Harun BUDAK

2016

Her hakkı saklıdır

**ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**TİP60 GENİNİN FARE KARACİĞER DOKUSUNDAKİ
İNFLAMASYON YOLAĞI ÜZERİNE ETKİSİNİN GEN VE
PROTEİN SEVİYESİNDE ARAŞTIRILMASI**

Şeyda Nur ÇAKIR

**MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI
Genetik Bilim Dalı**

**ERZURUM
2016**

Her hakkı saklıdır



T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü



TEZ ONAY FORMU

TİP60 GENİNİN FARE KARACİĞER DOKUSUNDAKİ İNFLAMASYON YOLAĞI ÜZERİNE
ETKİSİNİN GEN VE PROTEİN SEVİYESİNDE ARAŞTIRILMASI

Doç. Dr. Harun BUDAK danışmanlığında, Şeyda Nur ÇAKIR tarafından hazırlanan bu çalışma, 27/06/2016 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Genetik Bilim Dalı'nda Yüksek lisans tezi olarak **oybirliği / oy çokluğu (.../...)** ile kabul edilmiştir.

Başkan: Doç. Dr. Melda ŞİŞECİOĞLU

İmza :

Üye : Doç. Dr. Arzu GÖRMEZ

İmza :

Üye : Doç. Dr. Harun BUDAK

İmza :

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulu'nun **21.10.2016** tarih ve **29...../21.....** nolu kararı ile onaylanmıştır.


Prof. Dr. Ertan YILDIRIM
Enstitü Müdürü

Bu çalışma Tübitak 1001 projeleri kapsamında desteklenmiştir.
Proje No:114Z277

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan bildiriş, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

TİP60 GENİNİN FARE KARACİĞER DOKUSUNDAKİ İNFLAMASYON YOLAĞI ÜZERİNE ETKİSİNİN GEN VE PROTEİN SEVİYESİNDE ARAŞTIRILMASI

Şeyda Nur ÇAKIR

Atatürk Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Genetik Bilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Harun BUDAK

İnflamasyon, enfeksiyon durumunda immün sistemin ilk yanıtıdır. Bakteriyal veya viral enfeksiyon durumunda, konak savunma sistemi patojenlere karşı ilk immün yanıt olarak proinflatör sitokinleri indükler. Proinflatör sitokinlerin salınımı inflamasyonu düzenler. IL-6 (İnterlökin 6), inflamasyonda yer alan birçok genin ekspresyonunu düzenlediği için artan IL-6 gen ekspresyonu bir inflamatör markır olarak kabul edilir. IL-6 ekspresyonu arttıktan sonra STAT3 (Sinyal Dönüştürücü ve Transkripsiyon Aktivatörü 3) epigenetik mekanizmalar aracılığıyla fosforillenen JAK1/2 (Janus Kinaz 1/2) tarafından aktive edilir. Bu JAK/STAT yolağının aktivasyonu sonucu, HAMP (Hepsidin Antimikrobiyal Peptid)'in ekspresyonu artar. TİP60 (Tat İnteraktif Protein-60kDa) histon asetiltransferaz (HATs)'ların MYST (MOZ, Ybf2/Sas3, Sas2 ve Tip60) protein ailesinin bir üyesidir ve TİP60 doğrudan veya dolaylı olarak transkripsiyonel regülasyon, DNA hasar tamiri, hücre döngüsü, apoptozis yolağı, kanser, sirkadiyen sistem ve hücrel sinyal mekanizmaları gibi önemli ve hayati bir fonksiyona sahiptir. Karaciğer spesifik Tip60 nakavt farelerde yapılan bir önceki çalışmada, inflamasyon yolağı üzerinde önemli bir fonksiyonu olan hepsidin hormonunun ekspresyonunun Tip60 silinmiş fare karaciğerinde önemli derecede baskılandığı gösterilmiştir. Üstelik, TİP60'ın inflamasyon yolağı üzerine doğrudan veya dolaylı olarak bir role sahip olabileceği düşünülmektedir. Bu tez çalışmasında, *Il-1a* ve *Il-6* gibi inflamatör sitokinlerin ve JAK/STAT yolağına ait *Jak1*, *Jak2*, *Stat3* ve *Hamp* gen ekspresyonlarındaki kantitatif değişiklikler, kontrol, LPS indüklenmiş inflamasyon ve karaciğer spesifik Tip60 nakavt fare gruplarından elde edilen karaciğer dokularında kantitatif Real Time PCR kullanarak ölçüldü. Protein ekspresyonundaki kantitatif değişiklikler gen ve protein ekspresyonu arasındaki olası ilişkiyi belirlemek için western blot analizi kullanarak ölçüldü. Western blot sonuçları ayrıca immünohistokimya ile doğrulandı. Sonuç olarak, TİP60'ın inflamasyon yolağı üzerinde gen ve protein seviyesinde önemli bir etkiye sahip olduğu gösterilmiştir.

2016, 98

Anahtar Kelimeler: TİP60, İnflamasyon, Nakavt, Gen Ekspresyon, Protein Ekspresyon

ABSTRACT

Master Thesis

INVESTIGATION OF THE IMPACT OF TIP60 GENE ON INFLAMMATION PATHWAY IN MOUSE LIVER AT GENE AND PROTEIN LEVEL

Şeyda Nur ÇAKIR

Ataturk University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Molecular Biology and Genetic
Department of Genetics

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Harun BUDAK

Inflammation is the first responses of the immune system to infection. In the case of bacterial or viral infection, the host defense system induces proinflammatory cytokines against the pathogen as a first immune response. The release of proinflammatory cytokines promotes the inflammation. As IL-6 (Interleukin 6) modulates the expression of many genes involved in inflammation, increased IL-6 gene expression is accepted as an inflammatory marker. After the increase in IL-6 expression, STAT3 (Signal Transducer and Activator of Transcription 3) is activated by JAK1/2 (Janus Kinase 1/2), which are phosphorylated by means of epigenetic mechanisms. As a result of the activation of this JAK/STAT pathway, expression of HAMP (Hepcidin Antimicrobial Peptide) increases. TIP60 is a member of the MYST (MOZ, ybf2/sas3, SAS2, and Tip60) protein family of histone acetyltransferases (HATs), and TIP60 has important and vital functions either directly or indirectly such as transcriptional regulation, DNA repair, cell cycle, apoptosis pathways, cancer, circadian systems, and cellular response mechanisms. The previous study in liver specific Tip60 conditional knockout mice showed that the expression of hepcidin hormone, which has an important function on the inflammation pathways, has shown significant reduction (repression) in Tip60 deleted mouse liver. Therefore, it is thought that TIP60 may have a direct or indirect role in the inflammation pathway. In this thesis study, quantitative changes in gene expressions of the inflammatory cytokines such as *Il-1α* and *Il-6*, and JAK/STAT pathway including *Jak1*, *Jak2*, *Stat3* and *Hamp* were measured using quantitative Real Time PCR in liver tissues obtained from control, LPS induced inflammation and liver specific Tip60 conditional knockout mice groups. Quantitative changes in protein expression were measured using western blot analysis to establish a possible relationship between the gene and protein expressions. Western blot results were also confirmed by immunohistochemistry. In conclusion, it is well demonstrated that TIP60 has an important impact on the inflammation pathway at the gene and protein level.

2016, 98

Keywords: TIP60, Inflammation, Knockout, Gene Expression, Protein Expression

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans tezi olarak sunulan bu çalışma Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) tarafından 114Z277 nolu 1001 Programı Araştırma Projesi kapsamında alınan destek ile Atatürk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında Sayın Doç. Dr. Harun BUDAK yöneticiliğinde hazırlanmıştır.

Hazırlanan bu tez çalışması süresince bana her türlü yardım ve desteği sağlayan, bilgi ve tecrübelerinden her zaman faydalandığım çok değerli hocam Sayın Doç. Dr. Harun BUDAK'a teşekkür ederim.

Deneysel çalışmalarımız için gerekli dokuların temini aşamasında göstermiş olduğu yardımlardan dolayı Max-Planck Enstitüsü Biyofiziksel Kimya, Gen ve Davranış Bölümü (Göttingen/Almanya) Direktörü Mr. Prof. Dr. Gregor EICHELE'ye teşekkür ederim.

Deney hayvanı temininde ve enjeksiyon uygulamalarındaki yardımlarından dolayı Tıbbi Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden Sayın Doç. Dr. Orhan AKMAN'a, İmmünohistokimya çalışmalarındaki yardımlarından dolayı Tıp Fakültesi, Tıbbi Patoloji ABD'den Sayın Prof. Dr. Cemal GÜNDOĞDU ve Sayın Yrd. Doç. Dr. Mevlüt ALBAYRAK'a teşekkür ederim.

Atatürk Üniversitesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı öğretim üyelerine ve çalışanlarına, çalışmalarımın farklı aşamalarında bana yardımcı olan Sayın Dr. Enver Fehim KOÇPINAR, Sayın Nurdan GÖNÜL, Sayın Sümeyye ARSLAN, Sayın Aslıhan BASTEM, Sayın Yeliz DEMİR'e teşekkür ederim.

Ayrıca ömrüm boyunca maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen dualarını her daim hissettiğim babam Sayın Mevlüt ÇAKIR, annem Sayın Gönül ÇAKIR ve kardeşim Sayın Ömer ÇAKIR'a teşekkürü bir borç bilirim.

Şeyda Nur ÇAKIR

Temmuz, 2016

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ.....	1
1.1. İnflamasyon	1
1.1.1. Doğal immünite.....	2
1.1.2. Edinsel (adaptif) immünite.....	3
1.1.3. Yangı oluşturan hücreler ve yangının oluşumu.....	4
1.1.4. İnflamasyonun moleküler mekanizmaları	5
1.1.5. JAK/STAT yolağı.....	9
1.2. Histon Proteinleri	12
1.3. Epigenetik ve Histon Modifikasyonları	13
1.4. TİP60 (HIV-1 Tat İnteraktif Protein)	15
1.5. TİP60 ve Apoptosis Mekanizması	17
2. KAYNAK ÖZETLERİ	20
2.1. Amaç	23
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	25
3.1. Kullanılan Kimyasallar.....	25
3.2. Tez Kapsamında Kullanılan Materyal ve Cihazlar	27
3.3. Tez Kapsamında Yapılan Deneylerde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanışı.....	28
3.4. Farelerde İnflamasyon Modelinin Oluşturulması.....	30
3.5. Tip60 Geninin Karaciğere Spesifik Olarak Silinmesi.....	33
3.6. Real Time PCR Uygulaması	34
3.6.1. Total RNA İzolasyonu.....	34
3.6.2. RNA'nın agaroz jel elektroforezinde kontrolü.....	35
3.6.3. Agaroz jelin hazırlanması.....	36

3.6.4. Yürütülecek RNA örneğinin hazırlanması	36
3.6.5. Elektroforez işlemi	36
3.6.6. RNA'nın konsantrasyon ve saflığının belirlenmesi	37
3.6.7. cDNA kütüphanesinin hazırlanması.....	37
3.6.8. Primer ve prob dizaynı	38
3.6.8.a. Primer ve prob dizaynı için gen sekansına ulaşılması.....	38
3.6.8.b. Real-Time PCR analizi.....	46
3.6.8.c. Sonuçların değerlendirilmesi ve istatistikî analizler.....	48
3.7. Protein Ekspresyon Analizleri.....	49
3.7.1. Bradford (commassie blue) protein tayini.....	49
3.7.2. Western blot	50
3.7.2.a. Fare karaciğer dokusundan total proteinin ekstrakte edilmesi	51
3.7.2.b. SDS jelinin hazırlanması ve yüklenmesi.....	51
3.7.2.c. Jeldeki proteinin membrana transferi (blotlama), bloklama ve görüntüleme basamağı	53
3.7.3. Antikor ile doku boyaması (immünohistokimya)	55
3.7.3.a. Dokuların fikse edilmesi, parafin içerisine gömülmesi ve doku kesitlerinin hazırlanması	56
3.7.4. İmmünohistokimyasal çalışma prosedürü.....	57
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	59
4.1. Total RNA İzolasyon Sonucu.....	59
4.2. Real Time PCR Analiz Sonuçları.....	62
4.2.1. İnterlökin 6 (<i>Il-6</i>) geninin mRNA ekspresyonu.....	62
4.2.2. İnterlökin 1 alpha (<i>Il-1α</i>) mRNA ekspresyonu	63
4.2.3. Janus kinaz 1 (<i>Jak1</i>) mRNA ekspresyonu	64
4.2.4. Janus kinaz 2 (<i>Jak2</i>) mRNA ekspresyonu	65
4.2.5. Sinyal ileticisi ve transkripsiyon aktivatörü 3 (<i>Stat3</i>) mRNA ekspresyonu	67
4.2.6. Hepsidin antimikrobiyal peptid (<i>Hamp</i>) mRNA ekspresyonu.....	68
4.2.7. K (Lizin) asetiltransferaz 5 (<i>Kat5</i>)/(<i>Tip60</i>) mRNA ekspresyonu.....	69
4.3. Western Blot Analizi	70
4.3.1. IL-6 proteinin western blot analizi	70
4.3.2. IL-1α proteinin western blot analizi	72

4.3.3. p-JAK1 proteinine ait western blot analizi.....	74
4.3.4. p-STAT3 proteinine ait western blot analizi	76
4.3.5. Hepsidin proteinine ait western blot analizi	78
4.4. İmmünohistokimya Analizi.....	79
4.4.1. IL-6'nin immünohistokimya analizi.....	80
4.4.2. IL-1 α 'nın immünohistokimya analizi.....	81
4.4.3. p-JAK1'in immünohistokimya analizi	82
4.4.4. p-JAK2'nin immünohistokimya analizi	83
4.4.5. p-STAT3'ün immünohistokimya analizi.....	84
4.4.6. TİP60'ın immünohistokimya analizi.....	85
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	87
KAYNAKLAR	92
ÖZGEÇMİŞ	99

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

%	Yüzde
°C	Santigrat Derece
bç	Baz Çifti
dk	Dakika
g	Gram
kDa	Kilodalton
L	Litre
M	Molar
mg	Miligram
mg/L	Miligram/Litre
mL	Mililitre
mM	Milimolar
ng	Nanogram
Tm	Erime Sıcaklığı
UV	Ultra Viole
µg/mL	Mikrogram/Mililitre

Kısaltmalar

EDTA	Etilendiamintetraasetik Asit
HAMP	Hepsidin Antimikrobiyal Peptid
HAT	Histon Asetil Transferaz
HDAC	Histon Deasetilaz
IL-1	İnterlökin 1
IL-6	İnterlökin 6
IL-6R	IL-6 Reseptörü

JAK1	Janus Kinaz 1
JAK2	Janus Kinaz 2
LPS	Lipopolisakkarit
MOPS	Morfolino Propan Sülfonik Asit
p-JAK1	Fosforile Janus Kinaz 1
p-JAK2	Fosforile Janus Kinaz 2
p-STAT3	Fosforile Sinyal İleticisi ve Transkripsiyon Aktivatörü 3
SH2	Src Homoloji 3
STAT3	Sinyal İleticisi ve Transkripsiyon Aktivatörü 3
TİP60	Tat İnteraktif Protein-60 kDa
TNF- α	Tümör Nekrozis Faktör Alfa
TRIS	Tri Hidroksi Metil Amino Grup Metan

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. STAT3'ün inflamasyon ve kanser ile ilişkisi	8
Şekil 1.2. Janus kinaz (JAK)'ların primer yapısı	10
Şekil 1.3. IL-6 tarafından aktive edilmiş JAK/STAT yolağı	12
Şekil 1.4. İnsan TİP60 proteininin izoformları ve fonksiyonel bölgeleri	16
Şekil 1.5. TİP60 proteininin çift zincir kırılmasına (DSB) yönelik etkinliği	18
Şekil 1.6. Tip60 ile ilişkisi kurulan ve ilişkili olabileceği varsayılan genler.....	19
Şekil 3.1. Atatürk Üniversitesi Hayvan Deneyleeri Yerel Etik Kurulu (AÜHADYEK) tarafından onaylanan etik kurul raporu	32
Şekil 3.2. Tamoksifen tarafından indüklenen SACre recombinazın Tip60 genini karaciğere spesifik olarak silme etkinliğinin gösterilmesi	34
Şekil 3.3. Primer ve prob dizayn etmede kullanılan NCBI ana sayfası.....	39
Şekil 3.4. Primer prob dizayn etmek için kullanılan NCBI organizma seçim sayfası....	39
Şekil 3.5. İlgili genin temel özelliklerini gösteren NCBI sayfası	40
Şekil 3.6. İlgili genin gen ve protein sekansını gösteren NCBI veritabanı.....	40
Şekil 3.7. Aranılan genin sekansının bulunduğu internet veri tabanını	40
Şekil 3.8. <i>Il-6</i> genine ait kodlanan ve kodlanmayan bölgeleri gösteren veritabanı	41
Şekil 3.9. Primer ve prob dizaynında kullanılan veri tabanı.....	42
Şekil 3.10. Primere ait bilgilerin girildiği sayfa.....	43
Şekil 3.11. Proba ait bilgilerin girildiği sayfa	43
Şekil 3.12. Genin primer ve probuna ait bilgilerin bulunduğu sayfa.....	44
Şekil 3.13. Gen sekansının homolojisinin kontrol edildiği organizmaya özgü blast sayfası	45
Şekil 3.14. Dizayn edilen primer ve problemlerin homolojilerinin kontrol edildiği blastlama sayfası	45
Şekil 3.15. Dizayn edilen primer ve problemlerin kontrol edildiği blastlama sayfası (alt kısım) Primer ve problemlerin blastlanması sonucunda ortaya çıkan ve ilgili primer ve problemlerle homolojisi olan genler.....	45
Şekil 3.16. Real-Time PCR programında kullanılan sıcaklık döngüsü	47
Şekil 3.17. Western blot tekniğinin şematik ifadesi	54

Şekil 4.1. İnflamasyon ve kontrol grubu fare karaciğer dokularından izole edilen RNA'ların agaroz jel elektroforez görüntüsü	59
Şekil 4.2. Tip60 mutant ve kontrol grubu fare karaciğer dokularından izole edilen RNA'ların agaroz jel elektroforez görüntüsü	60
Şekil 4.3. Kontrol grupları, LPS muamele ve Tip60 mutant fare karaciğerinde <i>Il-6</i> geninin ekspresyon seviyesinin Real Time PCR ile belirlenmesi	62
Şekil 4.4. LPS ve mutant grubu fare karaciğerinde <i>Il-6</i> geninin mRNA ekspresyonlarının LPS ve mutanta bağlı olarak karşılaştırılması	63
Şekil 4.5. Kontrol grupları, LPS muamele ve Tip60 mutant fare karaciğerinde <i>Il-1α</i> geninin ekspresyon seviyesinin Real Time PCR ile belirlenmesi	63
Şekil 4.6. LPS ve mutant grubu fare karaciğerinde <i>Il-1α</i> geninin mRNA ekspresyonlarının LPS ve mutanta bağlı olarak karşılaştırılması	64
Şekil 4.7. Kontrol grupları, LPS muamele ve Tip60 mutant fare karaciğerinde <i>Jak1</i> geninin ekspresyon seviyesinin Real Time PCR ile belirlenmesi	64
Şekil 4.8. LPS ve mutant grubu fare karaciğerinde <i>Jak1</i> geninin mRNA ekspresyonlarının LPS ve mutanta bağlı olarak karşılaştırılması	65
Şekil 4.9. Kontrol grupları, LPS muamele ve Tip60 mutant fare karaciğerinde <i>Jak2</i> geninin ekspresyon seviyesinin Real Time PCR ile belirlenmesi	65
Şekil 4.10. LPS ve mutant grubu fare karaciğerinde <i>Jak2</i> geninin mRNA ekspresyonlarının LPS ve mutanta bağlı olarak karşılaştırılması.....	66
Şekil 4.11. Kontrol grupları, LPS muamele ve Tip60 mutant fare karaciğerinde <i>Stat3</i> geninin ekspresyon seviyesinin Real Time PCR ile belirlenmesi.....	67
Şekil 4.12. LPS ve mutant grubu fare karaciğerinde <i>Stat3</i> geninin mRNA ekspresyonlarının LPS ve mutanta bağlı olarak karşılaştırılması.....	67
Şekil 4.13. Kontrol grupları, LPS muamele ve Tip60 mutant fare karaciğerinde <i>Hamp</i> geninin ekspresyon seviyesinin Real Time PCR ile belirlenmesi	68
Şekil 4.14. LPS ve mutant grubu fare karaciğerinde <i>Hamp</i> geninin mRNA ekspresyonlarının LPS ve mutanta bağlı olarak karşılaştırılması.....	69
Şekil 4.15. Kontrol ve LPS muamele fare karaciğerinde <i>Tip60 (Kat5)</i> geninin ekspresyon seviyesinin Real Time PCR ile belirlenmesi.....	69

Şekil 4.16. Kontrol grupları, LPS muamele ve Tip60 mutant fare karaciğerinde inflamasyon yolağı proteinlerinden IL-6'nın kantitatif ekspresyon analiz sonuçları.....	70
Şekil 4.17. LPS ve mutant grubu fare karaciğerinde IL-6 protein ekspresyonlarının LPS ve mutanta bağlı olarak karşılaştırılması.....	71
Şekil 4.18. Kontrol grupları, LPS muamele ve Tip60 mutant fare karaciğerinde inflamasyon yolağı proteinlerinden IL-1 α 'nın kantitatif ekspresyon analiz sonuçları.....	72
Şekil 4.19. LPS ve mutant grubu fare karaciğerinde IL-1 α protein ekspresyonlarının LPS ve mutanta bağlı olarak karşılaştırılması.....	73
Şekil 4.20. Kontrol grupları, LPS muamele ve Tip60 mutant fare karaciğerinde inflamasyon yolağı proteinlerinden p-JAK1'in kantitatif ekspresyon analiz sonuçları.....	74
Şekil 4.21. LPS ve mutant grubu fare karaciğerinde p-JAK1 protein ekspresyonlarının LPS ve mutanta bağlı olarak karşılaştırılması.....	75
Şekil 4.22. Kontrol grupları, LPS muamele ve Tip60 mutant fare karaciğerinde inflamasyon yolağı proteinlerinden p-STAT3'ün kantitatif ekspresyon analiz sonuçları.....	76
Şekil 4.23. LPS ve mutant grubu fare karaciğerinde p-STAT3 protein ekspresyonlarının LPS ve mutanta bağlı olarak karşılaştırılması.....	77
Şekil 4.24. Kontrol grupları, LPS muamele ve Tip60 mutant fare karaciğerinde inflamasyon yolağı proteinlerinden Hepsidin'in kantitatif ekspresyon analiz sonuçları.....	78
Şekil 4.25. LPS ve mutant grubu fare karaciğerinde Hepsidin protein ekspresyonlarının LPS ve mutanta bağlı olarak karşılaştırılması.....	79
Şekil 4.26. Kontrol ve LPS muamele grubu fare karaciğer dokusundan hazırlanan 5 μ m kalınlığında kesitler ile negatif kontrol olarak yapılan immünohistokimya sonuçları	79
Şekil 4.27. Kontrol ve LPS muamele grubu fare karaciğer dokusundan hazırlanan 5 μ m kalınlığında kesitler ile IL-6 proteini için yapılan immünohistokimya sonuçları	80

Şekil 4.28. Kontrol ve LPS muamele grubu fare karaciğer dokusundan hazırlanan 5 µm kalınlığında kesitler ile IL-1α proteini için yapılan immünohistokimya sonuçları	81
Şekil 4.29. Kontrol ve LPS muamele grubu fare karaciğer dokusundan hazırlanan 5 µm kalınlığında kesitler ile p-JAK1 proteini için yapılan immünohistokimya sonuçları	82
Şekil 4.30. Kontrol ve LPS muamele grubu fare karaciğer dokusundan hazırlanan 5 µm kalınlığında kesitler ile p-JAK2 proteini için yapılan immünohistokimya sonuçları	83
Şekil 4.31. Kontrol ve LPS muamele grubu fare karaciğer dokusundan hazırlanan 5 µm kalınlığında kesitler ile p-STAT3 proteini için yapılan immünohistokimya sonuçları	84
Şekil 4.32. Kontrol ve LPS muamele grubu fare karaciğer dokusundan hazırlanan 5 µm kalınlığında kesitler ile TİP60 proteini için yapılan immünohistokimya sonuçları	85
Şekil 5.1. LPS muamele ve karaciğer spesifik Tip60 mutant fare karaciğerinde JAK/STAT yolağına ait gen ve protein ekspresyonlarının şematik olarak gösterimi.....	90

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Sitokin reseptörlerinin sinyal ileti mekanizmaları.....	9
Çizelge 3.1. Tez kapsamında kullanılan kimyasal maddeler ve kitler.....	25
Çizelge 3.2. Tez kapsamında yapılan çözeltiler ve hazırlanışı	28
Çizelge 3.3. Gen ekspresyon profillerine bakılacak genler için dizayn edilen primer ve propların listesi	46
Çizelge 3.4. Real-Time PCR reaksiyonunda her tüp için kullanılan kimyasal miktarları ve konsantrasyonları	47
Çizelge 3.5. Bradford (Commassie Blue) protein tayinini metodunda uygulanan prosedürü gösteren bir örnek.....	50
Çizelge 3.6. SDS jel elektroforezi için kullanılacak ayırma jeli değerleri.....	52
Çizelge 3.7. SDS jel elektroforezi için kullanılacak yükleme jeli değerleri.....	52
Çizelge 3.8. Western blot çalışması için kullanılacak primer antikora ait bilgiler	55
Çizelge 3.9. Western blot çalışması için kullanılacak sekonder antikora ait bilgiler	55
Çizelge 3.10. İmmünohistokimyada kullanılan antikora ait bilgiler	58
Çizelge 4.1. İnflamasyon ve kontrol grubu fare karaciğer dokularından izole edilen RNA'ların konsantrasyonları ve saflık dereceleri	61
Çizelge 4.2. Tip60 mutant ve kontrol grubu fare karaciğer dokularından izole edilen RNA'ların konsantrasyonları ve saflık dereceleri	61
Çizelge 4.3. İnflamasyon yolağındaki proteinlerin subsellüler lokalizasyonu	85

1. GİRİŞ

1.1. İnflamasyon

Enflamasyon, yangı veya iltihaplanma olarak da adlandırılan inflamasyon, canlı dokunun yabancı etkene veya içsel/dışsal doku hasarına verdiği hücresel, humoral ve damarsal bir seri yanıtıdır (Anonymous 2015). Enfeksiyonlara karşı savunmayı sağlayan hücreler, dokular ve moleküllerin toplamı immün sistem olarak adlandırılırken, bu hücrelerin ve moleküllerin enfeksiyonlara yol açan mikroplara karşı düzenli olarak verdiği tepkiye de immün yanıt denir (Abbas 2007).

İnflamasyonun başlıca sebepleri;

Canlı etkenler: Yangıya sebep olan en önemli etken mikroorganizmalardır. Bakteri, virus, mantar ve protozon bu gruba girer. Bu gibi etkenler sahip oldukları antijenler ve yüzey reseptörleri aracılığıyla nötrofilik kemotaksise neden olurlar ve sonuçta yangı gelişir.

Fiziksel etkenler: Mekanik travmalar (kesici ve delici cisimler, vurma, çarpma vs.) sıcak ve soğuk etkiler, elektrik, ultraviyole ışınlar, iyonize ışınlar, çeşitli yabancı cisimler (kıymık, tel vb.) yangıya neden olmaktadır.

Kimyasal nedenler: Asitler, alkaliler, dezenfektanlar, ağır metal bileşikleri, organizmada fazlaca oluşan metabolizma ürünleri yangıya neden olmaktadır.

İmmunolojik reaksiyona neden olan maddeler: Yabancı proteinler, hipersensibilite yaratan eksojen ve endojen kaynaklı maddeler transplantasyonda doku ve organ reddine neden olmaktadır. Vücudun başka bir yerinden alınan doku dahi yabancı olarak algılanırarak immün yanıtı tetiklemektedir.

Nekroz: Dokulara gelen kanın azalması veya kesilmesi ile bu bölgenin çevresinde yangısal reaksiyon oluşur ve bu nekrozun yayılmasını önler.

Doku hasarı ve iyileşme: Doku hasarının beraberinde gelişen tüm iyileşmeler birer yangısal prosestir (Anonymus 2015).

Vücutta inflamasyon mekanizması karmaşık birçok biyolojik süreci içerisinde barındırmaktadır. Histamin, serotonin, araşidonik asit metabolitleri, plazma proteazları, sitokinler gibi spesifik kimyasal medyatörler inflamasyon reaksiyonlarının oluşmasında önemli bir role sahiptir (Suleyman *et al.* 2004).

İmmün sistemin fizyolojik işlevi;

- Hasarlayıcı etkeni ve ürünlerini ortadan kaldırmak
- Yabancı etkeni bulunduğu yerde sınırlı tutmak
- Kontrol sağlandıktan sonra, hasarlanmış dokuların tamirini ve yenilenmesini sağlamaktır.

İmmünite, doğal ve edinsel immünite olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Doğal immün yanıt, enfeksiyon sırasında konak savunmasının ilk hattını oluşturur ve erken yanıt oluşturarak patojenlere karşı pro-inflamatör yanıtı indüklemeye önemli bir rol oynar (Medzhitov and Janeway 2000). Edinsel immüt yanıt ise enfeksiyonun geç evresinde patojenleri elimine etmeyi amaçlar (Mogensen 2009).

1.1.1. Doğal immünite

Sağlıklı bireylerde, mikropların girişini engelleyen ve konak dokulara girmeyi başarmış mikropları yok eden konak savunması doğal immünite olarak adlandırılır. Doğal immünitenin mikropların girişini engelleyen ilk savunma hattını epitel, epitelde bulunan özelleşmiş hücreler ile doğal antibiyotikler oluşturur. Mikroplar, epiteli deler ve

dokulara ya da dolaşıma girerlerse fagositler, doğal öldücü (natural killer-NK) hücreler denen özelleşmiş lenfositler ve kompleman sisteminin proteinlerini de içeren bazı plazma proteinleri tarafından saldırıya uğrarlar. Doğal immünitinin bütün bu mekanizmaları, mikropları özgül olarak tanır ve tepki verir, fakat enfeksiyona yol açmayan yabancı maddelere tepki vermezler (Abbas 2007).

Doğal bağışıklığın yapıtaşları, konak hücrede bulunmayan, buna karşın farklı mikroorganizmalar üzerinde ortak olarak bulunan yapıları tanır. Örneğin, fagositik hücreler bakterilerde ortak olarak bulunan lipopolisakkaritlere (LPS) spesifik reseptörler taşırlar (Abbas 2007).

Yangısal yanıtın başlangıcında yer alan hücre tipi olan fagositler, patojenleri içine alarak yok etmeyi amaçlamaktadır. Üstelik bazı fagositler antijen sunucu hücreler (APC) olarak da iş görmektedir ve edinsel immün yanıtı aktifleştiren peptid antijenlerini ortaya çıkarır. Fagositler makrofajları, monositleri, nötrofilleri ve dentritik hücreleri içermektedir, bu hücreler ise doku ve vücut sıvılarında bulunmaktadır. Fagositlerin bir grubu olan nötrofiller, miyeloid kök hücrelerden köken almış hareketli granülositlerdir. Kan ve kemik iliğinde bolca bulunmaktadır, buradan da dokulardaki enfeksiyon bölgesine giderler. Monositler, makrofaj ve dentritik hücrelerin öncül formlarıdır. Monositlerin farklılaşmasıyla oluşan makrofajlar, patojeni yutma ve parçalama yeteneğindedirler aynı zamanda da edinsel immün yanıtı başlatmak için lenfositlerle de etkileşirler. Monositlerin farklılaşmasıyla oluşan diğer bir fagosit grubu ise dentritik hücrelerdir. Bu hücreler de lenf ve dalakta bulunan antijen sunan hücrelerdir (Martinko 2006).

1.1.2. Edinsel (adaptif) immünite

Doğal bağışıklık yanıtları enfeksiyonlara karşı erken savunma sağlamanın yanısıra doğal enfeksiyona yol açan maddelere karşı gelişen edinsel immün yanıtları da güçlendirir. Bu nedenle edinsel immün sistemdeki bozukluklar enfeksiyonlara karşı duyarlılığın artmasıyla sonuçlanır (Mogensen 2009). Edinsel immün sistem, lenfosit ve

antikorlardan oluşur. Doğal immün yanıtın mekanizmaları mikrop tiplerini tanıırken, edinsel immüitenin hücreleri yani lenfositler, mikropların ürettiği değişik maddeleri ve enfeksiyona yol açmayan molekülleri de tanıyan reseptörleri taşırlar. Bu maddelere antijen denir. Edinsel immün yanıt, ancak mikroplar ya da onların antijenleri epitelyal bariyerleri aşp, lenfositler tarafından tanındıkları lenfoid organlara taşınması durumunda tetiklenir.

1.1.3. Yangı oluşturan hücreler ve yangının oluşumu

Yangı, doğal veya adaptif immün yanıt sonucu immün sistem hücrelerini indüklemektedir. Enfeksiyonun olduğu yere ulaşan ilk yangıyı başlatan hücre nötrofildir. Fagositik özelliğe sahip bu hücreler, hasarlı bölgeye kemokinler denen kimyasal çekici maddeler ile çekilirler. Aktive olan nötrofiller, kemokinler aracılığıyla makrofajlarında hasarın olduğu yere çekerler. Makrofajlar aktifleştikçe fagositik yetenekleri artarak diğer hücre tiplerini aktive eden bazı sitokinleri salgırlar. Başlıca sitokinler İnterlökin 6 (IL-6), Tümör nekrozis faktör alfa (TNF- α) ve İnterlökin 1 (IL-1)'dir. Bu sitokinler, enfeksiyonun olduğu bölgede kızarıklık, şişme, ağrı ve sıcaklık oluşturur (Martinko 2006). Akut inflamasyon olarak adlandırılan bu durum hızlı başlar ve kısa sürer. Nötrofil ve makrofajlar tarafından patojenler parçalandıktan sonra sitokin üretimi azalır ve yangı sonlanır (Anonymous 2016a; Anonymous 2016b).

Akut inflamatör yanıt da bazı bozuklukların olması durumunda yerini kronik inflamasyona bırakabilir. İyi adapte olmuş bir patojen hayatını sürdürebilmesi için gerekeni alarak ve sadece minimum bir hasara neden olarak konukçusu ile dengede yaşar. Konukçu ve patojen arasında bir denge bulunduğunda her ikisi de yaşamını devam ettirir. Böyle patojenler konukçuda kronik inflamasyonun oluşmasını tetikler. Kronik inflamasyon, uzun süreli bir enfeksiyona, kan damarlarında proliferasyona, histolojik olarak, lenfosit ve makrofajların birikimine, doku nekrozuna neden olabilir (Coleman *et al.* 1974; Martinko 2006).

1.1.4. İnflamasyonun moleküler mekanizmaları

İnflamasyonun, birkaç mekanizma ile ilişkili olduğu bilinmektedir, oksidatif stres ve kanser bunların başında gelmektedir.

İnflamasyon ve oksidatif stres: Aerobik canlılarda hücreye giren oksijenin %95'dan fazlası suya çevrilirken (Nohl *et al.* 2005), geriye kalan miktarı ise indirgenmeyip elektron sızıntısı sebebiyle serbest radikal olarak bilinen Reaktif Oksijen Türleri (ROS)'ne dönüştürülür (Burton and Eric Jauniaux 2011). ATP ve ROS üretiminde oksijenin kullanılması, canlılar için oksijenin önemini artırmıştır (Nohl *et al.* 2005). Aerobik organizmalarda serbest radikal oluşumunu kontrol altında tutmak ve bu moleküllerin zararlı etkilerine engel olmak üzere antioksidan savunma sistemleri gelişmiştir. Ancak bazı durumlarda mevcut antioksidan savunma sistemi serbest radikallerin etkisini tamamen önleyemez ve oksidatif stres olarak adlandırılan durum ortaya çıkar. Özellikle de mitokondride antioksidan hareketi, oksidatif stres ve inflamasyonla mücadele etmede faydalı olmaktadır (Galley 2011).

Antioksidan enzimler, zararsız yan ürünleri metabolize ederken, toksik reaktantlara karşı savunma mekanizması oluşturur (Rodriguez *et al.* 2004). Örneğin; Glutasyon (GSH), zararlı bileşiklerin etkisizleştirilmesinde önemli rollere sahiptir. GSH radikal kaynaklı hasara karşı koyarken antioksidan enzimlere substrat olarak görev yapar ve bir radikal tutucusu gibi davranır. Süperoksit dismutaz (SOD), mitokondriyel matrikste bulunmaktadır. Elektron transfer reaksiyon ürünü süper oksit (O_2^-) iken hidrojen peroksit (H_2O_2), SOD'ın varlığında O_2^- 'nin dismutasyonundan oluşur (Sousa 2012). Glutayton S Transferaz (GST), GSH'ı substrat olarak kullanarak hücrelerden ROS'un detoksifikasyonunu katalizler. Glutasyon peroksidaz (GPX), hem sitozol hem de mitokondride bulunmaktadır. GPx, substrat olarak GSH'ı kullanarak H_2O_2 'nin H_2O 'ya indirgenmesini sağlar (Budak *et al.* 2014). H_2O_2 'yi metabolize eden ve peroksizomlarda bulunan ikinci enzim katalaz (CAT)'dır (Mates 2000). Glutasyon reduktaz (GSR), oksitlenmiş glutasyonu (Glutasyon disülfid, GSSG) indirgenmiş glutatona (GSH) dönüştürmek için sitozolde bulunan G6PD ve 6PGD'nin enzimatik reaksiyonuyla

pentoz-fosfat yolu tarafından üretilen NADPH'ı kullanır (Meldrum and Tarr 1935; Maliken *et al.* 2011). GSH daha sonra H_2O_2 'yi H_2O 'ya indirgemek için GPX tarafından tekrar GSSG 'ye dönüştürülür. Böylece glutasyon mekanizması doğrudan GSR ve GPX tarafından sürdürülür (Meldrum and Tarr 1935). Böylelikle hücrede olması gereken GSH/GSSG oranı bu iki enzim tarafından dengelenirken hücrede oluşması muhtemel olan oksidatif stres, hidrojen peroksitin suya indirgenmesiyle engellenmiş olur. Her ne kadar hücrede GSH/GSSG dengesi olsa da sağlıklı bir hücrede dolayısıyla organizmada bu oranlar 1:1 miktarlarında olmayıp öncelikli olarak GSH lehinedir. Oranın GSH lehine olması GSH glutasyonun indirgenmiş formu olduğu için zararlı olmaması, ayrıca oksidatif stresi engellemek adına hidrojen peroksit birikmesine karşı onu suya indirgemek için hücrenin daimi olarak tetikte beklemesinden kaynaklanır. Bu sebeple hücredeki glutasyon miktarı önemli olup hücredeki standart glutasyon miktarı (2-10mM)'ndaki değişim hücrenin oksidatif stres durumunda olduğunun bir göstergesidir. GSH/GSSG oranı GSR, GPx ve GST (Glutasyon S Transferaz)'yi içeren antioksidan enzimler tarafından düzenlenir. Bu sebeple hücrenin oksidatif stres durumunun ölçülmesi için yapılan çalışmalarda glutasyon tayini yapılır.

Fizyolojik şartlar altında ROS üretimi, hücresel birçok reaksiyonda olsa da UV, iyonlaştırıcı ışınlar, kimyasal ilaçlar (Circu and Aw 2010), inflamasyon, karaciğerde metal birikimi, yaşlanma, yüksek oksijen (O_2) ve ozon (O_3) basıncı, azot dioksit ($NO_2\cdot$), aşırı beslenmeye bağlı obezite ve stres gibi dış etkiler, hücresel ROS seviyesinin artışına neden olur (Valko *et al.* 2004). Artan ROS miktarı antioksidan sistem tarafından söndürülemediği takdirde bu moleküller lipid, protein ve DNA gibi hücre bileşenlerine zarar verir. Sağlıklı bir hücrede bulunması gereken ROS miktarı, hücrenin yaşlanarak fonksiyonunu yitirmesi, morfolojik olarak türe özgü fenotipin kazanılması ya da geri dönüşümsüz olarak zarar gören hücrenin öldürülmesi gibi, oluşum amacına yönelik olarak gerçekleşen her türlü apoptotik yolun indüklenmesinde ve ilerletilmesinde büyük role sahiptir (Circu and Aw 2012). Fizyolojik olarak düşük seviyedeki ROS, ikincil bir redoks mesajcısı olarak hücre içi sinyal ve düzenleme fonksiyonunu üstlenirken (Valko *et al.* 2007), toksik seviyedeki ROS miktarı ile oluşan tamir edilmesi mümkün olmayan hücresel hasar apoptotik indüklenmeyi başlatır.

İnflamasyon ve kanser: İnflamatör cevap konağa faydalıdır, fakat doku homeostazisi kronik olarak bozulduğu zaman doğal ve adaptif immünite arasındaki ilişkide bozulabilir. Bozulan bu ilişki sonucu, kronik inflamator felaketler meydana gelebilir. İmmün sistemde meydana gelen hasar, aşırı hücre büyümesi, apoptozis/nekrozis, oksidatif stres ilişkili protein ve DNA değışiklikleri dokunun yapısının değışmesine yol açabilir. Bazı şartlar altında bu etkiler kanser gelişim riskinin artmasına neden olur (Budhu and Wang 2006).

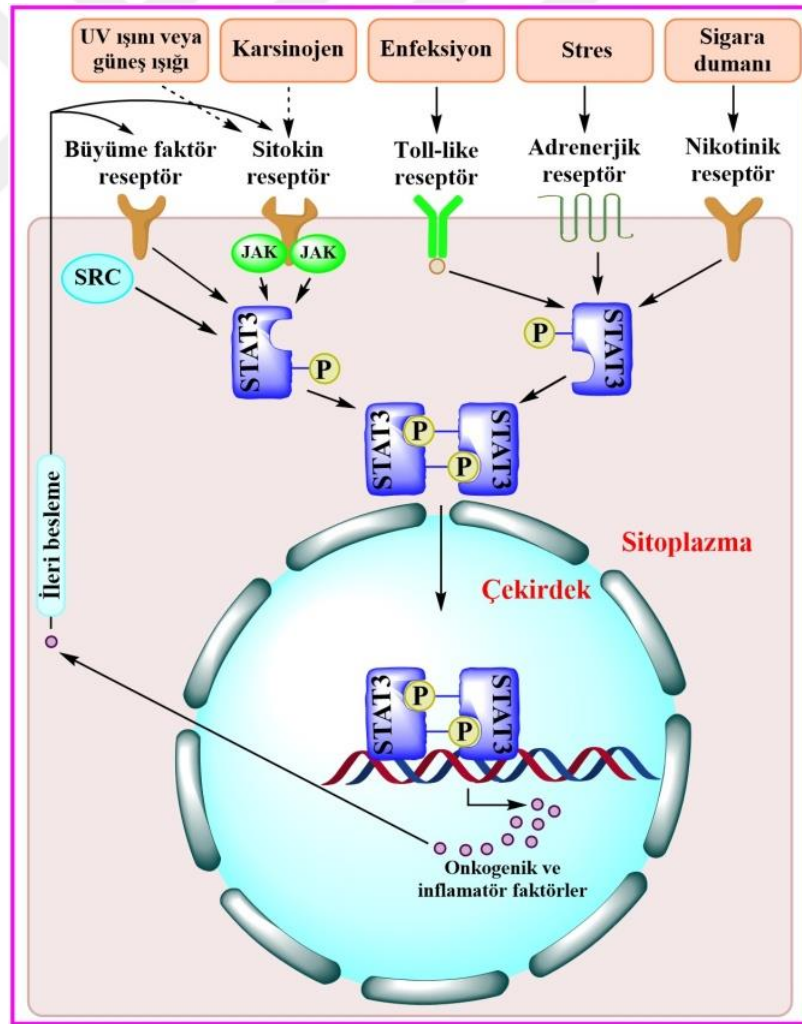
Yabancı patojene yanıtta rol alan immün sistem elemanlarından biri, immün hücrelerin büyüme, farklılaşma ve aktivasyonunu regüle eden membran bağlanma proteinleri veya sitokinlerdir. Sitokinler, enfeksiyon ve karsinogen indüklenmiş hasarı içeren farklı tipteki hücresel strese karşı cevapta salınmaktadır. Üstelik strese karşı konağın yanıtı, kanser oluşumu ve sürecini birkaç durumda etkileyen sitokin ekspresyonlarında değışikliklere neden olur (Budhu and Wang 2006).

Karaciğer hücresi olan hepatositler, IL-1, TNF- α ve IL-6 gibi çeşitli sitokin reseptörlerini taşırlar. Sirkozis, fibrozis ve kanser gibi karaciğer ilişkili hastalıkların patogenezine sitokinlerin de katkısı vardır (Budhu and Wang 2006). IL-6, kanserli hücrede en düzensiz sitokinlerden biridir (Scambia *et al.* 1995; Bellone *et al.* 2005). IL-6, gelişim, hücre göçü, invazyon, malignansinin gelişimi, proliferasyon, apoptozis, progresyon, anjiyogenez ve tümör hücre farklılaşmasında rol oynar (Santer *et al.* 2010; Guo *et al.* 2012). Örneğın, IL-6 kanser hücrelerinin apoptoza gitmesini inhibe ederek ve tümör anjiyogenezisini başlatarak tümörün büyümesini sağlar (Guo *et al.* 2012).

İnflamatör medyatörlerin büyük bir dizinini ve farklı immün cevaplarda çekirdek transkripsiyon faktörlerinin ekspresyonunu indükleyen nükleer faktör- κ B (NF- κ B) sinyali hem inflamasyon indüklenmiş karsinogenezis hem de anti-tümör immünitede sorumlu olan büyük bir yolaktır (Karin and Greten 2005). NF- κ B hedef genleri tarafından kodlanan IL-6'nın ekspresyonuyla aktive olan STAT3 hem malignant transformasyonun başlamasını hem de kanser süreci boyunca pro-karsinojenik olan inflamator mikro-çevrenin indüklenmesi ve sürdürülmesinde önemli bir rol oynar

(Mantovani *et al.* 2008). Tümör oluşumu, malignant hücrelerde genetik değişiklikler sonucu başlatılan inflamasyon ilişkili olduğu kadar kimyasal karsinojenler, güneş ışığı, enfeksiyon, sigara dumanı ve stresi de içeren birçok çevresel faktör tarafından da uyarılabilir (Şekil 1.1) (Ernst *et al.* 2008; Yu *et al.* 2009).

NF- κ B ve STAT3 arasında bir paralellik vardır ve her iki protein de hem kanserde aktive edilir hem de hücre dışı uyarılara sitoplazmik sinyalleri iletir. İlâveten, tümör oluşumu, invazyon ve anjiyogenezinde dahil olduğu gen regülasyonu için gerekli olan çekirdek transkripsiyon faktörleri olarak fonksiyon gösterirler (Karin and Greten 2005; Yu *et al.* 2007).



Şekil 1.1. STAT3'ün inflamasyon ve kanser ile ilişkisi (Yu *et al.* 2009)

Çizelge 1.1. Sitokin reseptörlerinin sinyal ileti mekanizmaları (Anonymous 2016c)

Sinyal İleti Yolağı	Sinyalleme Mekanizması
1. JAK/STAT Yolağı	JAK-aracılı fosforilasyon ve STAT transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonu
2. TRAF'lar tarafından TNF reseptör sinyallenmesi	Adaptör proteinlerin bağlanması, transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonu
3. Ölü bölgeler (TRADD) tarafından TNF reseptör sinyallenmesi	Adaptör proteinlerin bağlanması, kaspas aktivasyonu
4. Reseptör ile ilişkili tirozin kinazlar	Reseptörlerde intrinsik tirozin kinaz aktivitesi

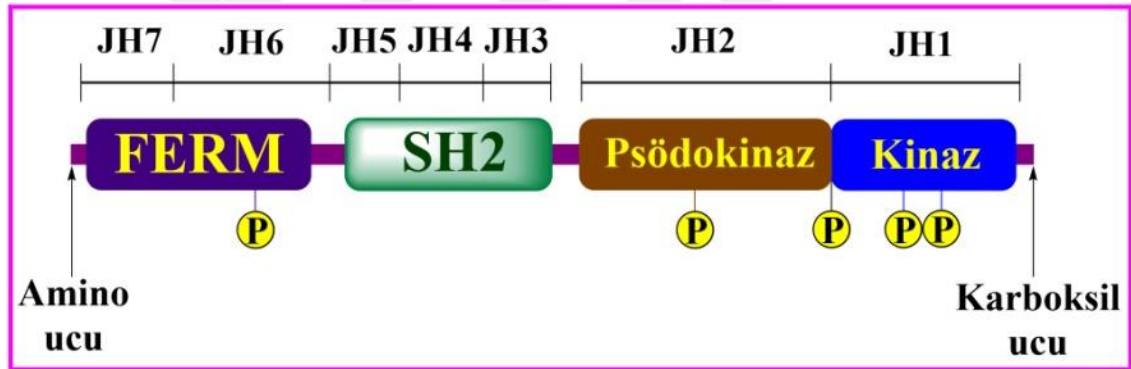
1.1.5. JAK/STAT yolağı

İnterlökin 6 (IL-6), çeşitli hücreler üzerinde hareket eden pleiotropik (çok yönlü) bir sitokindir. Endotoksemi, travma ve akut enfeksiyonu içeren homeostazinin bozulduğu hemen hemen tüm durumlarda salınır. Ek olarak, Tümör nekrozis faktör alfa (TNF- α) ve İnterlökin 1 (IL-1) ile birlikte IL-6 sirkülasyonu ateş, kortikosteron salınımı ve çoğunlukla proteaz inhibitörleri olan akut faz proteinlerinin hepatik üretimini içeren akut faz cevabın indüklenmesi için gereklidir. Tüm bunlar düşünüldüğünde, IL-6 tarafından akut faz cevabın üretilmesi ile homeostazinin sürdürülmesine katkı sağlanmaktadır (Xing *et al.* 1998). İnflamasyondaki rolü dışında IL-6, B hücrelerinin, T hücrelerinin, myeloid hücrelerin, nöral hücrelerin ve hepatositlerin farklılaşması ve gelişimini indükler (Streetz *et al.* 2000).

IL-6 reseptör kompleksi, interlökin 6 reseptör (IL-6R veya gp80) olarak adlandırılan glikoprotein bağlama ve sinyal dönüştürücü (gp130)'den oluşur. Gp80'e bağlanan IL-6 kompleksi, iki gp130 molekülünün intraselüler domaininin homodimer oluşumunu tetiklemesiyle hedef hücreler üzerinde etkileşim kurar (Hirano 1998). Gp80'e bağlanan IL-6 membran bağlı gp130 ile etkileşebilir ve böylece intraselüler sinyal yolağının

aktivasyonunu tetikleyebilir. Bu da artan IL-6 aracılı cevaba yol açar (Streetz *et al.* 2000).

IL-6 sitokinleri sinyal transdüksiyonu için Janus kinaz (JAK) ailesinin tirozin kinazlarını kullanır (Lutticken *et al.* 1994; Stahl *et al.* 1994). İki gp130 molekülünün dimerizasyonu ile moleküller arası veya molekül içi fosforilasyon yoluyla aktivasyona sebep olan reseptör bağlantılı JAK'lar (JAK1, JAK2) getirilir ve JAK'lar fosforillenerek aktive olurlar. Gp130'un intraselüler kısmı, aktifleşen JAK kinazlar tarafından fosforillenen farklı tirozin rezidülerini içerir. Fosfotirozinler, birkaç proteinin Src homoloji 2 (SH2) domainiyle etkileşebilir (Şekil 1.2). Bu proteinler JAK kinazlar tarafından fosforillenir (Narazaki *et al.* 1993; Fischer *et al.* 1997).



Şekil 1.2. Janus kinaz (JAK)'ların primer yapısı (Yamaoka *et al.* 2004)

İnsan gp130 molekülünün altı adet tirozini hücre membranında 42, 118, 126, 262 ve 274 pozisyonundadır. Dört tirozinin (tirozin 126, 1733, 262 ve 274) fosforillenmesi STAT (Sinyal ileticisi ve transkripsiyon aktivatörü 3) proteinlerini aktive eder. Fosfotirozin 126 ve 173 spesifik olarak STAT3'ü gerektirir (Streetz *et al.* 2000).

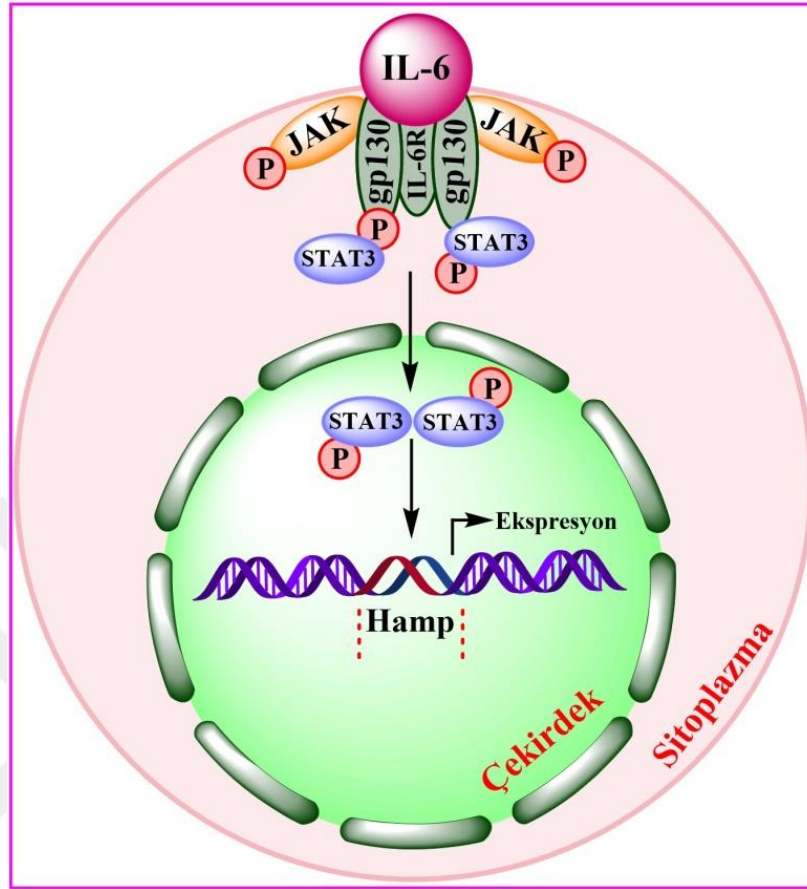
Hücreler çeşitli ekstraselüler polipeptidlerle karşılaştığı zaman STAT'lar gen kontrolünü ele almak için aktive olan sitoplazmik protein ailesidir. STAT aktivitesi tirozin ve serin fosforilasyonlar gibi post-translasyonel modifikasyonlar tarafından regüle edilir. STAT'lar molekül içinde 750-850 amino asit ve farklı domainlerden

oluşur. Biyokimyasal ve moleküler çalışmalar sonucu bir tetramerizasyon domain, bir N-terminal lösin fermuar benzeri domain, ortada bir DNA interaksiyon domain, bir Src homoloji 3 (SH3) benzeri domain, bir SH2 fosfotirozin bağlanma domaini ve C-terminal transaktivasyon domaini tanımlanmıştır. Bu domainler, reseptörlerle, diğer transkripsiyon faktörleriyle ve tirozin fosfataz ile bağlantı kurabilir (Darnell 1997).

Tirozin fosforilasyonundan sonra STAT'lar homo ve heterodimer oluştururlar. Bu interaksiyon STAT'ların SH2 domaininde meydana gelir (Schindler and Darnell 1995). Aktive olan STAT (fosforile STAT, p-STAT) dimerleri çekirdeğe geçerek orada hedef genlerin promotöründe DNA bağlanma domainini tanırlar (Ihle 1996). STAT3, DNA bağlanma bölgesi, hepatositlerde akut faz proteinlerini düzenlemektedir (Trautwein *et al.* 1994; Taga and Kishimoto 1997; Hirano 1998) .

Bir transkripsiyon faktörü olarak rol oynayan STAT3 dimeri (aktive STAT3) çekirdeğe girdikten sonra Hepsidin antimikrobiyal peptid (Hamp)'ın ekspresyonunu düzenlemektedir (Ganz and Nemeth 2015). Çoğunlukla hepatositler tarafından salınan bir peptid hormon olan hepsidin, demir homeostasisi ve inflamasyonda rol oynamaktadır (Park *et al.* 2001; Nemeth *et al.* 2004). Enfeksiyon sırasında makrofajların içine demir depolayan, dokularda demiri uzaklaştıran veya hem ve hemoglobin içeren demiri uzaklaştıran homeostatik mekanizma sitokinler tarafından kontrol edilir (Ganz and Nemeth 2015).

Tüm bu yolağın aktivasyonunda epigenetik mekanizmalarında rolü vardır. JAK/STAT yolağına ait JAK1/2 ve STAT3'ün fosforillenmesi post-translasyonel olarak epigenetik mekanizmalar ile düzenlenmektedir. Bu biyolojik yollar üzerindeki epigenetik mekanizmalar, çoğu proteinlerin protein-protein etkileşimini, enzimatik aktiviteleri ve stabiliteyi, DNA bağlanmaları gibi fonksiyonları etkileyen translasyonel modifikasyonlar sonrası meydana gelmektedir (Polevoda and Sherman 2002).



Şekil 1.3. IL-6 tarafından aktive edilmiş JAK/STAT yolağı (Yang *et al.* 2008)

Sonuç olarak, IL6, IL-6 reseptörüne (IL-6R) bağlanır ve JAK1/2 indüklenmiş STAT3 fosforilasyonu gerçekleştirerek, Hamp geninin promotörüne fosforile STAT3 (p-STAT3)'ün bağlanmasının sinyalini verir (Şekil 1.3) (Nemeth *et al.* 2004; Robson 2004; De Domenico *et al.* 2010).

1.2. Histon Proteinleri

Ökaryotik hücrelerdeki genetik materyalin yapısı, kromozomu oluşturan DNA'nın çok büyük miktarda oluşu ve ökaryotik DNA'nın çok sayıda proteinle ilişkili oluşundan dolayı virüs ve prokaryotik organizmalarla kıyaslandığında karmaşık bir yapıya sahiptir. Bu genetik materyal hücre içerisine çok düzenli bir sıkıştırma ve katlanma ile yerleştirilmektedir (Klug 2003).

Ökaryotik DNA yapılanmasının temel birimi olan nükleozomlar, kromozomlardaki DNA molekülünün histon adı verilen lizin ve arginine zengin bazik karakterdeki proteinlerle oluşturduğu komplekslerdir. Histonlar DNA katlanması ve kromatin oluşumunda görev alan özel bir protein grubudur. Histon proteininin, üç boyutlu şekli ve elektriksel yük dağılımı sayesinde oluşan yapısı, DNA'nın kendi etrafında uygun bir şekilde dönmesini ve bilgi depolamasını sağlar (Stephen 1996).

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 2009).

Histon moleküllerinin çeşitleri arasında farklılıklar vardır;

- H2A ve H2B; lizince zengin,
- H3 and H4; arginine zengin,
- H1; lizin/arginin oranı en yüksek

Yapılan çalışmalarda histon moleküllerinin asetilasyon, metilasyon, fosforilasyon ve ADP-ribozilasyon gibi kovalent modifikasyonlara maruz kaldıkları gösterilmiştir. Bu çalışmaların ışığında DNA yapılanması ve fonksiyonunun düzenlenmesinde transasyon sonrası oluşan histon modifikasyonlarının etkili olduğu anlaşılmıştır (Margueron *et al.* 2005; Keha 2009).

1.3. Epigenetik ve Histon Modifikasyonları

DNA ve histon proteinlerinden meydana gelmiş olan nükleozomlar kromatin olarak organize edilirler. Kromatin yapısında meydana gelen değişiklikler gen ifadesini kontrol etmektedir; kromatin yapı sıkılaşır yoğunlaştığında genler inaktive olurken, kromatin yapısı gevşeyerek açıldığında ise genler aktive olmaktadır. Kromatin yapısındaki bu

durum ise, DNA metilasyonu ya da histon modifikasyonları ile sağlanan epigenetik olaylarla gerçekleştirilir (Orcan 2006).

Epigenetik, DNA dizisinden ayrı olarak gen ifadesinde meydana gelen kalıtsal değişikliklerdir. Gen ifadesinin düzenlenmesinde iki mekanizma mevcuttur. Bu mekanizmaların ilki, transkripsiyonun aktivasyonu ve baskılanmasının düzenlenmesinde, ikincisi ise DNA ile kromatinde meydana gelen modifikasyonlardır (Pehlivan 2008).

Kromatin, farklı iki işlem ile şekil değiştirmektedir. İlk işlem ATP hidrolizi ile katalizlenen şekillenme kompleksidir ve SWI/SNF olarak adlandırılır. İlk olarak mayada, 11 alt birimli bir kompleks olarak tanımlanmıştır ve daha sonra yaygın olarak diğer ökaryotlarda da görülmüştür. Yeniden şekillendirme kompleksi, transkripsiyon faktörlerinin yardımıyla özgül gen bölgesine yönlendirilir. Diğer bir kromatin yapısını değiştirme işlemi ise birçok histon asetil transferaz (HAT) enzimlerinden biri tarafından katalizlenen histon modifikasyonudur (Klug 2003).

Histon asetil transferaz (HAT) ve histon deasetilaz (HDAC) enzim aileleri tarafından düzenlenen histonların asetilasyonu, negatif yüklü asetil grubunun histon proteininin amino ucuna takılmasıyla pozitif yüklü lizin aminoasiti, yükünü kısmen kaybedip kromatinde gevşeme meydana getirmekte ve bu gevşeme ile transkripsiyon faktörlerinin genlerin promotor bölgelerine ulaşmaları kolaylaşmakta ve transkripsiyon gerçekleşmektedir. Asetilasyon geri dönüşümlü olarak gerçekleşen bir olaydır. Lizin aminoasitinden asetil grubunun çıkartılmasıyla kromatin tekrar kondense olur ve transkripsiyon baskılanır. Kromatinin belli bir bölgesinde histonların asetile olması, o bölgenin transkripsiyonel açıdan aktif olduğunu gösterirken, asetil grubunun uzaklaştırılması transkripsiyonun baskılandığını göstermektedir (Grant 2001). Ökaryotik proteinlerin çoğunun N-terminal asetilasyonu, translasyon esnasında meydana gelirken, lizin asetilasyonu ise translasyonel modifikasyonlar sonrası meydana gelir. Bu modifikasyonlar, çoğu proteinlerin protein-protein etkileşimini, enzimatik

aktiviteleri ve stabiliteyi, DNA bağlanmaları gibi fonksiyonları etkiler (Polevoda and Sherman 2002).

1.4. TİP60 (HIV-1 Tat İnteraktif Protein)

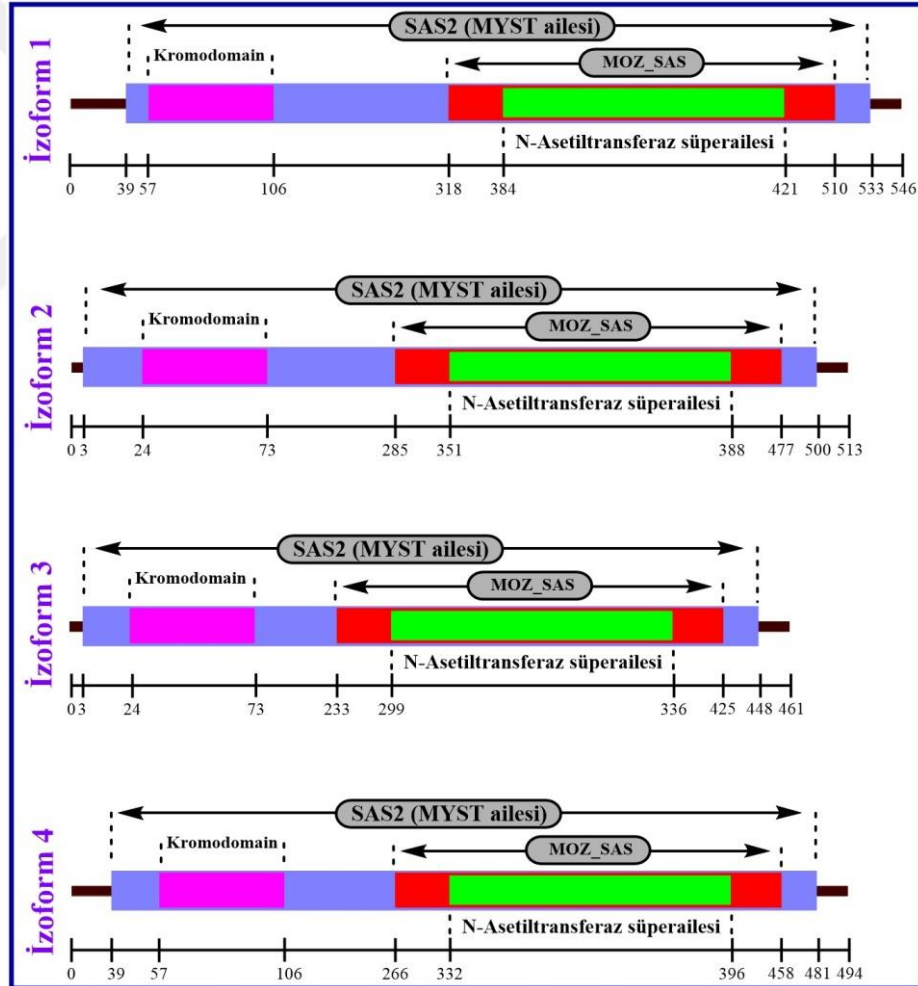
Tat interactive protein-60 kDa (TİP60), MYST (MOZ,YBF2/SAS3, SAS2 ve TİP60) enzim ailesinin bir üyesidir (Sterner and Berger 2000) ve ilk olarak HIV (Human immunodeficiency virüs-1) Tat interaktif proteini olarak karakterize edilmiştir (Kamine *et al.* 1996). Yaklaşık olarak 12 MYST, mayalardan insanlara kadar çeşitli türlerde keşfedilmiştir. TİP60'ı da içeren çoğu MYST, chromo-zinc finger, lösince zengin ve histon asetil transferaz (HAT) domainlerini içerir (Gaughan *et al.* 2001).

Tip60'ın transkripsiyonel düzenlemedeki rolü araştırılmış olup elde edilen bulgular neticesinde Tip60'ın birbirinden farklı birçok süreçte önemli rollere sahip olduğu belirlenmiştir. Bunlar arasında hücresel sinyal, DNA hasar tamiri, biyolojik saat, hücre döngüsü ve apoptosis bulunmaktadır. Tip60, androjen reseptör, Myc, STAT3, NF-κB, E2F1 ve p53'ü de içine alan bir dizi transkripsiyon faktörünün dahil olduğu multiprotein kompleksindeki rolünden dolayı transkripsiyonel bir koregülatör olarak düzenlendiği belirlenmiştir. Ayrıca DNA'da meydana gelen çift zincir kırılmasına verilen hücresel cevapta DNA lezyonlarında ve tamir basamağında görev yapar (Gaughan *et al.* 2002; Sapountzi *et al.* 2006; Budak 2009).

TİP60, ya içsel HAT aktivitesi yardımıyla gen ekspresyonunu aktive ederek (Gaughan *et al.* 2001; Bararia *et al.* 2008) ya histon deasetilaz ile bir korepresör olarak hareket ederek (Xiao *et al.* 2003) ya da bir transkripsiyonel baskılayıcı olan zinc finger E Box-binding proteini (ZEB) ile etkileşimleri sayesinde (Gavaravarapu and Kamine 2000) transkripsiyon faktörlerinin büyük bir çoğunluğuyla etkileşmektedir.

İnsanda kromozomun 11q13.1 bölgesine yerleşmiş olan Tip60, 14 ekzon bölgesi içerir ve insanda dört farklı izoformunun olduğu belirlenmiştir. Bunlar Tip60 izoform 1, Tip60 izoform 2 (Tip60α) ve Tip60 izoform 3 (Tipβ) ve Tip60 izoform X4'tür ve en iyi

karakterize edilen ikinci izoformu olan Tip60 α 'dır (Burton and Jauniaux 2011). Tip60 izoformları arasında 546 amino asite sahip olan izoform 1'dir. İzoform 2 (Tip60 α) 513 amino asite, Tip60 izoform 3 (Tip60 β) 461 amino asite, izoform X4 ise 5'ucunda bir ekzon bölgesinden yoksun olan 494 amino asite sahip bir proteindir. Ayrıca Tip60, 4 tane korunmuş domain içerir. Bunlar bir substrata açıl grubu transferini gerçekleştiren N-asetiltransferaz süper ailesi (NAT_SF) olarak bilinen, kromatin yapısını ve dinamiklerini ihtiva eden MYST ailesi (SAS2), kromatin organizasyon düzenleyici olarak bilinen kromo bölgesi ve asetiltransferaz homologu olduğu öne sürülen MOZ/SAS ailesidir (Lee *et al.* 2013).

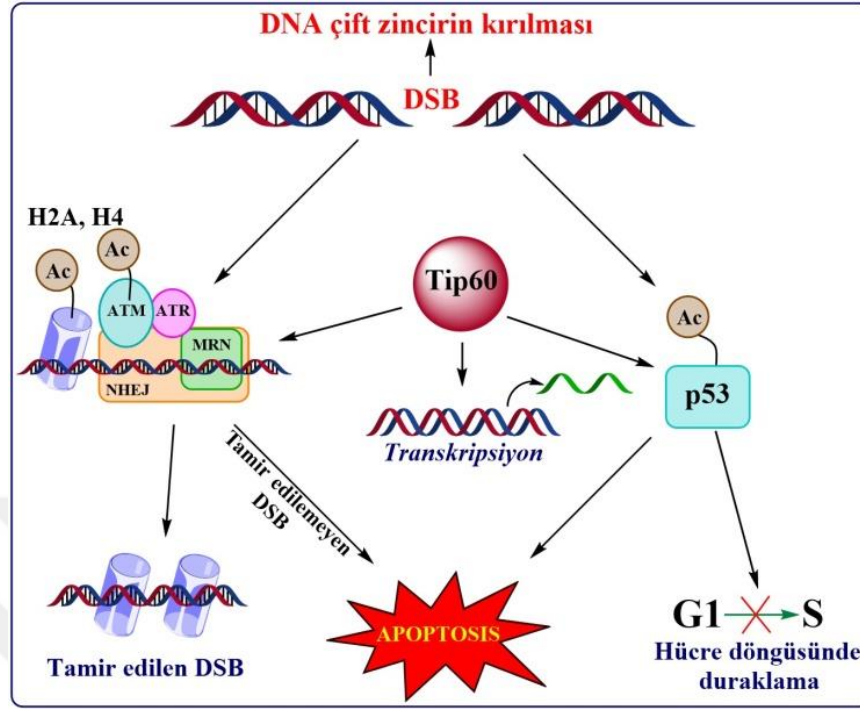


Şekil 1.4. İnsan TİP60 proteininin izoformları ve fonksiyonel bölgeleri (Lee *et al.* 2013)

Stabil bir nükleer multiprotein kompleksi olan Tip60, 18 alt üniteden oluşup, epigenetik düzenlemelerde etkin olan histon asetilasyonlarının da (Gong and Miller 2013) dahil olduğu kendisi ile ilgili pek çok transkripsiyonel yolda etkilidir (Ikura *et al.* 2000). Asetil transferazların önemli bir alt kümesi olan MYST enzim ailesi, epigenetik modifikasyonlarda büyük öneme sahiptir (Gong and Miller 2013). Gen düzenlenmesi, DNA hasar tamiri ve tümörögenesis, MYST enzim ailesinin önemli görevleri arasında sayılmaktadır (Utley and Cote 2003). Tip60 hakkında daha önce yapılan çalışmalar ve HAT aktivitesi, onun bir epigenetik düzenlenme olarak bilinen post-translasyonel modifikasyonlarda önemli yere sahip olduğunu göstermektedir (Gaughan *et al.* 2002; Sapountzi *et al.* 2006).

1.5. TİP60 ve Apoptozis Mekanizması

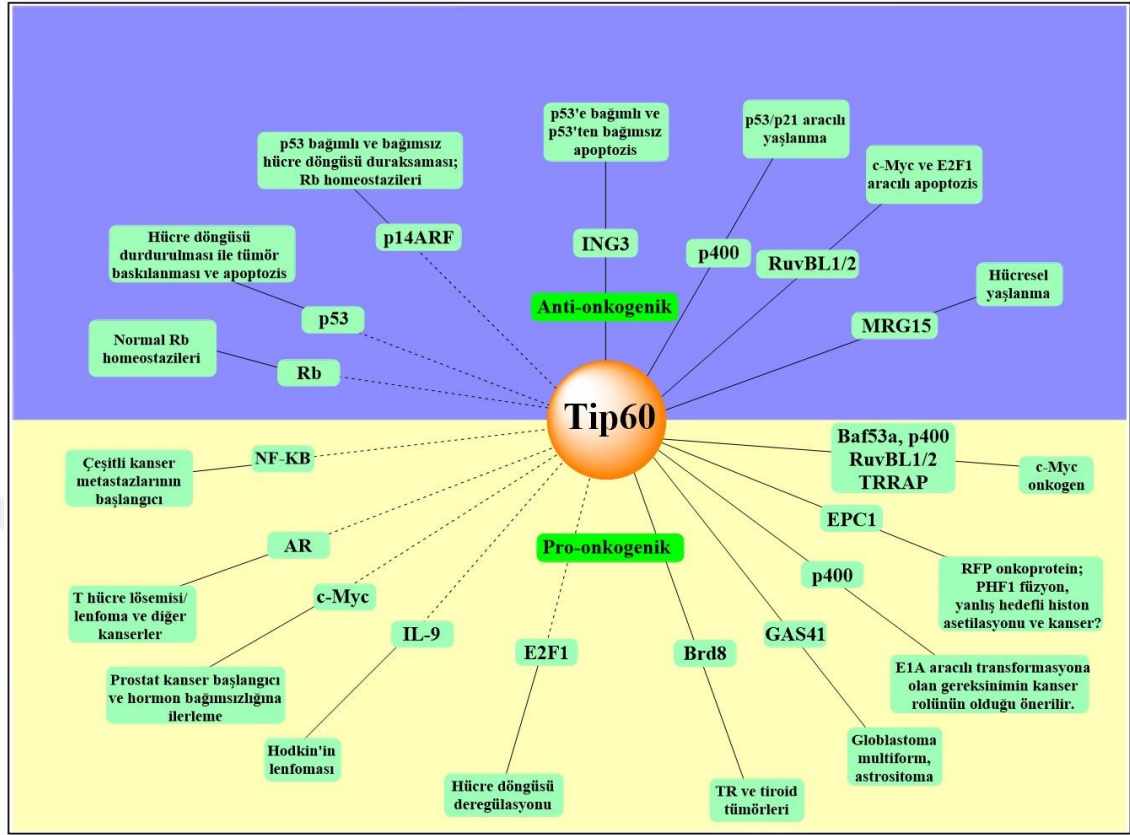
Stres durumunda TİP60, apoptotik mekanizmaları başlatmaktadır. TİP60'ın asetiltransferaz aktivitesi DNA hasarı ve apoptozisin indüklenmesi için gereklidir. TİP60'ın bu mekanizması p53'e bağımlı olarak gerçekleşmektedir (Ikura *et al.* 2000). p53, hasarlı DNA'yı tamamen elemine etmek amacıyla ya hasarın tamir edilmesi için hücreyi G1 fazında durdurur ya da apoptozis yolağını aktive eder (Michael and Oren 2002; Vousden and Lu 2002). p53'ün ekspresyonu strese girmeyen hücrelerde düşük seviyededir (Tang *et al.* 2006). HAT aktivitesine sahip olan Tip60, epigenetik modifikasyonlar ile upstream bağlanma transkripsiyon faktörlerini (UBF), miyelositotik onkogen c (c-Myc) ve androjen reseptörleri (AR) gibi transkripsiyon faktörlerini de asetilleyebildiği için birçok genin ifade edilmesinde de rol oynamaktadır (Gaughan *et al.* 2002). Tip60 kompleksi ayrıca tümör giderici p53 yolunun bir bileşeni olan pro-apoptotik protein ING3'ü ihtiva eder (Doyon and Cote 2004).



Şekil 1.5. TİP60 proteininin çift zincir kırılmasına (DSB) yönelik etkinliği (Kocpinar 2015)

Transkripsiyon faktörlerinin Myc ailesi apoptosize ilaveten büyüme ve DNA replikasyonu için gerekli genleri regüle ederek G1/S işleyişinde doğrudan görev alır (Sapountzi *et al.* 2006). TİP60, Myc transkripsiyon faktörleri için kofaktör olarak rol oynar, yani c-Myc'yi doğrudan asetilleyebilir ve stabilize edebilir (Patel *et al.* 2004). Buna ek olarak, TİP60, Myc promotörüne bağlanabilir ve Myc'nin transaktivasyonunu artırabilir (Frank *et al.* 2003). Viral proteinler, TİP60 kompleksi ile bağlantısı aracılığıyla kısmen c-Myc fonksiyonunu regüle etmek için TİP60 koaktivasyonunu kullanır (Lang and Hearing 2003).

Rel ailesinin (Rel-A/p65, REL-B, c-Rel, p50 ve p52) üyesi olan homodimerik veya heterodimerik transkripsiyon faktörü NF- κ B, immünite, proliferasyon ve apoptosiz süreçlerini kontrol eder. TİP60 farklı mekanizmalar yoluyla NF- κ B tarafından regüle edilen genlerin koregülatörü olarak hareket eder (Sapountzi *et al.* 2006).



Şekil 1.6. Tip60 ile ilişkisi kurulan ve ilişkili olabileceği varsayılan genler

*Mavi bölge anti-onkogenik faaliyetleri, sarı bölge potansiyel pro-onkogenik bağlantıları temsil etmektedir. Düz çizgiler Tip60'ın NuA4 kompleksinin alt birimleri ile, kesikli çizgiler ise hücrenin diğer proteinleri ile olan fiziksel ve fonksiyonel bağlantılarını göstermektedir (Avvakumov and Cote 2007)

2. KAYNAK ÖZETLERİ

İnflamasyon UV, kimyasal ajanlar, iyonize radyasyon gibi eksojen ve endojen kaynaklı etkenlere bağı olarak artan ROS miktarı, DNA ve DNA aracılı proteinlere ve hücre bileşenlerine hasar vererek apoptotik temelli pek çok hastalığın oluşmasında etkindir (Kocpinar 2015).

Mohamadin *et al.* (2011) tarafından rat karaciğerinde yapılan bir araştırmada montelukastın koruyucu rolü araştırılmıştır. LPS ile toksisite ve oksidatif stres oluşturulması sağlandıktan sonra Süperoksit dismutaz (SOD), Katalaz (CAT), Glutasyon peroksidaz (GPX) antioksidan enzim düzeylerinin LPS muamele grubunda kontrol grubuna oranla daha düşük olduğu gözlenmiştir. Kontrol grubuna göre LPS muamele grubu rat karaciğerinde gözlenen bu azalışın LPS aracılığıyla oluşturulan serbest radikallerin ortadan kaldırılması ile enzim aktivitelerinin geri dönüşümsüz inhibisyonundan kaynaklanabileceğini belirtmişlerdir. Yüksek miktarda radikal oluşumunun antioksidan enzimler üzerine baskılayıcı bir etki göstermesi, SOD'un CAT ve GPX için susbtrat üretmesi ve bu üç enzimin birbiriyle olan ilişkileri belirtilmiştir (Mohamadin *et al.* 2011).

Multifonksiyonel sitokin olan IL-6, 1986 yılında klonlanmıştır ve o zamandan beri immün sistemdeki regülatör fonksiyonunun anlaşılması üzerine birçok çalışma yapılmıştır. Karaciğerde, IL-6'nın akut faz cevabını kontrol etmesinin yanısıra hepatosit proliferasyonu ve savunma yollarının aktivasyonuna katkı sağladığı ortaya çıkarılmıştır (Coleman *et al.* 1974; Streetz *et al.* 2000; Martinko 2006).

Dağdelen tarafından (2015) yapılan tez çalışmasında, BALB/c ırkı farelere 2 mg/kg LPS enjekte edilmiş ve böbrek dokusu toplanmıştır. İnflamatör markır olan *Il-6*'nın gen ekspresyonu, Süperoksit dismutaz (SOD), Katalaz (CAT), Glutasyon peroksidaz (GPX), Glutasyon S-transferaz (GST), Glutasyon redüktaz (GR) ve Glukoz 6-fosfat dehidrogenaz (G6PD)'nin gen ekspresyonları ve enzim aktiviteleri incelenmiştir.

İnflamasyon durumunda antioksidan sistemin moleküler ve proteomik seviyede etkilendiği gösterilmiştir (Dağdelen 2015).

Reddy *et al.* (2006), sıçanlarda yaptığı çalışmada intraperitoneal LPS enjeksiyonu sonrasında testiste lipid peroksidasyonunun arttığını ve SOD, CAT, GPX gibi antioksidan enzim aktivitelerinin azaldığını gözlemlemişlerdir (Reddy *et al.* 2006).

Nemeth *et al.* (2004) tarafından yapılan bir çalışmada, insan karaciğer hücre hattında IL-6 ekspresyonunun inflamasyon sırasında arttığını ve hepsidin ekspresyonunun IL-6'ya bağlı olarak indüklendiğini tespit etmişlerdir (Nemeth *et al.* 2004).

Xing ve arkadaşları (1998), IL-6'nın akut inflamatör yanıtta rolünü anlamak amacıyla IL-6 nakavt fareler kullanmışlardır. IL-6^{+/+} ve IL-6^{-/-} fareler endotoksine maruz bırakılarak IL-6 ve TNF- α 'daki meydana gelen değişiklikleri incelemişlerdir. Sonuç olarak, IL-6^{+/+} farelerde endotoksine bağlı olarak IL-6 ve TNF- α ekspresyonları artarken, IL-6^{-/-} farelerde IL-6'da herhangi bir ekspresyon gözlenmezken TNF- α 'nın ise arttığı tespit etmişlerdir (Xing *et al.* 1998).

Hohaus *et al.* (2010), Hodgkin lenfoma (HL)'da esas rolü sitokinlerin oynadığını ve HL'li hastalardan alınan plazma örneklerinde IL-6'nın seviyesinde önemli derecede artış gözlemlemişler ve artan IL-6 ile ilişkili olarak hepsidin plazma seviyesinde önemli derecede indüklendiğini gözlemlemişlerdir (Hohaus *et al.* 2010).

Wrighting *et al.* (2006), in-vitro şartlarda IL-6'nın hepsidin ekspresyonunu nasıl up-regüle ettiğini anlamak amacıyla promotör analizi yapmışlar ve bunun sonucunda IL-6 seviyesindeki artış ile STAT3'ün hepsidin promotörüne bağlanarak gen ekspresyonunu indüklediği sonucuna varmışlardır (Wrighting and Andrews 2006).

Kim *et al.* (2003), anti-inflamatör bir ajan olan kurkuminin JAK/STAT yolu üzerindeki inhibitör etkisinin olup olmadığını belirlemek amacıyla beyin hücre kültüründe araştırma yapmışlardır. LPS ile muamele edilen hücrelerde artan STAT1 ve

STAT3'ün, JAK1 ve JAK2'nin fosforilasyonlarının baskılandığı gözlenmiştir (Kim *et al.* 2003).

Kronik karaciğer inflamasyon ve hepatoselüler karsinoma (HCC) arasındaki ilişkiyi göstermek amacıyla HCC hücre hattında yapılan çalışmada hem IL-6 hem de IL-6 reseptörünün (IL-6R) yüksek seviyelerinin STAT3 aktivasyonu ile koregüle olduğunu gözlemlenmiştir. Anti-kanser etkisi olan Celecoxib, JAK2 fosforilasyonu tarafından indüklenen STAT3 fosforilasyonunu azalttığını ve HCC hücrelerinde apoptoza neden olduğu tespit edilmiştir (Liu *et al.* 2011).

Akyüz (2013) tarafından yapılan tez çalışmasında, karaciğer spesifik Tip60 mutant farelerde farklı zaman birimlerinde (ZT0, ZT4, ZT8, ZT12, ZT16, ZT20) Hepsidin antimikrobiyal peptid (Hamp)'in gen ekspresyonlarındaki değişiklikler araştırılmış ve TİP60 proteininin hepsidin hormonunun ekspresyonunu düzenlediği belirtilmiştir (Akyüz 2013).

TİP60, ilk olarak HIV-1 Tat interaktif protein (HTATIP) olarak izole edilmiştir (Kamine *et al.* 1996). TİP60 histon asetil transferaz (HAT) aktivitesine sahip olmasının yanı sıra hücresel TİP60'ın, ayrıca androjen reseptörleri (AR), upstream bağlanma transkripsiyon faktörlerini (UBF), myelositomatosiz onkogen c (c-Myc) gibi transkripsiyon faktörlerini de asetilediği kanıtlanmıştır (Gaughan *et al.* 2001).

Ikura ve arkadaşları 2000 yılında yapmış oldukları çalışmada, TİP60'ın HAT aktivitesinin baskılandığı hücrelerde DNA tamir mekanizması ile beraber apoptosiz fonksiyonunda aksaklıklar meydana geldiğini göstermişlerdir (Ikura *et al.* 2000).

2006 yılında Tang ve arkadaşları, K120'de p53'ün Tip60 bağımlı asetilasyonunun hücre döngüsü ve apoptosiz arasındaki ilişkiyi düzenlediği gösterilmiştir. Bununla beraber çalışmada Tip60'ın özel olarak DNA bağlama bölgesi içindeki lizin 120'nin asetilasyonunda da etkili olduğunu belirtmişlerdir (Tang *et al.* 2006).

Kim ve arkadaşları 2012 yılında yapmış oldukları *in vitro* çalışmada NF- κ B hedef genlerinin TİP60 tarafından regüle edildiğini, TİP60'ın NF- κ B RelA/p65'in koregülatörü olduğunu ve protein-protein etkileşimiyle RelA/p65'in transkripsiyonel aktivitesini artırdığını gözlemlemişlerdir (Kim *et al.* 2012). Bu çalışmanın önemi ise hepatoselüler karsinoma hücrelerinde NF- κ B yolağına TİP60'ın dahil olduğunun ortaya çıkarılmasıdır.

Xiao *et al.* (2003), Tip60'ın STAT3 ile ilişkisini aydınlatmak amacıyla hepatoma HepG2 hücre hattında yapmış oldukları çalışmada Tip60'ın N-terminal zinc finger domaini sayesinde HDAC7 ile etkileştiğini ve Tip60'ın baskılamasında HDAC7'nin etkisinin olduğunu gözlemlemişlerdir. Tip60'ı overekspres ettiklerinde STAT3 aracılı gen ekspresyonunun baskılandığını, Tip60'ı mutant ettiklerinde ise STAT3 üzerindeki baskılama yeteneğini kaybettiğini tespit etmişlerdir. Böylece, Tip60'ın STAT3 üzerindeki baskılayıcı etkisinin kısmen HDAC7 ile gerçekleştiği sonucuna varmışlardır (Xiao *et al.* 2003).

Kim *et al.* (2015), HepG2 hücre hattında Tip60'ın TNF- α sinyaline cevapta H3K4me3 ile ilişkili olduğunu göstermişler ve TİP60'ın NF- κ B hedef genlerinin (IL-6 ve IL-8) promotörlerinde H3K4me3'e bağlandığını gözlememişlerdir. Doğal tip proteinlerin aksine TİP60 kromodomain mutantının kromatin bölgesine lokalize olamadığını tespit etmişler, bunun nedeninin ise TİP60 spesifik modifikasyonlarla ve transkripsiyon regülatörleriyle histonlara bağlanmak olduğunu belirtmişlerdir. TİP60 tarafından tanınan histon kodlarını tanımlamak amacıyla histon peptid assay yaparak TİP60'ın histon kodları ve transkripsiyon regülatörleri arasında fonksiyonel bir link olduğu sonucuna varmışlardır (Kim *et al.* 2015).

2.1. Amaç

İnflamasyon, organizmanın sağlıklı dokularına patojen veya patojen olmayan ajanların girişi ile tetiklenerek doğal bir savunma mekanizması oluşturmaktadır. Vücuda yabancı bir madde girdiği zaman sitokinlerin (IL-6, IL-1 vb.) miktarı artarak JAK/STAT yolağı

aktive edilir. JAK/STAT yolağının aktive olmasıyla antimikrobiyal özelliğe sahip olan Hepsidin miktarı artar ve immün yanıt, hasar ortadan kaldırılana kadar devam eder. İnflamasyon bir savunma mekanizması olarak hareket etmesinin yanısıra birçok mekanizma ile de ilişkilidir. Örneğin, inflamatör sitokinlerden biri olan IL-6, gelişim, hücre göçü, invazyon, malignansinin gelişimi, proliferasyon, apoptozis, progresyon, anjiyogenez ve tümör hücre farklılaşmasında rol oynar. Çoğu mekanizma gibi inflamasyon da asetilasyon, deasetilasyon, fosforilasyon gibi epigenetik mekanizmalarla düzenlenmektedir. İnflamasyon yolağında herhangi bir hasar olması durumunda birçok kronik hastalık ve kanser oluşumu tetiklenmektedir.

Histon asetiltransferaz aktivitesi ile epigenetik düzenlemelerde önemli role sahip olan ve koregülatör veya korepresör olarak hareket eden TİP60 birçok genin ifadesinde rol oynamaktadır. TİP60'da herhangi bir hasar olması durumunda histon asetilasyonu, DNA tamiri, hücre döngüsü ve duraklaması ve p53 aracılı apoptosisin başlatılması gibi işlevlerde önemli bir takım sorunlar meydana gelmektedir. Bunun sonucunda da kanser gibi birçok hastalığın tetiklenmesine neden olmaktadır. İnflamasyonun savunma mekanizması, hücresel hasarı engelleyerek apoptozisi sınırlamasındaki etkinliği ve Tip60'ın hücre döngüsü, apoptozis, epigenetik düzenlemeleri ve hepsidin geni üzerindeki etkisi göz önüne alındığında inflamasyon ve Tip60 arasında doğrudan veya dolaylı bir ilişkinin olabileceği fikri akla gelmiştir.

Bu tez çalışmasında, Tip60 geninin inflamasyon yolaklarından biri olan JAK/STAT yolağı üzerine etkisini araştırmak ve bu etkileşimin Tip60'a bağlı olarak aydınlatılmasını sağlayarak çalışmayı daha ileri boyuta taşımak amacıyla, kontrol, LPS muamele ve karaciğer spesifik Tip60 mutant farelerden alınan karaciğer dokularında inflamasyon yolağına ait İnterlökin 6 (IL-6), İnterlökin 1 (IL-1), Janus kinaz 1 (JAK1), Janus kinaz 2 (JAK2), Sinyal üreticisi ve transkripsiyon aktivator 3 (STAT3) ve Hepsidin antimikrobiyal peptid (Hamp)'in gen ve protein ekspresyon profilleri Tip60 yokluğuna bağlı olarak yolağın bu durumdan nasıl etkilendiği araştırılmıştır.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Kullanılan Kimyasallar

Çizelge 3.1. Tez kapsamında kullanılan kimyasal maddeler ve kitler

KİMYASAL ADI	ŞİRKET
Agaroz DNase-RNase-Protease free	Sigma Aldrich
Akril Amid	Sigma Aldrich
Amonyum Persülfat (APS)	Sigma Aldrich
Antikorlar	Abcam-Santa Cruz
Bovin Serum Albumin (BSA)	Sigma Aldrich
Bromfenol Mavisi	Sigma Aldrich
Dithiothreitol (DTT)	Sigma Aldrich
Etanol	Riedel de Haen
Etilendiamintetraasetik Asit (EDTA)	Sigma Aldrich
Etidyum Bromür	Sigma Aldrich
Fosfataz İnhibitörü	Sigma Aldrich
Formamid	Sigma Aldrich
Gliserol	Carlo Erba
Glisin	Riedel-de Haen
Hidrojen Klorür (HCl)	Sigma Aldrich
İzopropil Alkol	Sigma Aldrich
Kloroform	Carlo Erba
Lipopolisakkarit (LPS)	Sigma Aldrich
β - Merkaptoetanol	Sigma Aldrich
Metanol	Sigma Aldrich
3-N-Morfolino Propan Sülfonik Asit (MOPS)	Sigma Aldrich
Potasyum Klorür (KCl)	Sigma Aldrich
Primer ve Prob	Biomers

Çizelge 3.1. (devam)

Protein Marker			Thermo Fischer
Proteaz İnhibitörü			Sigma Aldrich
Polivinilidin Diflorid Membran (PVDF)			Macherey Nagel
QIAzol Lysis Reagent			Qiagen
RNA Yükleme Tamponu			Invitrogen
RNAazZap			Sigma Aldrich
RNeasy Lipid Tissue Mini Kit			Qiagen
Sodyum Deoksikolat			Sigma Aldrich
Skim Milk Powder			Sigma Aldrich
Sodyum Dodesil Sülfat (SDS)			Sigma Aldrich
Sodyum Klorür (NaCl)			Sigma Aldrich
SuperScript III First-Strand cDNA kit			Invitrogen
SuperSignal™ Chemiluminescent Reagent)	West Substrate	Pico (ECL	Thermo Fisher Scientific
SuperSignal™ Maximum Sensitivity Reagent)	West	Femto	Thermo Fisher Scientific
Trizma Base			Sigma Aldrich
Trizol			Sigma Aldrich
Triton X-100			Sigma Aldrich
Tween-20			Riedel-de Haen
N,N,N',N'-Tetrametilendiamin (TEMED)			Sigma Aldrich
Whatman Blotlama Kâğıdı			Bio-Rad

3.2. Tez Kapsamında Kullanılan Materyal ve Cihazlar

1. 1, 1,5 ve 3 mL'lik Kuvarz Küvetler : Merck
2. 1,5-2 mL'lik Tüpler ve Raklar : Eppendorf
3. 15 mL'lik Falkon Tüpler ve Raklar : Eppendorf
4. 1.5-3.0 mm Zirconium Beads : BeadBug™
5. Çeker Ocak : Space Series Fume Cupboard
6. Derin Dondurucu (-86) : New Brunswick Premium U410
7. Derin Dondurucular (-20) : Vestel FT 280, Siemens
8. Destile Su Üretme Cihazı : mp MINI Pure
9. Elektroforez Cihazı : Bio-Rad
10. Güç Kaynağı : Thermo EC EC 135-90
11. Hassas Terazî : Denver Instrument
12. Homojenizatör : Benchmark Scientific BeadBlaster
13. Isıtıcı Bloğu : Lab Line
14. Kar Üretme Cihazı : Scotsman
15. Magnetik Karıştırıcı : Wisd WiseStir MSH-20A
16. Mikrodalga Fırın : Beko MD 1500
17. Mikropipet Takımı : Eppendorf
18. Mini Santrifüj : AOSHENG
19. Nanodrop : Thermo Scientific Multiscan GO USA
20. Otoklav : HMC HIRAYAMA
21. PCR : BIO RAD C1000 Thermal Cycler
22. pH Metre : Mettler Toledo
23. Qiacube (Rna İzolasyon Robotu) : Qiagen Rotor Gene Q
24. Real-Time PCR : Qiagen
25. Fusion FX Görüntüleme Cihazı : Vilber Lourmat
26. Blotlama (Semidry Blotter) Cihazı : BIO-RAD
27. Soğutmalı Santrifüjler : Hettich Mikro 220R
28. UV-VIS Spektrofotometre : Beckman Coulter
29. Vorteks : Wisd WiseMix VM-10

30. Mikrotom Cihazı : Leica RM 2245
 31. İmmünohistokimya Cihazı : Roche Ventana
 32. Kesim Aletleri : Fine Science Tools

3.3. Tez Kapsamında Yapılan Deneylerde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanışı

Çizelge 3.2. Tez kapsamında yapılan çözeltiler ve hazırlanışı

1. 1 M Tris/HCl Tamponu	121,14 g Tris 900 mL destile su içinde çözülüp, 1M HCl ile pH: 6,8'e ayarlanıp hacim destile su ile 1 litreye tamamlandı.
2. 1,5 M Tris/HCl Tamponu	181,7 g Tris 900 mL destile su içinde çözülüp, 1M HCl ile pH: 8,8'e ayarlanıp hacim destile su ile 1 litreye tamamlandı.
3. %30'luk Akrlamid-Bisakrlamid	37,5g Akrlamid, 1 g Bisakrlamid alınarak 128 ml dH ₂ O içerisinde 37°C de çözdürüldü.
4. %10'luk SDS	9 mL saf suda 1 g SDS çözdürüldü.
5. %10'luk APS	2 mL için; 1,8 mL dH ₂ O içerisinde 0,2 g APS çözdürüldü.
6. %5'lik Bloklama çözeltisi	9,5 mL TBST içerisinde 5 g Skim Milk Powder (Yağsız Süt Tozu) ya da Bovine Serum Albumin (BSA) çözdürüldü.
7. 0,15 mol/L İzotonik NaCl çözeltisi	100 mL saf su içinde 0,87 g NaCl çözülerek hazırlandı ve +4 °C'de saklandı.
8. Bradford (Commassie Blue) çözeltisi	100 mg Commassie-Brillant Blue G-250, %95'lik 50 mL etanolde çözülüp üzerine %85'lik 118 mL fosforik asit çözeltisi eklenerek toplam hacim 1 L'ye tamamlandı. Alüminyum folyo ile kaplanarak +4 °C'de saklandı.

Çizelge 3.2. (devam)

9. 20X MOPS Çözeltisi	41,9 g MOPS, 4,1 g sodyum asetat ve 2,6 g EDTA 350 mL DEPC'li suda çözüldü. Daha sonra NaOH ile pH 7'ye ayarlanıp son hacim DEPC'li suyla 500 mL ye tamamlandı. Otoklavlanıp +4°C de saklandı.
10. 1X MOPS Çözeltisi	Daha önce hazırlanmış olan 20X MOPS solüsyonundan 25 mL alındı ve 475 mL saf su oranlarında alınarak hazırlandı.
11. DEPC'li Su	1 mL DEPC 800 mL steril dH ₂ O da çözülüp hacmin 1000 mL'ye tamamlanması ile hazırlandı. 1 gece oda sıcaklığında bekletildi. Otoklavlanıp ışık geçirmeyecek bir şekilde +4°C de saklandı.
12. Jelde Yürütülecek RNA Çözeltisi	1µl izole edilen RNA, 3,5µl ddH ₂ O, 0,5µl MOPS solüsyonu, 5µl formamit karıştırılarak 65°C'de 15dk inkübasyon yapılarak hazırlandı.
13. 10X Transfer Çözeltisi	29 g Glisin, 58 g Tris, 3,7 g SDS 900 mL destile su içerisinde çözdürüldü ve pH 8,3'e ayarlanarak son hacim destile su ile 1 L'ye tamamlandı.
14. 10X TBS Çözeltisi	80 g NaCl, 2 g KCl, 30 g Tris 900 mL destile su içerisinde çözdürüldü ve 1 M HCl ile pH 7,4'e ayarlandı. Toplam hacim destile su ile 1 L'ye tamamlandı ve otoklav edildi.
15. 10X Tris-Glisin Elektroforez Çözeltisi	30,2 g Tris, 188 g Glisin, 100 mL %10 SDS 1 L distile su içerisinde çözdürüldü.
16. 5X SDS Yükleme Tamponu	2,5 ml Tris/HCl çözeltisi, 0,771 g DTT, 0,05 g brom fenol mavisi, 5 mL %50 gliserol, 1 g SDS alındı ve toplam hacim destile su ile 10 mL'ye tamamlandı. Alikuatlara ayrılarak -20 °C'de muhafaz edildi.

Çizelge 3.2. (devam)

17. 1X Transfer Çözeltisi	10X Transfer çözeltisinden 100 mL alınarak, 700 mL destile su ve 200 mL metanol ilave edildi.
18. 1X TBST Çözeltisi	10X TBS çözeltisinden 100 mL alınarak 900 mL destile su ile 1 L'ye tamamlandıktan sonra 1 mL Tween-20 ilave edildi.
19. RIPA Buffer	150 mM sodyum klorür, %1.0Triton X-100, %0.5 sodyum deoksikolat, %0.1 SDS (sodyum dodesil sülfat),50 mM Tris alındı, bir miktar distile su içerisinde çözüldükten sonra pH 8.0'e ayarlandı ve son hacim 25 mL'ye tamamlandı.
20. 5xSDS-PAGE Yükleme Çözeltisi (Laemmlı Buffer)	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.

3.4. Farelerde İnflamasyon Modelinin Oluşturulması

Çalışmada kullanılacak fareler Atatürk Üniversitesi Hayvan Deneyleeri Yerel Etik Kurulu (AÜHADYEK) tarafından onaylanan etik kurul raporu ile Atatürk Üniversitesi Tıbbi Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezi (ATADEM) Laboratuvarı'ndan sağlandı (Şekil 3.1). Muamele ve kontrol olmak üzere 2 grup oluşturuldu ve her bir grupta 5 adet BALB/c ırkı fare bulunduruldu. Deney için 8-10 haftalık erkek fareler kullanıldı. Çalışmadaki fareler deney süresince standart nem, ışık (12 saat gün ışığı/12 saat karanlık) ve oda ısısı koşullarında (20-22°C) muhafaza edildi. Standart fare yemi ve yeterli miktarda distile su ile beslendi. Farelerin ortama adaptasyonu için 1 hafta beklendikten sonra muamele grubunda inflamasyon oluşturmak için intraperitoneal olarak lipopolisakkarit (LPS) (5 mg/kg) enjekte edildikten 6 saat sonra farelerin boynu

kırılarak sakrifiye edildi (Singh *et al.* 2014). Paralel olarak kontrol grubu farelere eşit miktarda steril tuz solüsyonu (0,15 mol/L NaCl) enjekte edildi. Kontrol ve muamele grubu farelerin karın boşlukları longitudinal abdominal insizyon ile açılarak karaciğer dokuları toplandı ve elde edilen dokular derin dondurucuda (-86°C) saklandı.





T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı

T.C. ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ Fen Fakültesi Dekanlığı	
Tarih :	27.03.2014
Kayıt No :	488
Dosya No :	41

Sayı : 36643897-63

Konu : Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Kararı.

20.03.2014
ERZURUM

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN FAKÜLTESİ DEKANLIĞINA

25240 – Kampus / ERZURUM

İlgi : 13.03.2014 tarih ve 55885869-381 sayılı yazınız.

İlgide kayıtlı yazıda belirtildiği üzere, Fakülteniz Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Genetik Anabilim Dalı öğretim üyesi Yrd.Doç.Dr.Harun BUDAK'ın yürütücülüğünde, Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Dekanlığının Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Genetik Laboratuvarında yürütülecek olan "Tip60 Geninin Demir Homeostazisi ve İnflamasyon Üzerine Etkisinin Fare Karaciğerinde Araştırılması" başlıklı araştırma çalışması, Atatürk Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulumuzun 19.03.2014 tarih ve 2 sayılı Oturumunda Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başvuru Formu ve ekli belgeleri, gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemler dikkate alınarak incelenmiş ve aşağıya çıkarılan 48 no'lu kararı ile sözkonusu araştırma çalışmasının yürütülmesinin etik kurallarına uygun olduğuna mevcut oy birliğiyle karar verilmiştir.

Bilgilerinizi ve gereğini arz ederim.

MVA
Mol. Biy. ve Gen. Böl. Baplı na
24 Mart 2014

[Signature]
Doç. Dr. Mustafa Sinan AKTAS
Başkan Vekili

Toplantı Tarihi : 19.03.2014

Toplantı Sayısı : 2

KARAR NO : 48- Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Dekanlığı, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Genetik Anabilim Dalı öğretim üyesi Yrd.Doç.Dr.Harun BUDAK'ın yürütücülüğünde, Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Dekanlığının Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Genetik Laboratuvarında yürütülecek olan "Tip60 Geninin Demir Homeostazisi ve İnflamasyon Üzerine Etkisinin Fare Karaciğerinde Araştırılması" başlıklı araştırma çalışması ile ilgili Fen Fakültesi Dekanlığının 13.03.2014 tarih ve 55885869-381 sayılı yazısı ile ekleri görüşüldü.

Yapılan görüşmelerden sonra; adı geçen araştırma çalışmasının yürütülmesinin, etik kurallarına uygun olduğunun, mevcut oy birliği ile kabulüne; karar verildi.

Adres : Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dekanlığı, 25240 – Yakutiye / ERZURUM
Telefon : 0-442-231 47 30 **Fax** : 0-442-231 55 63 **e-mail**: hadyck@atauni.edu.tr

26 Mart 2014

Şekil 3.1. Atatürk Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (AÜHADYEK) tarafından onaylanan etik kurul raporu

3.5. Tip60 Geninin Karaciğere Spesifik Olarak Silinmesi

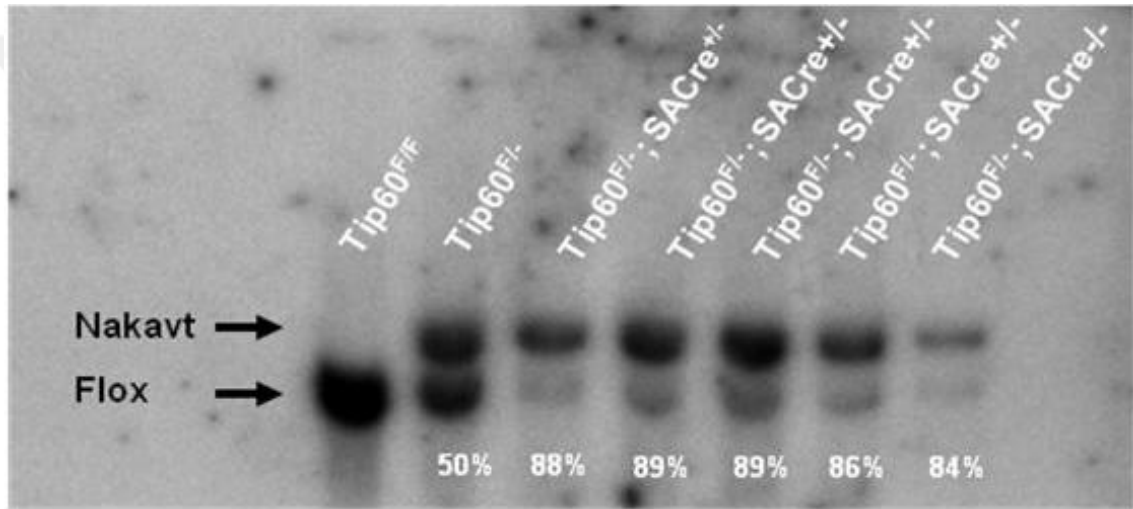
Genom üzerinde hedeflediğimiz bölgeyi, istediğimiz hücre tipinde silebilmek amacıyla Cre/LoxP sistemi kullanıldı. 34 baz çiftinden oluşan dizilimi spesifik olarak tanıyan Cre rekombinaz enzimi ile Cre/LoxP sistemine göre gen üzerinde silinmesi istenen bölge iki LoxP dizilimi arasına alınarak LoxP dizilimleri arasındaki bölgenin her iki yönden silinmesi sağlanır. Bu özelliğiyle, Cre/LoxP sistemi ökaryotik canlılardaki gen manüplasyonlarında kullanılan bir yöntemdir (Budak 2009).

Tip60 geninin karaciğere spesifik olarak silinmesi ve dokuların ZT zaman birimlerinde Aschoff tip2 protokolüne göre toplanması, Prof. Dr. Gregor Eichele'nin laboratuvarında (Max-Planck Institute for biophysical Chemistry, Department of Genes and Behavior Göttingen) Dr. Harun BUDAK tarafından yapılmıştır.

Tip60 geni üzerinde silinmesi istenen bölgelerin (ekzon 1 ve ekzon 9) önüne ve arkasına LoxP (locus of X over P1) dizilimi yerleştirilerek ekzon 1 ve ekzon 9 aralığının Cre rekombinazlar tarafından silinmesine olanak verilmiştir. Karaciğere spesifik olarak Tip60 genini silmek için Tip60F^{-/-};SA⁺/Cre genotipine sahip olan fareler kullanıldı. Cre rekombinaz, karaciğere spesifik olarak kuvvetli şekilde ekprese olan SA (serum albümin) genine ait promotörün kontrolü altında eksprese olmakta ve tamoksifen tarafından indüklenebilme (tamoxifen-inducible Cre recombinase) özelliğine sahip olmaktadır (Budak 2009). Böylece Tip60 genini fare karaciğer dokusunda istediğimiz zaman silebilme avantajı bulunmaktadır.

Tip60F^{-/-};SA⁺Cre genotipinde olan fareler, kontrol ve deney grubu olmak üzere iki gruba ayrıldı. Deney grubu farelerine, içinde tamoksifen çözülmüş mısır yağı, 10 g vücut ağırlığına karşılık 1 mg olacak şekilde 5 gün süreyle intraperitoneal olarak enjekte edilirken, Tip60F^{-/-};SA⁺Cre genotipindeki kontrol grubu farelere aynı miktarda ve süreyle tamoksifen içermeyen mısır yağı enjekte edildi. 12 saat ışık ve 12 saat karanlık (12:12 LD) döngüsü altında tutulan kontrol ve mutant (Tip60 nakavt) olarak isimlendirilen farelere 5 günlük enjeksiyonu takiben 5 gün (toplam 10 gün) beklenildi.

Her zaman biriminde 2 kontrol ve 2 mutant olmak üzere toplam 4 fareden, 4'er saat aralıklarla 8 farklı zaman birimi için karaciğer dokuları toplandı. Tamoksifen SACre rekombinazı indüklemeye özelliğine sahip olduğundan enjeksiyon sonrasında SACre rekombinazın Tip60 genini spesifik olarak sildiği düşünüldüğünden Dr. Harun BUDAK tarafından Southern blot analizi yapılarak silinme etkinliği kontrol edildi ve Image J programı yardımıyla silinme etkinliğinin %84-%89 arasında değiştiği belirlendi (Akyüz 2013; Gonul 2013).



Şekil 3.2. Tamoksifen tarafından indüklenen SACre recombinazın Tip60 genini karaciğere spesifik olarak silme etkinliğinin gösterilmesi (Akyüz 2013; Gonul 2013)

3.6. Real Time PCR Uygulaması

3.6.1. Total RNA İzolasyonu

Amacımıza yönelik olarak, kontrol ve LPS muamele, kontrol ve mutant (Tip60 nakavt) farelerden toplanan karaciğer dokularından cDNA kütüphanesi hazırlamak için total RNA izolasyonu, RNeasy Lipid Tissue Mini Kit yardımıyla Qiagen şirketinin önerdiği prosedüre göre gerçekleştirildi.

RNA izolasyon prosedürü aşağıdaki gibidir:

- Karaciğer dokusundan 50 mg alınarak 2 mL'lik ependorf tüplerine konuldu.
- Üzerine 1 mL QIAzol Lysis Reagent eklenerek homojenizatör (Benchmark Scientific BeadBlaster) yardımıyla 4260 rpm'de, 4 dk süreyle iyice parçalandı.
- 15-25°C'de (oda şartlarında) düz bir zeminde 5 dk inkübe edildi.
- Üzerine 200 µL kloroform eklendikten sonra birkaç saniye vortekslendi.
- Düz bir zeminde 2-3 dk inkübe edildi.
- +4°C'de 12000xg'de 15 dk santrifüj edilerek faz ayrımı sağlandı.
- Fazlar arasındaki orta kesite dokunulmadan her tüpün üst fazından 500 µL alınarak steril 2 mL'lik ependorf tüplerine aktarıldıktan sonra tüpler, QIAcube RNA izolasyon robotuna yerleştirildi ve bundan sonraki basamaklar QIAcube RNA izolasyon robotu tarafından aşağıdaki şekilde yürütüldü.

1. Örnekler üzerine aynı hacimde %70'lik etanol eklenerek vortekslendi.
2. Her örnekten 700 µL hacim, 2 mL'lik toplama tüpüne takılı olan RNeasy Mini spin kolonuna transfer edilip santrifüj kapağı kapatılarak oda sıcaklığında 8000xg'de 15 sn santrifüj edilir (istenirse bu adım RNA izolasyon robotuna tekrar ettirilebilir).
3. Her RNeasy kolonuna 700 µL RW1 tamponu eklenerek oda koşullarında 8000xg'de 15 sn santrifüj ve 500 µL RPE tamponu eklenerek 8000xg'de 2 dk santrifüj edildi.
4. Her RNeasy kolonu, 1,5 mL'lik yeni tüplere takılıp isteğe bağlı olarak 30-50 µL RNase-free water ilave edilerek, oda koşullarında 8000xg'de 1 dk santrifüj yapıldıktan sonra kolondaki total RNA 1,5 mL'lik ependorf tüplerine elüe edilmiş oldu. QIAcube RNA izolasyon robotundan alınan tüplerin kolonları atılarak RNA örnekleri cDNA sentezine kadar -80°C'de saklandı.

3.6.2. RNA'nın agaroz jel elektroforezinde kontrolü

Jel elektroforezi, saflaştırılmış nükleik asit ve proteinlerin molekül ağırlığı, miktarı ve alt tiplerinin saptanmasında yaygın olarak kullanılan moleküler bir yöntemdir. Destek madde olarak agaroz ve poliakrilamid jellerin kullanıldığı elektroforez yöntemi,

elektiriksel bir alanda, ortamda çözünmüş moleküllerin elektrik yüklerine göre göç etmeleri prensibine dayanır. Bu göç hızı molekülün büyüklüğüne, yapısına, ortamın yoğunluğuna, iyonik kuvvete ve uygulanan akıma bağılı olarak değişmektedir (Kocpınar 2015).

Total RNA jelde oldukça belirgin 28S (veya 23S) ve 18S (veya 16S) rRNA bantlarına sahiptir. 18S rRNA bandı 28S rRNA bandının yaklaşık yarısı kadar bir parlaklık oluşturur. Bu 2:1 oranı toplam RNA'nın parçalanmadan elde edildiğinin en kesin göstergesidir (Kocpınar 2015).

3.6.3. Agaroz jelin hazırlanması

- 1,88 mL 20XMOPS solüsyonuna 0,3 g agaroz, 28,5 mL ddH₂O sırasıyla konulup kaynatıldıktan sonra 37°C'ye kadar soğuyunca 6,68 µL formamit eklendi.
- Hemen ardından 5,5µl etidyum bromür eklenip jel polimerleşmeye bırakıldı.

3.6.4. Yürütülecek RNA örneğinin hazırlanması

- İzole ettiğimiz RNA örneklerinden 1 µL alarak 3,5 µL ddH₂O ile karıştırıldı.
- 0,5 µL 20XMOPS solüsyonu ve 5 µL formamit ilave edilerek 65°C'de 15dk inkübe edildi.
- RNA örnekleri 1 µL 6X yükleme tamponu ilave edilip agaroz jele yükleme yapıldı.

Sonrasında 30 dk süre ile 60V'de elektrik akımı uygulanıp sonuçlar UV ışık altında görüntülendi.

3.6.5. Elektroforez işlemi

RNA örnekleri 1 µL 6X yükleme tamponu ile renklendirilerek her örnek, 1XMOPS solüsyonu bulunan tank içindeki agaroz jel kuyularına 7'şer µL olacak şekilde

mikropipetler (eppendorf) yardımıyla ayrı ayrı yüklendi. 60V (Volt) elektrik potansiyelinde 30 dk süreyle yürütme işlemi uygulandıktan sonra görüntüleme cihazı (Quantum Vilber Lourmat) ile jelin fotoğrafı çekildi.

3.6.6. RNA'nın konsantrasyon ve saflığının belirlenmesi

Elde edilen RNA'nın Nanodrop ile (Thermo Scientific Multiscan GO USA) spektroskopik ölçümü yapılarak saflığı ve konsantrasyonu belirlendi.

3.6.7. cDNA kütüphanesinin hazırlanması

İzole edilen mRNA'lardan cDNA sentezi için SuperScript III First-Strand cDNA kit (Invitrogen) sistemi kullanılarak üretici firmanın protokolüne göre aşağıdaki şekilde yapıldı.

Steril bir mikrosantrifüj tüpüne;

- 1µl 50ng/µL Rastgele (Random) primer
- 10pg-5µg total RNA veya 10pg-500ng mRNA
- 2µl 10mM dNTP Mix konularak toplam hacim ddH₂O ile 12µl'ye tamamlanacak ve karışım 65°C'de 5 dakika inkübe edildikten sonra buz üzerinde en az 1 dakika inkübe edildi.

Karışım kısa süreli santrifüjlendikten sonra üzerine aşağıdaki çözeltiler belirtilen miktarlarda eklendi;

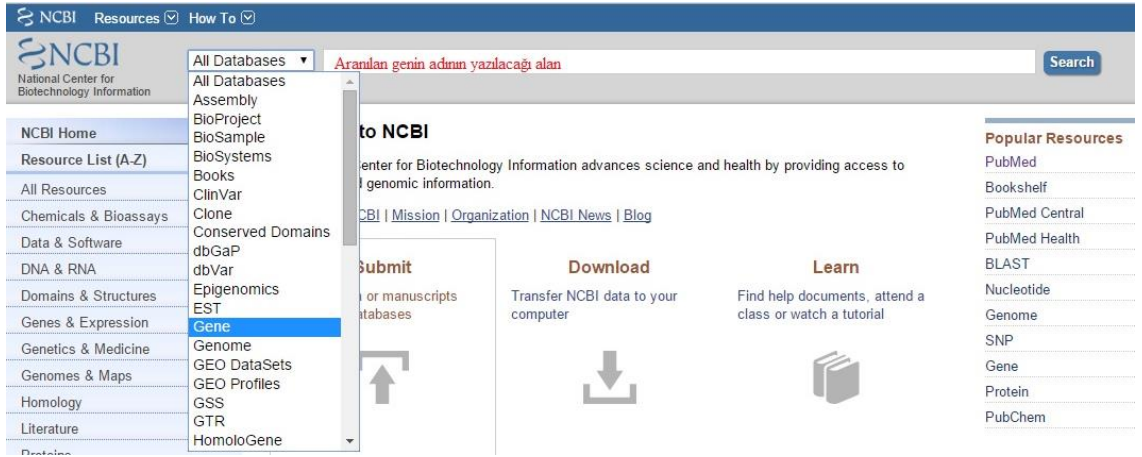
- 5X cDNA Synthesis Buffer 4µl
- 0.1M DTT 1µl
- RNaseOUT™ Recombinant RNase 1µl
- SuperScript™ III RT 1µl
- ddH₂O 1µl

Karışım hafifçe karıştırılacak ve 25°C’de 10dk inkübe edildi. Sonrasında 50°C’de 50dk ve 85°C’de 5dk inkübe edildi. Kısa bir santrifüjün ardından 1µL RNase H eklenerek 37°C’de 20dk inkübe edildi. Reaksiyon sonlandırılıp Real-time PCR analizinde kullanılmak üzere -20°C’de saklandı.

3.6.8. Primer ve prob dizaynı

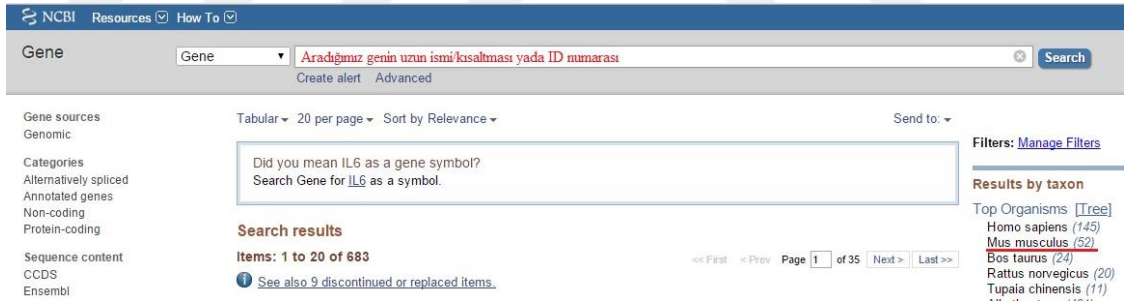
3.6.8.a. Primer ve prob dizaynı için gen sekansına ulaşılması

Tez kapsamında çalışılacak İnterlökin 6 (Il-6), İnterlökin 1 (Il-1), Janus kinaz 1 (Jak1), Janus kinaz 2 (Jak2), Sinyal ileticisi ve transkripsiyon faktör 3 (Stat3), Hepsidin antimikrobiyal peptid (Hamp), K(Lizin) asetiltransferaz 5 (Kat5)/Tip60 ve β-Aktin genlerinin primer ve prob dizaynı için National Center for Biotechnology Information (NCBI) databazı kullanılmıştır. Bunun için NCBI ana sayfası (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)’na gidilerek Şekil 3.2’deki gibi “All databases” bölümünden “Gene” seçeneği seçildi ve arama kutucuğuna gen bilgisi (kısa veya uzun adı ya da ID numarası) girilip “search” tıklanarak Şekil 3.3’teki organizma seçim sayfasına ulaşıldı.



Şekil 3.3. Primer ve prob dizayn etmede kullanılan NCBI ana sayfası

Şekil 3.3'te gösterildiği gibi ilgili gen için organizma seçimi yapıldı. Bu tez çalışmasında kullanılan organizma fare olduğundan “Mus musculus” seçeneği tıklanarak Şekil 3.4'deki organizmaya ait gen bilgilerini içeren sayfaya ulaşıldı.



Şekil 3.4. Primer prob dizayn etmek için kullanılan NCBI organizma seçim sayfası

İlgilendiğimiz genin hangi organizma için aratıldığını gösteren Şekil 3.4'deki sayfada genin üzerine tıklayarak ilgili genin organik baz ve protein sekansını içeren Şekil 3.5'deki sayfaya ulaşıldı.

NCBI Resources How To

Gene (IL6) AND "Mus musculus"[porgn:__txid10090]

Gene sources: Genomic

Categories: Alternatively spliced, Annotated genes, Non-coding, Protein-coding

Sequence content: CCDS, Ensembl, RefSeq

Search results: Items: 1 to 20 of 52

Name/Gene ID	Description	Location	Aliases
<input type="checkbox"/> IL6 ID: 16193	interleukin 6 [<i>Mus musculus</i> (house mouse)]	Chromosome 5, NC_000071.6 (30013161..30019968)	IL-6

Şekil 3.5. İlgili genin temel özelliklerini gösteren NCBI sayfası

Açılan sayfanın alt bölümünde yer alan gen sekans kodu (NM_...) protein sekansı kodu (NP_...) bağlantı linkleri görülmektedir. NM ile başlayan linke tıklanarak ilgilendiğimiz genin ayrıntılı bilgilerinin ve sekansının bulunduğu Şekil 3.6'daki sayfa görüntülendi.

mRNA and Protein(s)

NM_001314054.1 → NP_001300983.1 interleukin-6 isoform 2 precursor

Status: REVIEWED

Description: Transcript Variant: This variant (2) uses an alternate splice site in the 3' terminal exon, compared to variant 1. The encoded protein (isoform 2) is shorter and has a distinct C-terminus, compared to isoform 1.

Source sequence(s): AC112933, AK150440, BC145409

UniProtKB/TrEMBL: A0A0G2JGF4

UniProtKB/Swiss-Prot: P08505

Conserved Domains (1) summary

cl02473	IL6; Interleukin-6/G-CSF/MGF family
---------	-------------------------------------

Location: 55 → 157

Şekil 3.6. İlgili genin gen ve protein sekansını gösteren NCBI veritabanı

NCBI Resources How To

Nucleotide (Nucleotide)

GenBank

Mus musculus interleukin 6 (IL6), transcript variant 2, mRNA

NCBI Reference Sequence: NM_001314054.1

[FASTA](#) [Graphics](#)

Şekil 3.7. Aranılan genin sekansının bulunduğu internet veri tabanını

Gen ayrıntılarının bulunduğu şekil 3.6'deki sayfanın sol bölümünde dikey olarak sıralanmış gene ait olan çeşitli bilgilerin sunulduğu kısımda "CDS" olarak adlandırılan sekans bilgisi tıklanarak genin kodlanan bölgesi işaretlendi. Bu bölgenin belirlenmesi, dizayn edilecek primer ve probun hangi bölgeden yapılacağı konusunda kolaylık sağlandı. Şekil 3.7'de tez kapsamında çalışılan genlerden biri olan Il-6 genine ait kodlanan bölge koyu zeminle işaretli olarak gösterildi.

```

1 aaatatgaga ctgggatgt ctgtagctca ttctgctctg gagccacca agaacgatag
61 tcaattccag aaaccgctat gaagttcctc tctgcaagag acttccatcc agttgccttc
121 ttgggactga tgctggtgac aaccacggcc ttccctactt cacaagtccg gagaggagac
181 ttcacagagg ataccactcc caacagacct gtctatacca cttcacaagt cggaggctta
241 attacacatg ttctctggga aatcgtggaa atgagaaaag agttgtgcaa tggcaattct
301 gattgtatga acaacgatga tgcacttgca gaaaacaatc tgaacttcc agagatacaa
361 agaaatgatg gatgctacca aactggatat aatcaggaaa ttgcttatt gaaaatttcc
421 tctggcttc tggagtacca tagctacctg gagtacatga agaacaactt aaaagataac
481 aagaaagaca aagccagagt ccttcagaga gatacagaaa ctctaattca tatcttcaac
541 caagagataa gctggagtca cagaaggagt ggctaaggac caagaccatc caattcatct
601 tgaatcact tgaagaatth taaaagtca ctttgagatc tactcggcaa acctagtgcg
661 ttatgcctaa gcatatcagt ttgtggacat tcctcactgt ggtcagaaaa tatatcctgt
721 tgtcaggtat ctgacttatg ttgttctcta cgaagaactg acaatatgaa tgttgggaca
781 ctattttaat tatttttaat ttattgataa tttaaataag taaactttaa gtttaattat
841 gattgatatt tattattttt atgaagtgtc acttgaaatg ttatatgta tagttttgaa
901 atgataacct aaaaatctat ttgatataaa tattctgta cctagccaga tggtttcttg
961 gaatgtataa gtttacctca atgaattgct aattttaaata tgtttttaaa gaaatctttg
1021 tgatgtatth ttataatgth tagactgtct tcaaacaat aaattatatt atatttaaaa
1081 acc

```

Şekil 3.8. Il-6 genine ait kodlanan ve kodlanmayan bölgeleri gösteren veritabanı

Şekil 3.7'de gösterilen gene ait dizilimler arasında boşluklar ve satır sayıları bulunmakta ve bu durum sonraki işlemlerin devam ettirilmesinde bir engel ortaya koymaktadır. İşlemi kolaylaştırmak için Şekil 3.6'de bulunan 'FASTA' seçeneğine tıklanarak boşluklar ve sayı sıraları kaldırıldı. <http://bioinfo.ut.ee/primer3/> programı kullanılarak, genlere ait ekspresyon profillerini aydınlatmak amacıyla primer ve prob dizaynı yapıldı.

Primer ve prob dizayn edilirken dikkat edilmesi gereken bazı hususlar vardır;

- Probulun bağlanma sıcaklığı genellikle primerinkinden ~ 10 °C yüksek olmalı
- Probulun soğurucununun tutturulacağı 5'ucu G ile bitmemeli
- Genellikle probun GC içeriği %35-65 arasında olmalı
- Genellikle G ve C ile başlayan dizilimler tercih edilmemeli
- Primer ve problemlerin kendi aralarında ve kendi kendilerine bağlanma ihtimalleri olabildiğince düşük olmalı
- Amplifikasyon bölgesinin boyutu 60-150 bp arasında seçilmeli

Şekil 3.8'de ilgili gen sekansı kutucuğa yapıştırılarak left primer, right primer ve prob kutucukları işaretlendi.

The image shows the Primer3web interface. At the top, it says "Primer3web version 4.0.0 - Pick primers from a DNA sequence." There are links for "disclaimer" and "code". Below that, there is a dropdown menu for "Task for primer selection" set to "generic". A text area contains a DNA sequence: "AAATATGAGACTGGGATGCTGTAGCTCATTCTGCTCTGAGCCACCAAGAACGATAGTCAATCCAGAAACCGCTATGAAGTTCCTCTGCAAGAGACTTCCATCCAGTTCCTCTTGGGACTGATGCTGGTGGACAAACCGGCTTCCCTACTTCCAAAGTCCGGAGAGGAGACTTCCAGAGGATACCACTCCCAACAGACTGTCTATACCACTTCCAAAGTCCGAGGCTTAATTACACATGTTCTCTGGGAAATCGGAAATGAGAAAAGAGTTGTGCAATGGCAATTCGATTGTATGAACAACGATGATGCACTTGCAGAAAACAACTGAAACTTCCAGAGATCAAGAAATGATGGATGCTACCAACTGATATAATCAGGAAATTTGCTATTGAAATTTCC". Below the sequence, there are three checkboxes: "Pick left primer, or use left primer below" (checked), "Pick hybridization probe (internal oligo), or use oligo below" (checked), and "Pick right primer, or use right primer below (5' to 3' on opposite strand)" (checked). At the bottom, there are buttons for "Pick Primers", "Download Settings", and "Reset Form".

Şekil 3.9. Primer ve prob dizaynında kullanılan veri tabanı

Şekil 3.9'da gösterilen 'General Primer Picking Conditions' sekmesinde primer dizaynında gerekli olan bilgiler (primer boyutu, primerin bağlanma sıcaklığı, primer % GC oranı, amplifikasyon bölgesinin boyutu vs.) girildi.

General Primer Picking ConditionsUpload the settings from a file Dosya seçilmedi

Primer Size Min Opt Max
Primer Tm Min Opt Max Max Tm Difference Table of thermodynamic parameters SantaLucia 1998 ▼
Product Tm Min Opt Max
Primer GC% Min Opt Max

Product Size Ranges Number To Return Max 3' Stability Max Library Mismatching Pair Max Library Mismatching

Thermodynamic Secondary Structure Alignments			
<input checked="" type="checkbox"/> <u>Use Thermodynamic Oligo Alignment</u>		<input type="checkbox"/> <u>Use Thermodynamic Template Alignment</u>	
<u>TH: Max Template Mismatching</u>	<input type="text" value="40.00"/>	<u>TH: Pair Max Template Mismatching</u>	<input type="text" value="70.00"/>
<u>TH: Max Self Complementarity</u>	<input type="text" value="45.0"/>	<u>TH: Max 3' Self Complementarity</u>	<input type="text" value="35.0"/>
<u>TH: Max Pair Complementarity</u>	<input type="text" value="45.0"/>	<u>TH: Max 3' Pair Complementarity</u>	<input type="text" value="35.0"/>
<u>TH: Max Primer Hairpin</u>	<input type="text" value="24.0"/>		

Old Secondary Structure Alignments			
<u>Max Template Mismatching</u>	<input type="text" value="12.00"/>	<u>Pair Max Template Mismatching</u>	<input type="text" value="24.00"/>
<u>Max Self Complementarity</u>	<input type="text" value="8.00"/>	<u>Max 3' Self Complementarity</u>	<input type="text" value="3.00"/>
<u>Max Pair Complementarity</u>	<input type="text" value="8.00"/>	<u>Max 3' Pair Complementarity</u>	<input type="text" value="3.00"/>

Şekil 3.10. Primere ait bilgilerin girildiği sayfa

Şekil 3.10'da proba ait bilgiler (prob uzunluğu, probun bağlanma sıcaklığı, probun % GC oranı vs.) girildi. Daha sonra 'Pick Primers' tıklanarak dizayn yapıldı.

Internal Oligo (Hyb Oligo) General Conditions

Internal Oligo Size Min Opt Max
Internal Oligo Tm Min Opt Max
Internal Oligo GC% Min Opt Max

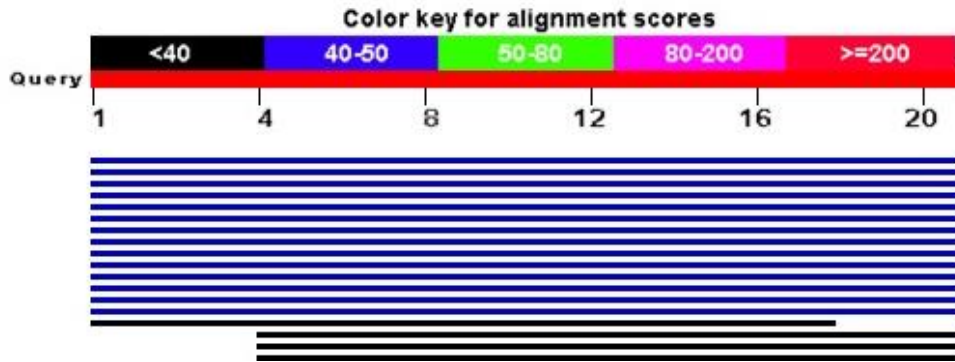
<u>TH: Internal Oligo Self Complementarity</u>	<input type="text" value="47.00"/>	<u>TH: Internal Oligo Max 3' End Self Complementarity</u>	<input type="text" value="47.00"/>
<u>TH: Internal Oligo Hairpin</u>	<input type="text" value="47.00"/>		

<u>Internal Oligo Self Complementarity</u>	<input type="text" value="12.00"/>	<u>Internal Oligo Max 3' End Self Complementarity</u>	<input type="text" value="12.00"/>
--	------------------------------------	---	------------------------------------

Internal Oligo Min Sequence Quality
Max #Ns Internal Oligo Max Poly-X
Internal Oligo Mishyb Library NONE ▼ Internal Oligo Max Library Mishyb
Internal Oligo Conc of monovalent cations Internal Oligo DNA Concentration
Internal Oligo conc of divalent cations Internal Oligo [dNTP]

Şekil 3.11. Proba ait bilgilerin girildiği sayfa

Şekil 3.13. Gen sekansının homolojisinin kontrol edildiği organizmaya özgü blast sayfası



Şekil 3.14. Dizayn edilen primer ve problemlerin homolojilerinin kontrol edildiği blastlama sayfası

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
38.2 bits(19)	0.035	19/19(100%)	0/19(0%)	Plus/Plus
Query	1	GCCTTCTTGGGACTGATGC	19	
Sbjct	115	GCCTTCTTGGGACTGATGC	133	

Şekil 3.15. Dizayn edilen primer ve problemlerin kontrol edildiği blastlama sayfası (alt kısım) Primer ve problemlerin blastlanması sonucunda ortaya çıkan ve ilgili primer ve problemlerle homolojisi olan genler

*Query: verilen primer baz sırası, Sbjct: homoloji gösteren genin ilgili bölgesi

Primer ve prob dizaynı sonrasında tez kapsamında kullanılmak üzere sipariş edilen genlere ait bilgiler Çizelge 3.3’de verilmiştir.

Çizelge 3.3. Gen ekspresyon profillerine bakılacak genler için dizayn edilen primer ve propların listesi

Gen Kısa İsmi	Gen Accession No	Primer ve Prob	Primer ve Prob Dizisi (5' → 3')	NCBI Değerleri	
				TM Sıcaklığı (°C)	%GC Oranı
<i>Tip60 (Kat5)</i>	NM_001199247.1	Forward	AGAATGGGTCAGCCCGTAG	60.80	57.89
		Prob	FAM-AGCCTGGACGGAAGCGGAAATC-TAMRA	69.71	59.09
		Reverse	ATTCGTGGTGCTGACGGTAT	60.41	50.00
<i>Il-6</i>	NM_031168.1	Forward	GCCTTCTGGGACTGATGC	60.76	57.89
		Prob	FAM - GGTGACAACCACGGCCTCCCT- TAMRA	70.61	63.64
		Reverse	GGTCTGTTGGGAGTGGTATCC	60.62	57.14
<i>Il-1a</i>	NM_010554.4	Forward	AGGGCAGAGAGGGAGTCAA	59.93	57.89
		Prob	FAM- TGGCGCTTGAGTCGGCAAAG-TAMRA	69.60	60.00
		Reverse	AGGTCTTCAAACAAGTCAGGAAGT	59.74	57.89
<i>Jak1</i>	NM_146145.2	Forward	TCAAGAAGACTGAGGTGAAGCA	60.17	45.45
		Prob	FAM- TGGTCCCTGAGCCTGGAGTGG-TAMRA	69.23	66.67
		Reverse	AGGGCGAAGAGGTTGTGAC	60.25	57.89
<i>Jak2</i>	NM_001048177.2	Forward	TCCTCTGCTTGATGACTTTGTC	59.48	45.45
		Prob	FAM- AGAGTGTCTTGGGATGGCGGTGT -TAMRA	69.14	54.17
		Reverse	CGAACGCACTTTGGTAAGAAT	59.28	42.86
<i>Stat3</i>	NM_011486.5	Forward	ICTCCTTCTGGGTCTGGCTA	59.94	55.00
		Prob	FAM- ATCAGCAAGGAGCGGGAGCG-TAMRA	69.28	65.00
		Reverse	CTCCTTCTTGGTCTGCTCTCG	60.41	55.00
<i>Hamp</i>	NM_032541.1	Forward	CTGCCTGTCTCTGCTTCTC	60.303	60.00
		Prob	FAM-GCCAGCCTGAGCAGCACCACC-TAMRA	72.00	71.40
		Reverse	TGCTGCCCTGCTTTCTTCC	60.40	50.00
<i>β-Aktin</i>	NM_007393.4	Forward	AATCGTGCGTGACATCAAAG	59,72	45,00
		Prob	Cy5- ATGGCCACTGCCGCATCCTC-BQ2	69,42	65,00
		Reverse	CGTTGCCAATAGTGATGACCT	59,32	50,00

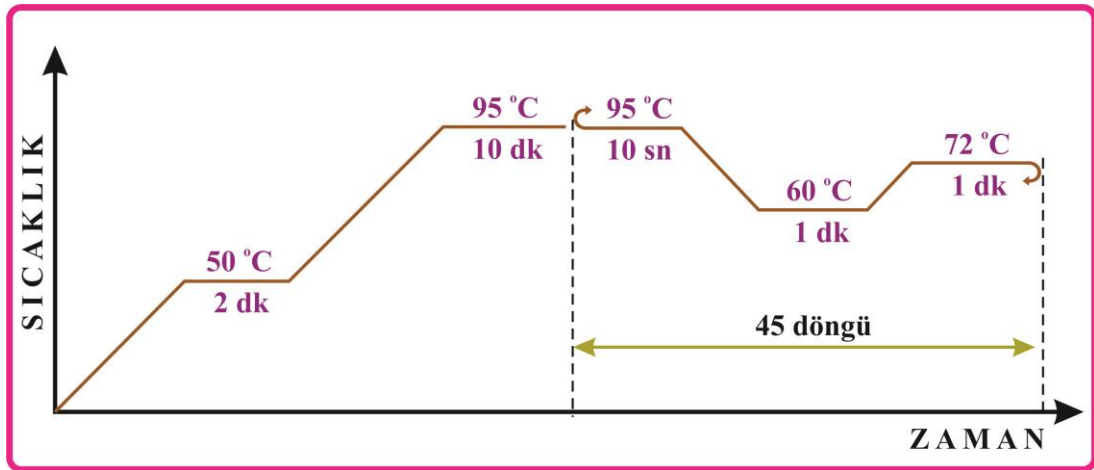
3.6.8.b. Real-Time PCR analizi

Kantitatif gen ekspresyonunun belirlenmesi amacıyla multipleks Real-Time PCR yapıldı. Hedef gen (çalışılan gen) ve referans gen (housekeeping) aynı tüp içerisinde PCR reaksiyonuna sokuldu ve böylece istatistiksel hata azaltıldı. Hedef gen probunun 5' ucunda raportör florokrom 6-carboxyfluorescein (FAM), 3' ucunda baskılayıcı florokrom 6- carboxy-tetramethyl-rhodamine (TAMRA) floresan etiketi takıldı.

Referans genin probunun 5' ucunda raportör florokrom (Cy5), 3' ucunda baskılayıcı florokrom (BQ2) olan floresan etiketi takıldı. Mutant farelerden, inflamasyon oluşturulan farelerden ve kontrol grubu farelerden elde edilen karaciğer doku örneklerinden izole edilmiş total RNA'dan revers transkriptaz enzimi yardımıyla hazırlanan cDNA'lar kullanıldı. Real-time PCR uygulamasında kullanılan reaksiyon karışımı Çizelge 3.4'de ve sıcaklık döngüsü Şekil 3.15'de gösterildi.

Çizelge 3.4. Real-Time PCR reaksiyonunda her tüp için kullanılan kimyasal miktarları ve konsantrasyonları

Bileşenler	Son Konsantrasyon	Miktar (μL)
ddH ₂ O (Steril)	-	8,7
TaqMan® Probe Master Mix	2X	12,5
Forward Primer hedef gen	0,8 pmol	0,25
Reverse Primer hedef gen	0,8 pmol	0,25
Forward Primer referans gen (Aktin)	0,8 pmol	0,25
Reverse Primer referans gen (Aktin)	0,8 pmol	0,25
Probe hedef gen	0,4 pmol	0,15
Probe referans gen (Aktin)	0,4 pmol	0,15
↓	↓	↓
cDNA	0,02 ng/ μl	2,5



Şekil 3.16. Real-Time PCR programında kullanılan sıcaklık döngüsü

3.6.8.c. Sonuçların değerlendirilmesi ve istatistikî analizler

Real-time PCR'da karşılaştırmalı ölçüm için ΔC_T matematiksel metodu kullanıldı.

$$\text{Oran (referans/hedef)} = 2^{C_T(\text{referans}) - C_T(\text{hedef})}$$

Oran: Ekspresyon seviyesi

2: Hedef geni çoğaltan primer etkinlik oranı (Bu oran %100'e yakın ise 2 alınır.)

C_T referans: PCR reaksiyonu esnasında referans (housekeeping) genin miktarsal olarak anlamlı artışının gerçekleştiği değer

C_T hedef: PCR reaksiyonu esnasında hedef genin miktarsal olarak anlamlı artışının gerçekleştiği değer

Verilerin değerlendirilmesinde GraphPad Prism 5 (GraphPad, La Jolla, CA) Software 7.0 istatistik programı kullanıldı. Gruplara Unpaired t test uygulandı. Bütün sonuçlarda mean \pm standard hata (SEM) değerleri analiz edildi. Yıldız olarak ifade edilen değerler istatistiksel analiz sonucu elde edilen p önem değerlerini ifade etmektedir. Önemlilik derecesine göre yıldız sayısı 1 ile 3 arasında doğru orantılı olarak değişmektedir. $p > 0,05 = ns$ (not significant) önemsiz, $p < 0,05 = *$ (significant) önemli, $p < 0,01 = **$ (very significant) çok önemli, $p < 0,001 = ***$ (highly significant) yüksek derecede önemli olarak değerlendirildi.

LPS muamele ve Tip60 mutant fare gruplarında yapılan gen ve protein seviyeleri nonparametrik spearman korelasyon analizi ile karşılaştırılarak korelasyon katsayısı (r) hesaplandı. ± 1 aralığında değerler alan korelasyon katsayısının +1'e yaklaşması iki veri grubunun paralelliği, -1'e yaklaşması antiparalelliği ve 0'a yaklaşması ise iki veri grubunun ilişkili olmadığı anlamına gelir. Korelasyon analizine göre r değeri, $0,25 > r > 0$

ise hiç ilişki yok ya da çok zayıf ilişki, $0,50 > r > 0,25$ ise zayıf ya da orta dereceli ilişki, $0,75 > r > 0,50$ ise iyi dereceli ilişki, $1,00 > r > 0,75$ ise çok iyi derecede ilişki olarak nitelendirildi.

3.7. Protein Ekspresyon Analizleri

3.7.1. Bradford (commassie blue) protein tayini

Doku örneklerinde veya süpernatantlarda bulunan protein miktarlarını ölçmek için kullanılan yöntemlerden biri Bradford (Commassie Blue) protein tayin yöntemidir. 595 nm dalga boyunda yapılan bu yöntem, 5-100 µg/mL aralığında bulunan protein miktarlarının ölçümünde kullanılır. Bradford (Commassie Blue) protein tayini, organik boyaların proteinlerin asidik ve bazik grupları ile etkileşerek renk oluşturması esasına dayanır. Bradford yöntemi Commassie brilliant blue (parlak mavisi) G-250 boyasının farklı konsantrasyonlardaki proteinlere bağlanarak, değişik renk şiddetinde mavi renkli çözeltiler ortaya koymasından yararlanılarak geliştirilmiştir. Protein tayini sırasında mavi rengin oluşmasında proteinin amino asit bileşimi özellikle arjinin gibi bazik amino asitler ve aromatik amino asitler önemlidir. Yöntemde kullanılan ana esas, kullanılan boyanın normalde 465 nm dalga boyunda absorbanans verirken, protein ile bağlanma sonrasında 595 nm dalga boyunda maksimum absorbanans vermesidir.

Kontrol grupları, LPS muamele edilmiş ve Tip60 mutant fare karaciğerlerinden elde edilen homojenatlarda, Bradford (Commassie Blue) protein tayini yukarıda bahsedilen prosedüre göre uygulandı

Öncelikli olarak kullanılacak kör ve örnek sayısını hesaba katarak en az 5 mL hacme sahip olan deney tüpleri ayarlanır. Bu çalışmada her örneğin doku homojenatları (10 µL homojenat +90 µL dH₂O) şeklinde 10 kat seyreltilir. Örneğin çalışmada kullanılan örnek sayısı 4 ise 1'i kör diğer 4'ü örnek olan numunelere şu prosedür uygulanarak protein tayini yapılır.

Kör : 4900 μL commessie Blu boyası + 100 μL dH₂O

Örnekler : 4900 μL commessie Blue boyası + 90 μL dH₂O + 10 μL süpernatant

Kullanılarak son hacim 5000 μL (5 mL) olacak şekilde ayarlanarak en az 10 dakika inkübasyona bırakılır.

Daha sonra boya ve protein bağlanmalarının tam olarak gerçekleşerek oluşan kapalı mavi rengin sabitlenmesi için numuneler laboratuvar şartlarında en az 10 dk inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında numunelerin köre karşı absorbansları 595 nm'de ölçüldü.

Çizelge 3.5. Bradford (Commassie Blue) protein tayinini metodunda uygulanan prosedürü gösteren bir örnek

Kimyasallar	Kör	Örnek 1	Örnek 2	Örnek 3	Örnek 4	
dH ₂ O	100 μL	90 μL	90 μL	90 μL	90 μL	← 10 kat seyreltme
Süpernatant	-	10 μL	10 μL	10 μL	10 μL	
	↓	↓	↓	↓	↓	
Commassie Blue boyası	4900 μL	4900 μL	4900 μL	4900 μL	4900 μL	
Toplam Hacim	5000 μL	5000 μL	5000 μL	5000 μL	5000 μL	

3.7.2. Western blot

Blotlama teknikleri ile, elektriksel ortamda jel üzerinde göç ettirilen ve fraksiyonlarına ayrılan protein veya nükleik asitlerin (DNA ve RNA) bir destek tabakaya aktarıldıktan sonra göreceli olarak miktarının belirlenmesidir. Protein blotlama tekniği olan Western Blot ile örneklerden elde edilen protein homojenatındaki proteinlerin, SDS-PAGE jel elektroforezi ile molekül ağırlığıyla orantılı olarak, artı kutba (anot) doğru göç ettirilerek ayrılmasını takip eden dört basamakla tanımlanır (Budak vd 2016).

- SDS jelinde molekül ağırlıklarına göre ayrılmış proteinlerin polyvinylidene difluoride (PVDF) membrana transferi olan blotlama basamağı,
- Bloklama basamağında, spesifik olmayan bağlanmaları engellemek için PVDF membranda blotlama sonrası protein bağlanmayan bölgelerin ilgisiz proteinlerle kaplanması,
- Spesifik antikorlarla inkübasyon basamağı,
- Proteinlerin görüntülenme basamağı (Budak vd 2016).

3.7.2.a. Fare karaciğer dokusundan total proteinin ekstrakte edilmesi

- Boynu kırılarak sakrifiye edilen farenin karın boşlukları longitudinal abdominal insizyon ile açılarak karaciğer dokusu alınır. Protein homojenatı daha sonra hazırlanacak ise doku -86°C'de muhafaza edildi.
- Fare karaciğer dokusunun ağırlığının 5 katı hacminde RIPA buffer ilave edilir (örn; 50 mg karaciğer dokusuna 250 µL RIPA buffer eklenir) ve doku, tercihe göre BeadBug™ 1.5 veya 3.0 mm boyutundaki zirkonyum 'beads' adı verilen bilyeler yardımıyla homojen bir karışım elde edilene kadar BeadBlaster™ homojenizatörde 4260 rpm'de, 4 dakika parçalandı.
- Homojenat daha sonra 10,000 rpm, 4°C'de 30 dakika bir kez santrifüjlendikten sonra süpernatant alındı.
- Süpernatant alikuatlara ayrılıp -20°C'de kullanılabilecek kadar muhafaza edildi.

*100 ml RIPA tamponuna, 1/50 oranında β-merkapt etanol ve 1 tablet proteaz inhibitörü ve 1/50 oranında fosfataz inhibitörü ilave edilerek kullanıldı (Budak vd 2016).

3.7.2.b. SDS jelinin hazırlanması ve yüklenmesi

Deneyin amacına göre hangi yüzdellik jeli hazırlamamız gerektiği belirlendikten sonra SDS jel hazırlandı. SDS jeli iki kısımdan oluşmaktadır; Ayırma jeli (Çizelge 3.5) ve Yükleme jeli (Çizelge 3.6). Proteinler yüklenmeden önce konsantrasyonları Bradford

yöntemi ile ölçüldü. 10-100 µg proteine 1xSDS yükleme tamponu ilave edilip 95°C'lik ısıtma blokunda 10 dakika inkübe edildikten sonra proteinler 10 dakika da buz içerisinde bekletildi. Denatüre edilen örnekler yükleme jeline yüklendikten sonra 50 Voltta, 30 dakika SDS jel elektroforezinde yürütüldü. Numune, ayırma jeline geçmeye başladığında voltaj 120 Volta yükseltılarak 90 dakika daha yürütüldü (Budak vd 2016).

Çizelge 3.6. SDS jel elektroforezi için kullanılacak ayırma jeli değerleri

Jel Yüzdesi	%8	%9	%10	%12	%14
Didestile Su	6,9 mL	6,45 mL	5,9 mL	4,9 mL	3,9 mL
%30 Akrilamid-Bisakrilamid	4 mL	4,5 mL	5 mL	6 mL	7 mL
1,5M Tris pH:8,8	3,8 mL	3,8 mL	3,8 mL	3,8 mL	3,8 mL
%10 SDS	0,15 mL	0,15 mL	0,15 mL	0,15 mL	0,15 mL
%10 Amonyum persülfat (APS)	0,15 mL	0,15 mL	0,15 mL	0,15 mL	0,15 mL
TEMED	0,009 mL	0,075 mL	0,006 mL	0,006 mL	0,006 mL
Toplam	15 mL	15 mL	15 mL	15 mL	15 mL

Çizelge 3.7. SDS jel elektroforezi için kullanılacak yükleme jeli değerleri

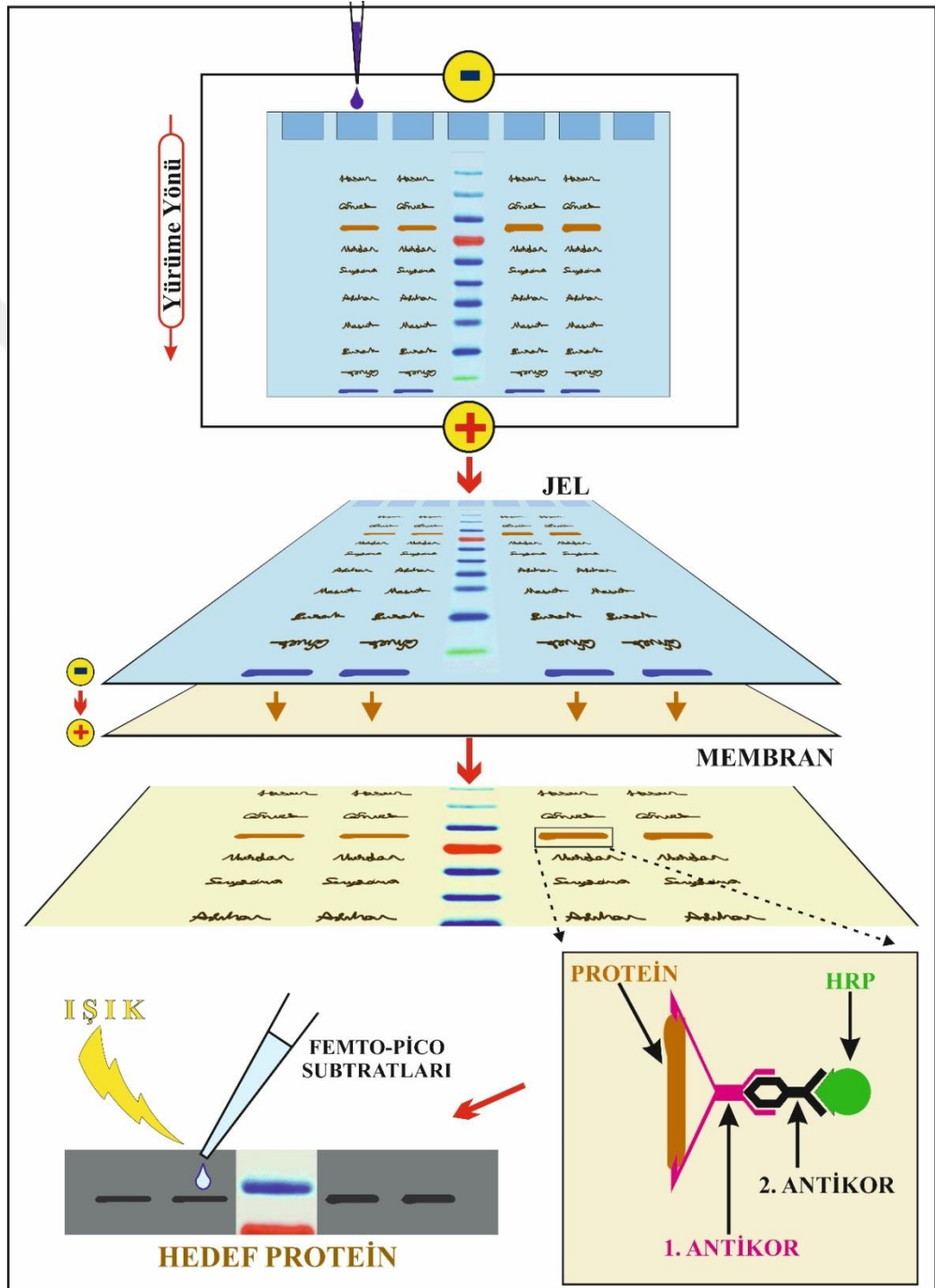
Toplam	1 mL	2 mL	3 mL	4 mL	5 mL
Didestile Su	0,68 mL	1,4 mL	2,1 mL	2,7 mL	3,4 mL
%30 Akril Amid	0,17 mL	0,33 mL	0,5 mL	0,67 mL	0,83 mL
1M Tris pH:6,8	0,13 mL	0,25 mL	0,38 mL	0,5 mL	0,63 mL
%10 SDS	0,01 mL	0,02 mL	0,03 mL	0,04 mL	0,05 mL
%10 Amonyum persülfat (APS)	0,01 mL	0,02 mL	0,03 mL	0,04 mL	0,05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

3.7.2.c. Jeldeki proteinin membrana transferi (blotlama), bloklama ve görüntüleme basamağı

SDS jeli üzerinde molekül ağırlığına göre ayrılan proteinlerin PVDF membrana transferi için Semidry Blotter cihazı kullanıldı. Bundan sonraki basamağın işleyişi aşağıda maddeler halinde verilmiştir.

- Membranlar kullanılmadan önce metanol ile 5 dakika muamele edildikten sonra 1X Transfer Buffer ile 5 dakika muamele edildi.
- Semidry Blotter cihazına sıra ile 1 parça ped, 2 parça blot kağıdı, PVDF membran, jel, 2 parça blot kağıdı, 1 parça ped konuldu. 1 watt elektriksel alanda 75 dakika blotlama işlemi yapıldı.
- Membran 10 dakika TBST ile yıkandı.
- 1 saat oda sıcaklığında bloklama çözeltisi (%5 Skim Milk Powder veya %5 Bovine Serum Albumin) ile muamele edildi.
- 4°C'de 1 gece birinci antikor (Çizelge 3.8) ile inkübasyona bırakıldı.
- İnkübasyon sonrası membran 5 kez 5 dakika TBST ile yıkandı.
- Oda sıcaklığında 1 saat HRP konjüge edilmiş ikinci antikor ile muamele edildi.
- Membran 5 kez 5 dakika TBST ile yıkandı ve görüntüleme basamağına geçildi.
- Femto ve Pico substratları (ECL reagent) kullanılarak antikorun kimyasal sinyal oluşturması sağlandı.
- Membranın görüntüsü Vilber Lourmat cihazı ile kemilüminesans olarak çekildi (Budak vd 2016).
- Western blot analizi sonucu hedef proteinler için gözlemlenen kemilüminesans sinyallerin yoğunluğu ve β -Aktin housekeeping proteininin sinyal yoğunluğu ImageJ software programı ile ölçüldü. β -Aktin housekeeping proteinine karşı normalize edildi. Deney sonuçlarının istatistiki değerlendirilmesi için GraphPad Prism version 5.00 (GraphPad Software, San Diego California USA) istatistik programı ile Unpaired t- testi yapılarak p değerleri belirlendi. $p>0,05$ =ns (not significant) önemsiz, $p<0,05$ =* (significant) önemli, $p<0,01$ ** (very significant) çok önemli, $p<0,001$ *** (highly significant) çok önemli.

significant) yüksek derecede önemli olarak değerlendirildi. Her grup için 3 adet fare (n=3) kullanıldı ve deneyler 3'er kez tekrarlandı.



Şekil 3.17. Western blot tekniğinin şematik ifadesi (Budak vd 2016)

Çizelge 3.8. Western blot çalışması için kullanılacak primer antikorlara ait bilgiler

Şirket-Kod	Primer Antikor	Jel Yüzdesi	Bloklama Solüsyonu	Bloklama Süresi	Seyreltme Oranı	Antikor ile İnkübasyon süresi	Protein Büyüklüğü
Santa Cruz sc-1265	IL-6 Antikoru	% 16	%5 Milk Powder	Oda sıcaklığında 1 saat	1:500	+4°C'de 1 gece	21-28 kDa
Abcam ab109555	IL-1 α Antikoru	% 16	%5 Milk Powder	Oda sıcaklığında 1,5 saat	1:500	+4°C'de 1 gece	17-33 kDa
Santa Cruz sc-101716	p-JAK1 Antikoru (Tyr 1022)	% 10	%5 BSA	Oda sıcaklığında 1 saat	1:500	+4°C'de 1 gece	130 kDa
Cell Signaling Technology 9145S	p-STAT3 Antikoru (Tyr 705)	% 12	%5 BSA	Oda sıcaklığında 1 saat	1:1000	+4°C'de 1 gece	79-86 kDa
Santa Cruz sc-240553	HAMP/HAMP2 Antikoru	% 16	%5 Milk Powder	Oda sıcaklığında 1,5 saat	1:300	+4°C'de 1 gece	9 kDa
Santa Cruz sc-47778	β -Aktin Antikoru	% 10 % 12 % 16	%5 Milk Powder veya BSA	Oda sıcaklığında 1 saat	1:1000	+4°C'de 1 gece	43 kDa

Çizelge 3.9. Western blot çalışması için kullanılacak sekonder antikorlara ait bilgiler

Şirket-Kod	İkincil Antikor (Secondary Antibody)	Seyreltme Oranı	Antikorlar ile İnkübasyon süresi
Santa Cruz sc-3838	Goat anti Rabbit	1:10000	Oda sıcaklığında 1 saat
Santa Cruz sc-2005	Rabbit anti Mouse	1:10000	Oda sıcaklığında 1 saat
Santa Cruz sc-2768	Rabbit anti Goat	1:10000	Oda sıcaklığında 1 saat

3.7.3. Antikor ile doku boyaması (immünohistokimya)

İmmünohistokimya; hücre ve doku içinde bulunan bazı enzimlerin ya da makromoleküllerin lokalizasyonlarını incelemeye yardımcı olur. İncelenecek olan bir makromeleküle karşı geliştirilmiş olan bir antikorun ortaya konulması prensibine dayanır. Dokuda saptanmaya çalışılan protein, antijendir fakat bu proteinin saptanması

için yararlanılan protein ise antikordur. İşaretlenmeye çalışılan proteinin tam olarak dokunun neresinde olduğunu gösterebilen avantajlı bir yöntemdir. Belirli antijenler içeren doku kesiti, bu antijenlere karşı işaretlenmiş antikolar içeren bir solüsyonda inkübe edildiği zaman, antikolar spesifik olarak antijenlere bağlanır. Böylece antijen-antikor komplekslerinin yerleşimleri ya ışık (immünohistokimya) ya da elektron mikroskopla (ultrastrüktürel immunositokimya) gözlenebilir.

3.7.3.a. Dokuların fikse edilmesi, parafin içerisinde gömülmesi ve doku kesitlerinin hazırlanması

İnflamasyon oluşturulan farelerden ve kontrol gruplarından histopatolojik inceleme için karaciğer dokular alındı ve içerisinde %10'luk formalin bulunan 15 mL'lik falkon tüplere konuldu. Histopatolojik işlemlerin yapılması için Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji ABD laboratuvarına getirildi. Laboratuarda 48 saat boyunca oda sıcaklığında %10'luk formalin içerisinde bekletildi. Daha sonra makroskopi laboratuvarında makroskopik kesitler alındı, doku takip kasetlerine konuldu ve doku takibi yapılmak üzere Thermo Excelsor ES marka doku takip cihazına yerleştirildi. Cihazda sırası ile aşağıdaki işlemler gerçekleştirildi;

- %10'luk formalin 30 dakika (2 kez)
- Absolut alkol 60 dakika (6 kez)
- Ksilol 60 dakika (3 kez)
- Parafin 80 dakika (3 kez)

Doku takip işlemi biten dokular Leica EG 1160 marka doku bloklama cihazında parafin bloklara gömüldü ve donması için -20°C'de 15 dakika bekletildi. Bloklar kullanılıncaya kadar oda sıcaklığında saklandı. Kesite hazır hale gelen parafin bloklardan Leica RM 2245 marka mikrotom ile 5µm kalınlığında kesitler lamlara alınarak 72°C'deki etüve konuldu ve 15 dakika bekletildi.

3.7.4. İmmünohistokimyasal çalışma prosedürü

5µm kalınlığında kesitler etüvden çıkarıldıktan sonra 15 dakika bekletilip lamalar Roche marka Ventana otomatik immünohistokimya cihazına yerleştirildi. Cihaz tarafından aşağıdaki işlemler sırasıyla gerçekleştirildi:

- 15 dakika 72°C'de deparafinizasyon (EZ Prep solüsyonu içerisinde) işlemi gerçekleştirildi.
- 15 dakika dehidratasyon (EZ Prep solüsyonu içerisinde) işlemi gerçekleştirildi.
- Yıkama solüsyonunda (reaction buffer) 3 dakika yıkandı.
- Antijen Retrieval basamağında sitrat buffer (pH=6) ile 90°C'de 44 dakika kaynatma yapıldı.
- Yıkama solüsyonunda (reaction buffer) 3 dakika yıkandı.
- %3'lük Hidrojen peroksidad solüsyonunda 8 dakika bekletildi.
- Yıkama solüsyonunda (reaction buffer) 3 dakika yıkandı.
- Primer antikor damlatıldı ve 56 dk inkübe edildi (Çizelge 3.10).
- Yıkama solüsyonunda (reaction buffer) 3 dakika yıkandı.
- Ultra-view universal HRP multimer solüsyonu damlatıldı ve 8 dakika bekletildi.
- Yıkama solüsyonunda (reaction buffer) 3 dakika yıkandı.
- DAB+Kromojen damlatılır 5 dk bekletildi.
- Yıkama solüsyonunda (reaction buffer) 3 dakika yıkandı.
- Hematoksilende 5 dakika boyandı.
- Yıkama solüsyonunda (reaction buffer) 3 dakika yıkandı.
- %99.9'luk alkolde 2 dakika bekletildi.
- Ksilolde 2 dakika bekletildi.
- Lamlar Leica CV 5030 marka otomatik lam kapama cihazında entellan ile kapatılır ve ışık mikroskobunda değerlendirildi.

Çizelge 3.10. İmmünohistokimiyada kullanılan antikorlara ait bilgiler

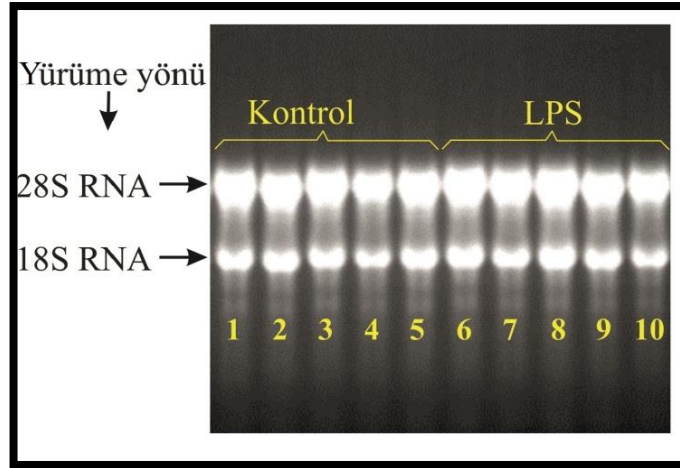
Şirket-Kod	Primer Antikor	Seyreltme Oranı
Santa Cruz sc-1265	IL-6 Antikoru	1:50
Abcam ab109555	IL-1 α Antikoru	1:100
Santa Cruz sc-101716	p-JAK1 Antikoru (Tyr 1022)	1:50
Abcam ab32101	p-JAK2 Antibody (Tyr 1007/Tyr 1008)	1:100
Cell Signaling Technology 9145S	p-STAT3 Antikoru (Tyr 705)	1:100
Santa Cruz sc-25378	TİP60 Antikoru	1:50

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

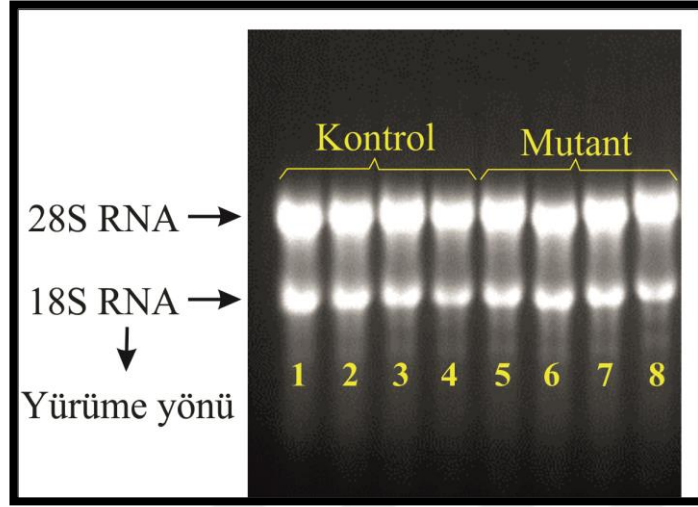
Bu çalışmada, kontrol ve karaciğer spesifik Tip60 mutant, kontrol ve inflamasyon oluşturulmuş fare karaciğer dokularında, Tip60 geninin inflamasyon yolağı (IL-6, IL-1, JAK1, JAK2, STAT3 VE HAMP) üzerine etkisi genomik ve proteomik seviyede araştırıldı.

4.1. Total RNA İzolasyon Sonucu

Tez kapsamında yapılan çalışmalarda alınan kontrol, LPS muamele ve mutant fare karaciğer dokularından total RNA izolasyonu, RNA izolasyon kiti (RNeasy Lipid Tissue Mini Kit-QIAGEN) ile yapıldı. Elde edilen total RNA örnekleri agaroz jelde yürütüldü ve görüntüleme cihazı (QUANTUM VILBER LOURMAT) ile fotoğraflandı (Şekil 1.23 ve Şekil 1.24).



Şekil 4.1. İnflamasyon ve kontrol grubu fare karaciğer dokularından izole edilen RNA'ların agaroz jel elektroforez görüntüsü



Şekil 4.2. Tip60 mutant ve kontrol grubu fare karaciğer dokularından izole edilen RNA'ların agaroz jel elektroforez görüntüsü

Şekil 4.1 ve şekil 4.2'de kontrol, LPS muamele ve mutant fare karaciğer dokularından izole edilen total RNA örneklerinin elektroforez yürütme sonucu görülmektedir. 28S ve 18S alt birim bantları ribozomal RNA bantlarından, 28S alt birimin molekül ağırlığı 18S alt birimden daha fazla olduğundan agaroz üzerinde daha yavaş yürüyerek alt birimler birbirinden ayrılır. 28S alt birim bandı daha yavaş yürütmesine rağmen bant kalınlığı ve parlaklığı 18S alt biriminin yaklaşık iki katıdır. Parlaklık ve kalınlık olarak bu 2:1 oranının netliği, yürütülen RNA örneklerinin degrade olmadan yürüdüğü anlamına gelir.

İzole edilen total RNA örneklerinin konsantrasyonları ve saflık dereceleri nanodrop cihazı ile spektrofotometrik olarak ölçüldü. İzole edilen RNA örneklerinin konsantrasyonları 260 nm dalga boyunda ölçüm yaparak, saflık dereceleri ise 260/280 oranı ile spektrofotometrik olarak belirlendi. Kontrol, LPS muamele ve mutant fare karaciğerlerinden izole edilen total RNA örneklerinin konsantrasyon ve saflık dereceleri aşağıda verilmiştir (Çizelge 4.1 ve Çizelge 4.2).

Çizelge 4.1. İnflamasyon ve kontrol grubu fare karaciğer dokularından izole edilen RNA'ların konsantrasyonları ve saflık dereceleri

GRUPLAR	RNA SAFLIK (A_{260}/A_{280})	RNA KONSTRASYON (ng/ μ l)
Kontrol 1	1,9999	2552,08
Kontrol 2	2,2377	1129,04
Kontrol 3	2,2268	1482,72
Kontrol 4	2,1052	1502,15
Kontrol 5	2,1400	1305,24
LPS 1	2,2442	1154,96
LPS 2	2,2327	1608,8
LPS 3	2,1797	2110,96
LPS 4	2,0118	2545,52
LPS 5	2,0815	1905,25

Çizelge 4.2. Tip60 mutant ve kontrol grubu fare karaciğer dokularından izole edilen RNA'ların konsantrasyonları ve saflık dereceleri

GRUPLAR	RNA SAFLIK (A_{260}/A_{280})	RNA KONSANTRASYON (ng/ μ l)
Kontrol 1	1,9375	2597,6800
Kontrol 2	2,2026	1545,8400
Kontrol 3	2,1877	1481,6800
Kontrol 4	2,1940	1502,9600
Tip60 Mutant 1	2,1926	1141,0400
Tip60 Mutant 2	2,1946	1797,4400
Tip60 Mutant 3	2,1888	904,2400
Tip60 Mutant 4	2,2077	1267,0400

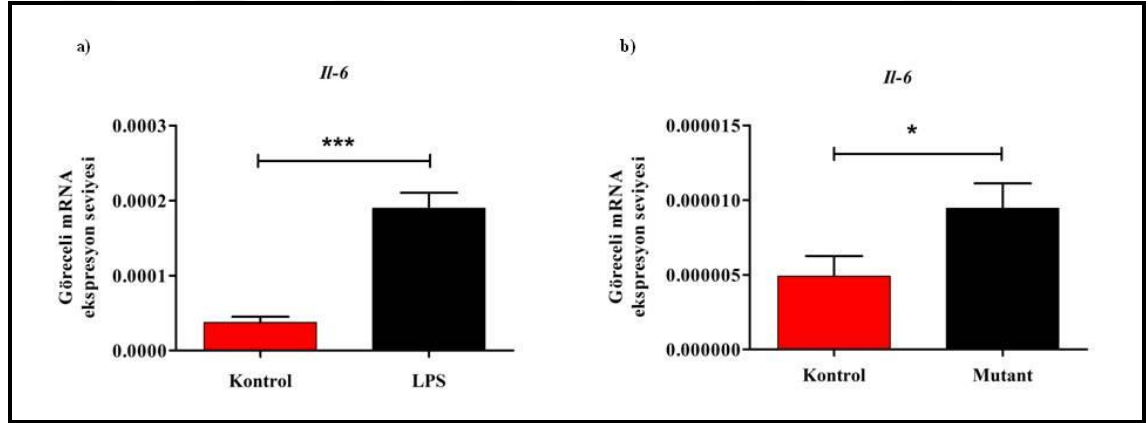
Elde edilen total RNA'lardan cDNA sentezi, BIO-RAD C1000TM Thermal Cycler cihazı yardımıyla cDNA sentez protokolüne göre gerçekleştirildi. Sentezlenen cDNA

örnekleri kullanılarak yapılacak Real Time PCR (qRT-PCR) uygulamasında daha güvenilir sonuçlar almak için cDNA'ların konsantrasyonları nanodrop cihazı (Thermo Scientific Multiskan GO) ile ölçülerek cDNA örneklerinin konsantrasyonları eşitlendi.

Real-Time PCR uygulamasında amplifiye olan gen, belirli bir konsantrasyona ulaştığında bir CT değeri ile ifade edilecektir. Kullanılan cDNA örneklerinin konsantrasyonlarının birbirinden farklı olması, cihazın farklı CT değerleri vermesine neden olacağından sonuçların güvenilirliğinin azalmasına sebep olur. Bu nedenle Real-Time PCR uygulamasına geçilmeden önce mutlaka kullanılacak cDNA örneklerinin konsantrasyonları eşitlenmelidir.

4.2. Real Time PCR Analiz Sonuçları

4.2.1. İnterlökin 6 (*Il-6*) geninin mRNA ekspresyonu

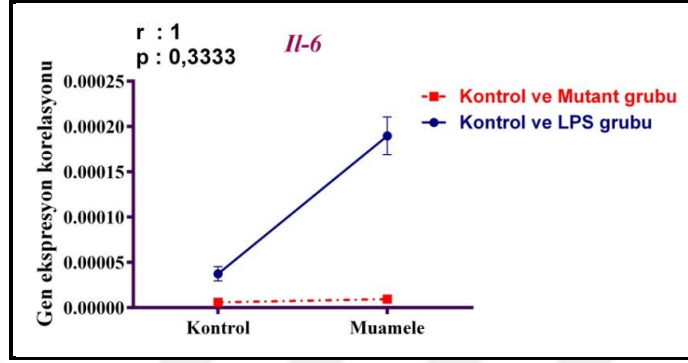


Şekil 4.3. Kontrol grupları, LPS muamele ve Tip60 mutant fare karaciğerinde *Il-6* geninin ekspresyon seviyesinin Real Time PCR ile belirlenmesi

*a) LPS muamele grubu, b) Tip60 mutant grubu

İnterlökin 6 (*Il-6*) geninin mRNA ekspresyon sonuçları incelendiğinde LPS muamele grubu farelerde kontrol grubuna göre artış gözlenmiştir ($p < 0,001$) (Şekil 4.3.a). İnflamasyon modeli için marker olan *Il-6* geninin artması, LPS muamele grubu farelerde inflamasyonun oluştuğunu göstermiştir. Karaciğer spesifik silinmiş Tip60

mutant farelerde *Il-6* geninin kontrol grubuna oranla önemli derecede arttığı gözlenmiştir ($p<0,05$) (Şekil 4.3.b).

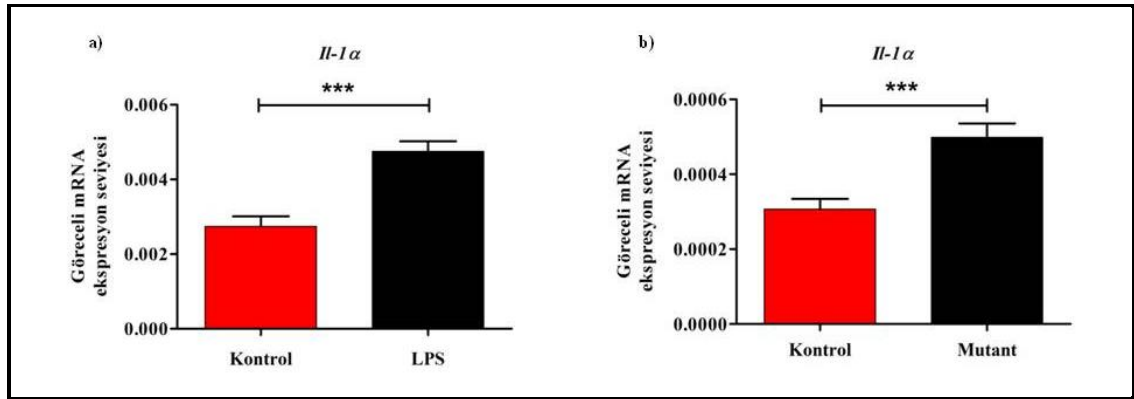


Şekil 4.4. LPS ve mutant grubu fare karaciğerinde *Il-6* geninin mRNA ekspresyonlarının LPS ve mutanta bağlı olarak karşılaştırılması

*Sonnular, istatistiksel olarak nonparametrik spearman korelasyon analizi yapılarak karşılaştırıldı ve korelasyon katsayısı (r) hesaplandı

LPS ve mutant grupları birbiriyle karşılaştırıldığında kontrol gruplarına göre her iki grupta da paralel bir artış gözlenmiştir (Şekil 4.4).

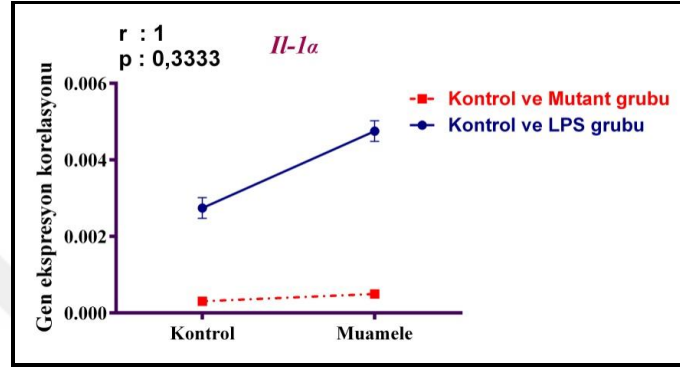
4.2.2. İnterlökin 1 alpha (*Il-1α*) mRNA ekspresyonu



Şekil 4.5. Kontrol grupları, LPS muamele ve Tip60 mutant fare karaciğerinde *Il-1α* geninin ekspresyon seviyesinin Real Time PCR ile belirlenmesi

*a) LPS muamele grubu, b) Tip60 mutant grubu

İnterlökin 1 alfa (*Il-1 α*) geninin Real Time PCR analiz sonucuna göre LPS muamele fare karaciğerinde kontrol grubuna oranla önemli bir artış gözlenmiştir ($p < 0,001$) (Şekil 4.5.a). Karaciğer spesifik silinmiş Tip60 mutant farelerde ise kontrol grubuna oranla önemli derecede arttığı gözlenmiştir ($p < 0,001$) (Şekil 4.5.b).

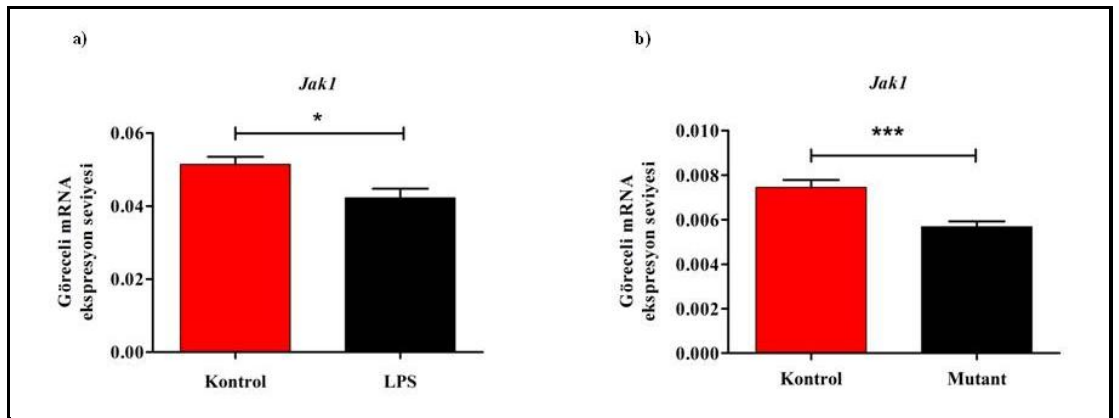


Şekil 4.6. LPS ve mutant grubu fare karaciğerinde *Il-1 α* geninin mRNA ekspresyonlarının LPS ve mutanta bağlı olarak karşılaştırılması

*Sonuçlar, istatistiksel olarak nonparametrik spearman korelasyon analizi yapılarak karşılaştırıldı ve korelasyon katsayısı (r) hesaplandı.

LPS ve mutant grupları birbiriyle karşılaştırıldığında kontrol gruplarına göre her iki grupta da paralel bir artış gözlenmiştir (Şekil 4.6).

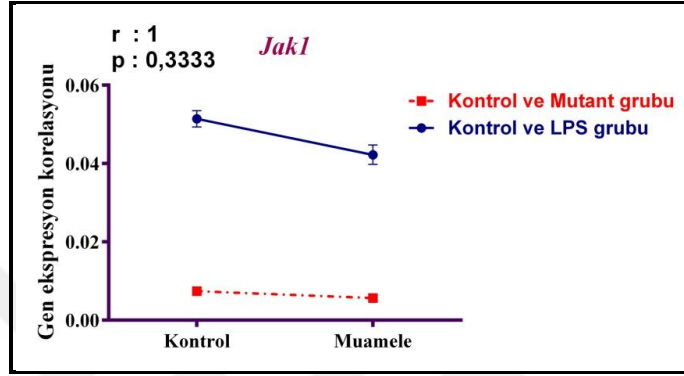
4.2.3. Janus kinaz 1 (*Jak1*) mRNA ekspresyonu



Şekil 4.7. Kontrol grupları, LPS muamele ve Tip60 mutant fare karaciğerinde *Jak1* geninin ekspresyon seviyesinin Real Time PCR ile belirlenmesi

a) LPS muamele grubu, b) Tip60 mutant grubu

Janus kinaz 1 (*Jak1*) geninin ekspresyon seviyesi LPS muamele fare gruplarında kontrol gruplarına göre önemli derecede azaldığı gözlenmiştir ($p < 0,05$) (Şekil 4.7.a). Tip60 mutant fare karaciğerinde ise kontrol grubu farelere göre önemli derecede azaldığı gözlenmiştir ($p < 0,001$) (Şekil 4.7.b).

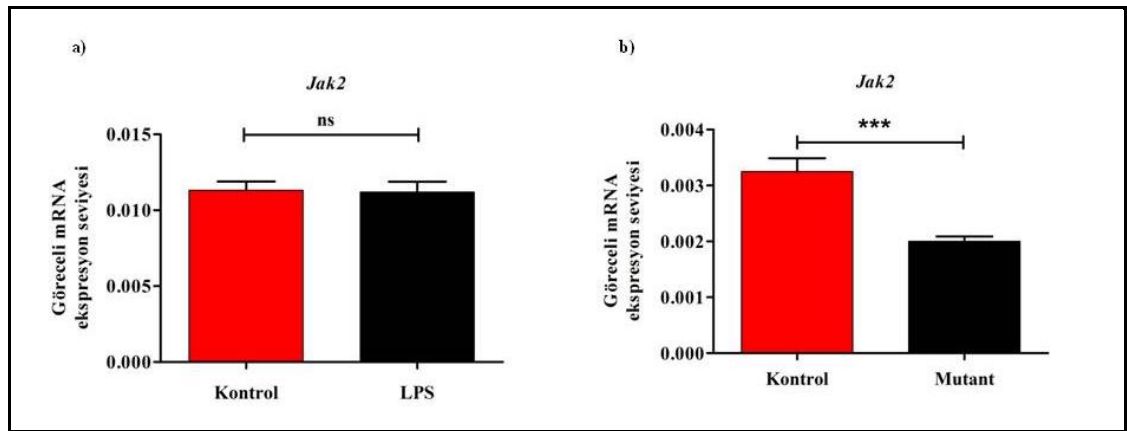


Şekil 4.8. LPS ve mutant grubu fare karaciğerinde *Jak1* geninin mRNA ekspresyonlarının LPS ve mutanta bağlı olarak karşılaştırılması

*Sonuçlar, istatistiksel olarak nonparametrik spearman korelasyon analizi yapılarak karşılaştırıldı ve korelasyon katsayısı (r) hesaplandı

LPS ve mutant grupları birbiriyle karşılaştırıldığında kontrol gruplarına göre her iki grupta da paralel bir azalış gözlenmiştir (Şekil 4.8).

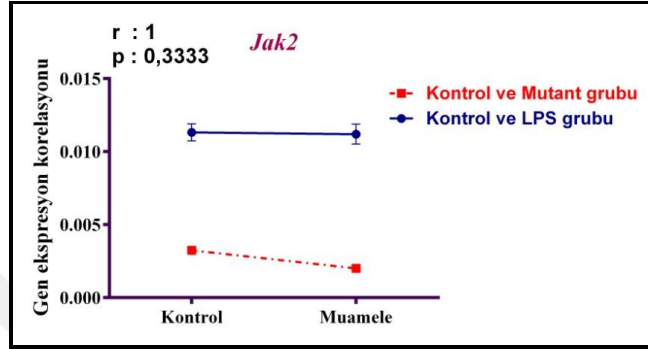
4.2.4. Janus kinaz 2 (*Jak2*) mRNA ekspresyonu



Şekil 4.9. Kontrol grupları, LPS muamele ve Tip60 mutant fare karaciğerinde *Jak2* geninin ekspresyon seviyesinin Real Time PCR ile belirlenmesi

*a) LPS muamele grubu, b) Tip60 mutant grubu

Janus kinaz 2 (*Jak2*) geninin ekspresyon seviyesi LPS muamele fare gruplarında kontrol gruplarına göre herhangi bir değişiklik gözlenmemiştir ($p>0,05$) (Şekil 4.9.a). Tip60 mutant fare karaciğerinde *Jak2* genine ait ekspresyon sonucunun kontrol grubu farelere göre önemli derecede azaldığı gözlenmiştir ($p<0,001$) (Şekil 4.9.b).

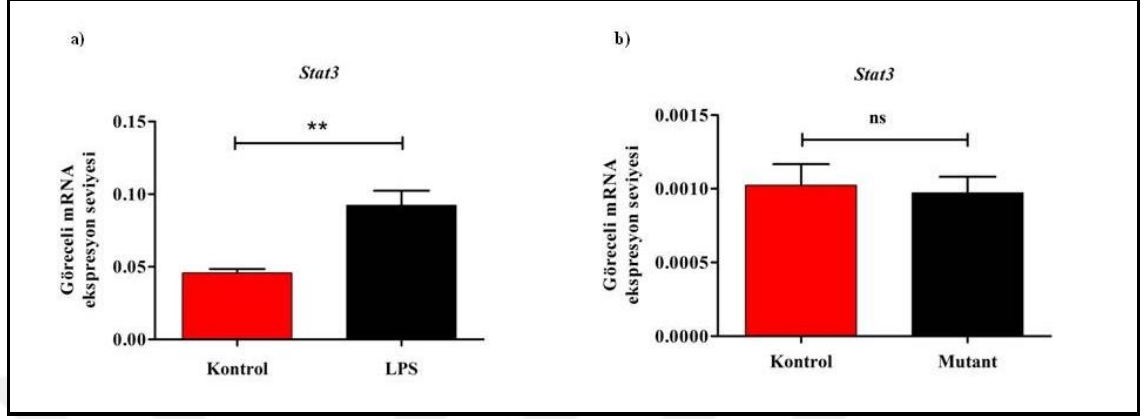


Şekil 4.10. LPS ve mutant grubu fare karaciğerinde *Jak2* geninin mRNA ekspresyonlarının LPS ve mutanta bağlı olarak karşılaştırılması

*Sonuçlar, istatistiksel olarak nonparametrik spearman korelasyon analizi yapılarak karşılaştırıldı ve korelasyon katsayısı (r) hesaplandı

LPS muamele grubunda herhangi bir değişikliğin meydana gelmemesi ve mutant grubunda azalmanın meydana gelmesi her iki grubun birbiriyle paralel bir durum sergilemediği göstermiştir (Şekil 4.10).

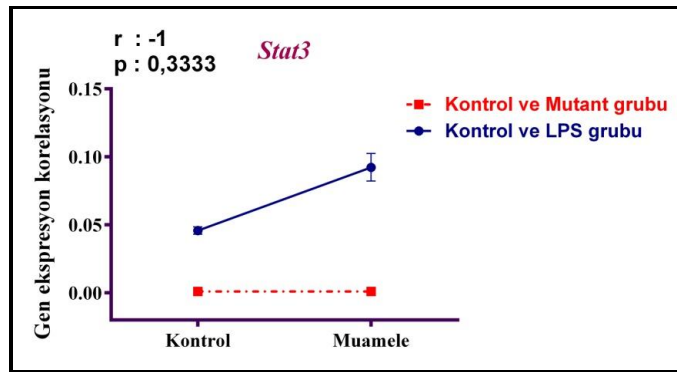
4.2.5. Sinyal ileticisi ve transkripsiyon aktivatörü 3 (*Stat3*) mRNA ekspresyonu



Şekil 4.11. Kontrol grupları, LPS muamele ve Tip60 mutant fare karaciğerinde *Stat3* geninin ekspresyon seviyesinin Real Time PCR ile belirlenmesi

*a) LPS muamele grubu, b) Tip60 mutant grubu

Sinyal ileticisi ve transkripsiyon aktivatörü 3 (*Stat3*) mRNA ekspresyonunun LPS muamele grubu farelerde kontrol grubuna oranla önemli derecede arttığı gözlenmiştir ($p < 0,01$) (Şekil 4.11.a). *Stat3* genine ait ekspresyon sonucuna göre karaciğer spesifik silinmiş Tip60 mutant fareler kontrol grubu ile kıyaslandığında herhangi bir değişiklik gözlenmemiştir ($p > 0,05$) (Şekil 4.11.b).

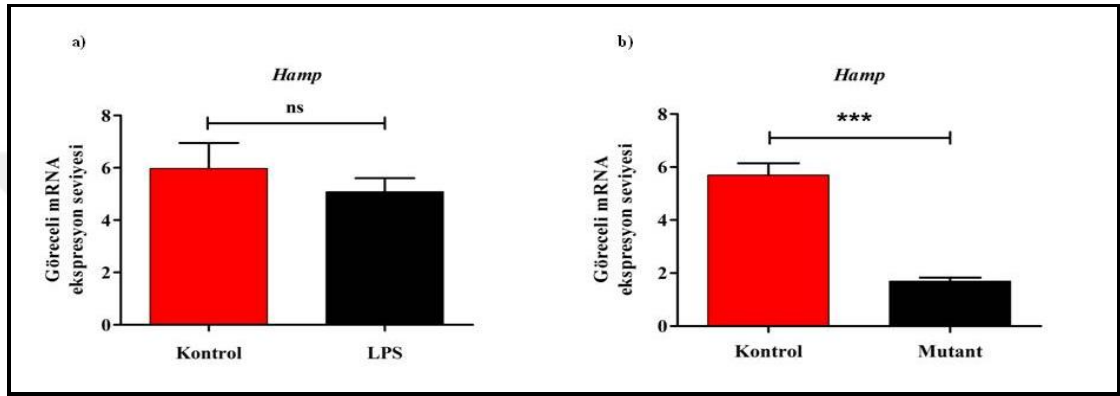


Şekil 4.12. LPS ve mutant grubu fare karaciğerinde *Stat3* geninin mRNA ekspresyonlarının LPS ve mutanta bağlı olarak karşılaştırılması

*Sonuçlar, istatistiksel olarak nonparametrik spearman korelasyon analizi yapılarak karşılaştırıldı ve korelasyon katsayısı (r) hesaplandı.

LPS muamele grubunda önemli bir artışın meydana gelmesi ve mutant grubunda ise değişikliğin olmaması her iki grubun birbiriyle paralel olmadığını göstermiştir (Şekil 4.12).

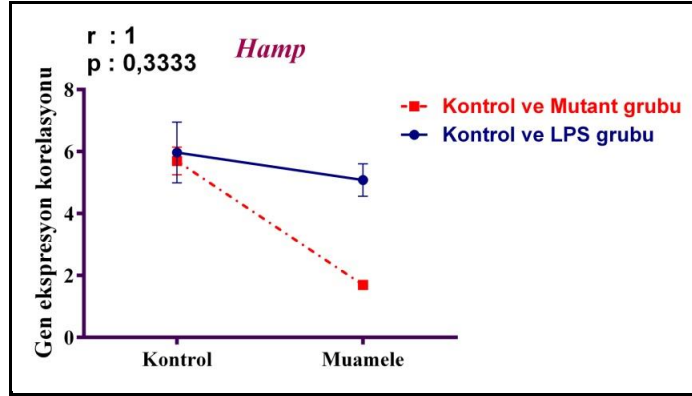
4.2.6. Hepsidin antimikrobiyal peptid (*Hamp*) mRNA ekspresyonu



Şekil 4.13. Kontrol grupları, LPS muamele ve Tip60 mutant fare karaciğerinde *Hamp* geninin ekspresyon seviyesinin Real Time PCR ile belirlenmesi

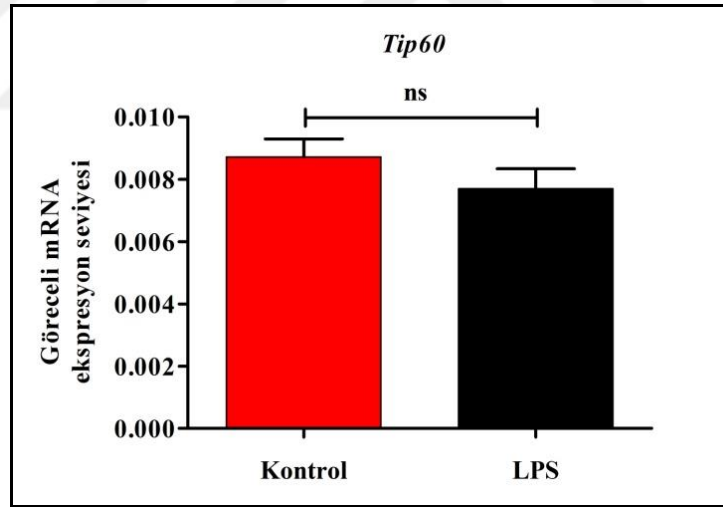
*a) LPS muamele grubu, b) Tip60 mutant grubu

Hepsidin antimikrobiyal peptid (*Hamp*) mRNA ekspresyonu kontrol grubu farelerle kıyaslandığında LPS muamele grubunda önemli bir değişiklik gözlenmemiştir ($p > 0,05$) (Şekil 4.13.a). *Hamp* genine ait ekspresyon sonucuna göre karaciğer spesifik silinmiş Tip60 mutant fareler, kontrol grubu ile kıyaslandığında önemli derecede bir azalış gözlenmiştir ($p < 0,001$) (Şekil 4.13.b).



Şekil 4.14. LPS ve mutant grubu fare karaciğerinde *Hamp* geninin mRNA ekspresyonlarının LPS ve mutanta bağlı olarak karşılaştırılması
*Sonuçlar, istatistiksel olarak nonparametrik spearman korelasyon analizi yapılarak karşılaştırıldı ve korelasyon katsayısı (r) hesaplandı

4.2.7. K (Lizin) asetiltransferaz 5 (*Kat5*)/(*Tip60*) mRNA ekspresyonu

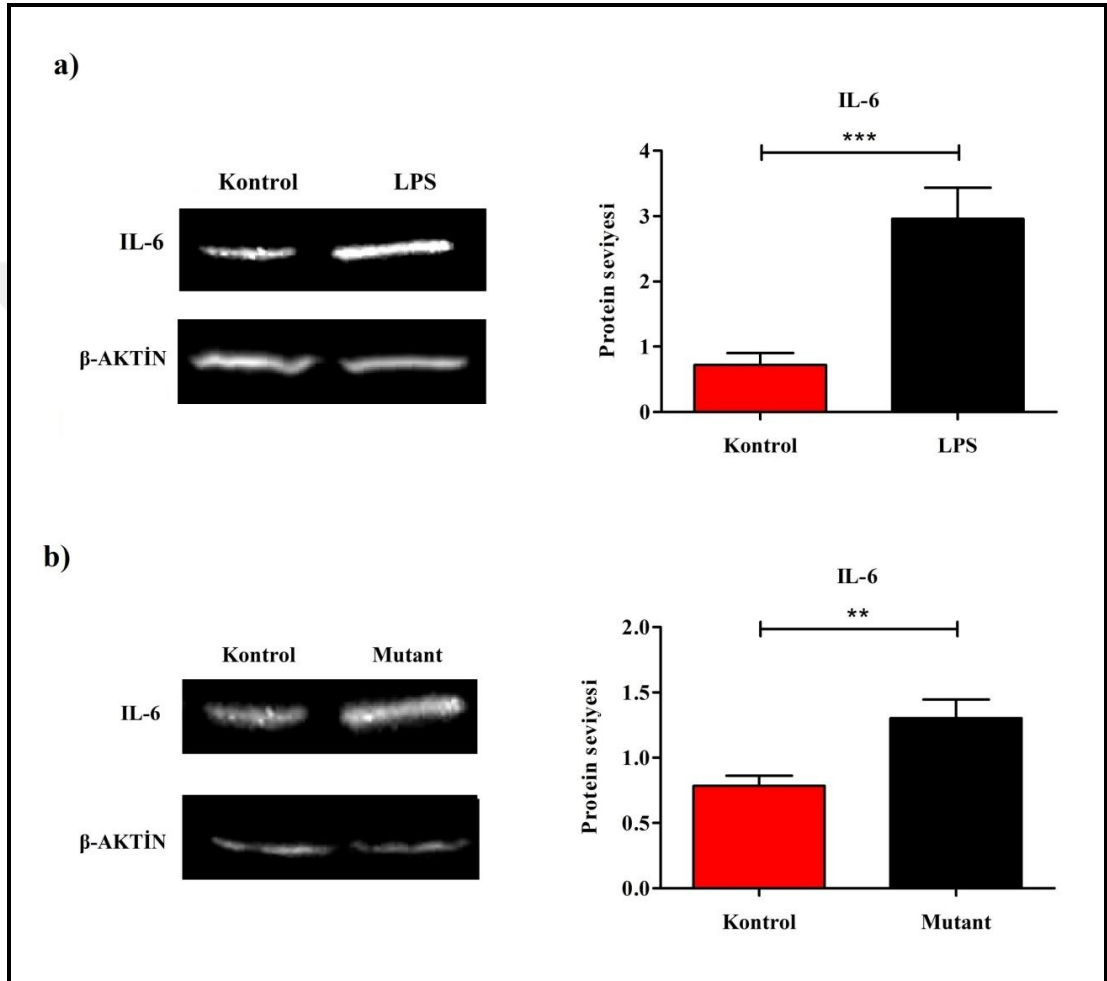


Şekil 4.15. Kontrol ve LPS muamele fare karaciğerinde *Tip60* (*Kat5*) geninin ekspresyon seviyesinin Real Time PCR ile belirlenmesi

K(lizin) asetiltransferaze 5 (*Kat5*) genine ait mRNA ekspresyon sonucuna göre LPS muamele grubu fareler, kontrol grubu ile kıyaslandığında önemli bir değişiklik gözlenmemiştir (Şekil 4.15).

4.3. Western Blot Analizi

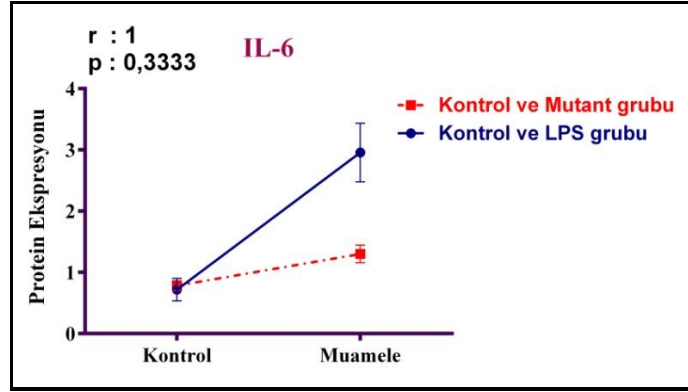
4.3.1. IL-6 proteinin western blot analizi



Şekil 4.16. Kontrol grupları, LPS muamele ve Tip60 mutant fare karaciğerinde inflamasyon yolağı proteinlerinden IL-6'nın kantitatif ekspresyon analiz sonuçları

*a) LPS muamele grubu, b) Tip60 mutant grubu

İnterlökin 6 (IL-6) kantitatif protein ekspresyonu, kontrol grubu farelerle kıyaslandığında LPS muamele grubunda önemli bir artış gözlenmiştir ($p < 0,001$) (Şekil 4.16a). Kontrol grubu farelerle kıyaslandığında karaciğer spesifik Tip60 mutant farelerde önemli bir artış gözlenmiştir ($p < 0,01$) (Şekil 4.16b).

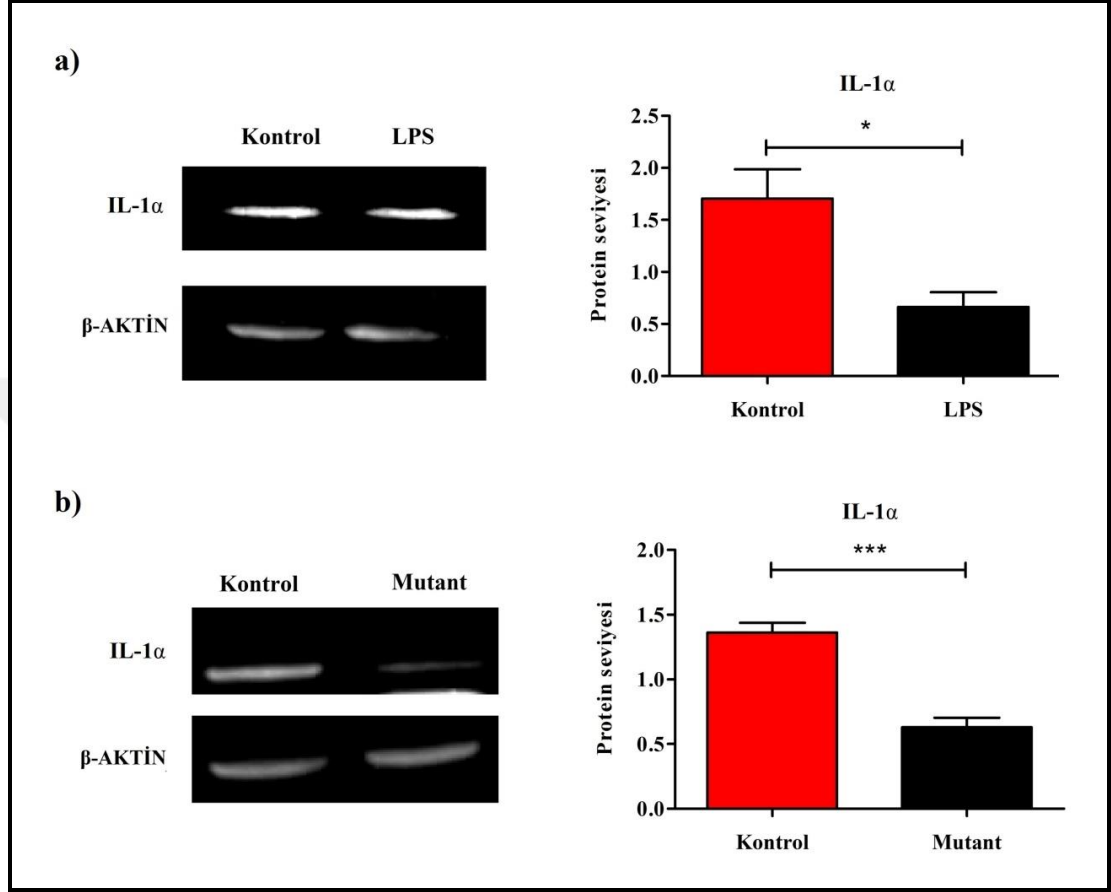


Şekil 4.17. LPS ve mutant grubu fare karaciğerinde IL-6 protein ekspresyonlarının LPS ve mutanta bağlı olarak karşılaştırılması

*Sonuçlar, istatistiksel olarak nonparametrik spearman korelasyon analizi yapılarak karşılaştırıldı ve korelasyon katsayısı (r) hesaplandı

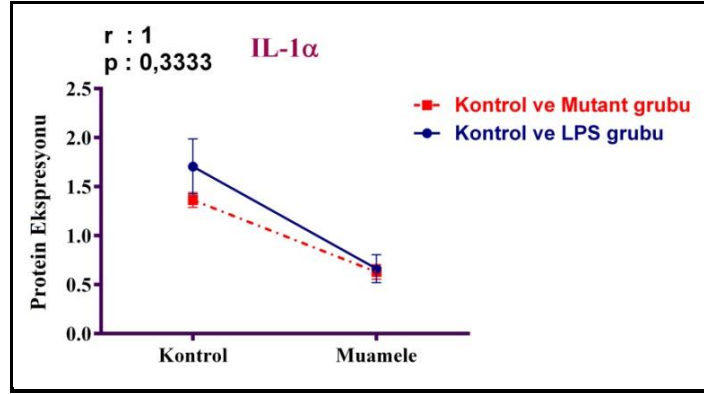
LPS ve mutant grupları birbiriyle karşılaştırıldığında kontrol gruplarına göre IL-6'nın protein ekspresyonu her iki grupta da paralel olarak artmıştır (Şekil 4.17).

4.3.2. IL-1 α proteinin western blot analizi



Şekil 4.18. Kontrol grupları, LPS muamele ve Tip60 mutant fare karaciğerinde inflamasyon yolağı proteinlerinden IL-1 α 'nın kantitatif ekspresyon analiz sonuçları
*a) LPS muamele grubu, b) Tip60 mutant grubu

İnterlökin 1 alfa (IL-1 α) kantitatif protein ekspresyonu, kontrol grubu farelerle kıyaslandığında LPS muamele grubunda önemli bir azalış gözlenmiştir (p < 0,05) (Şekil 4.18a). Kontrol grubu farelerle kıyaslandığında karaciğer spesifik Tip60 mutant farelerde ise önemli bir azalış gözlenmiştir (p < 0,001) b(Şekil 4.18b).

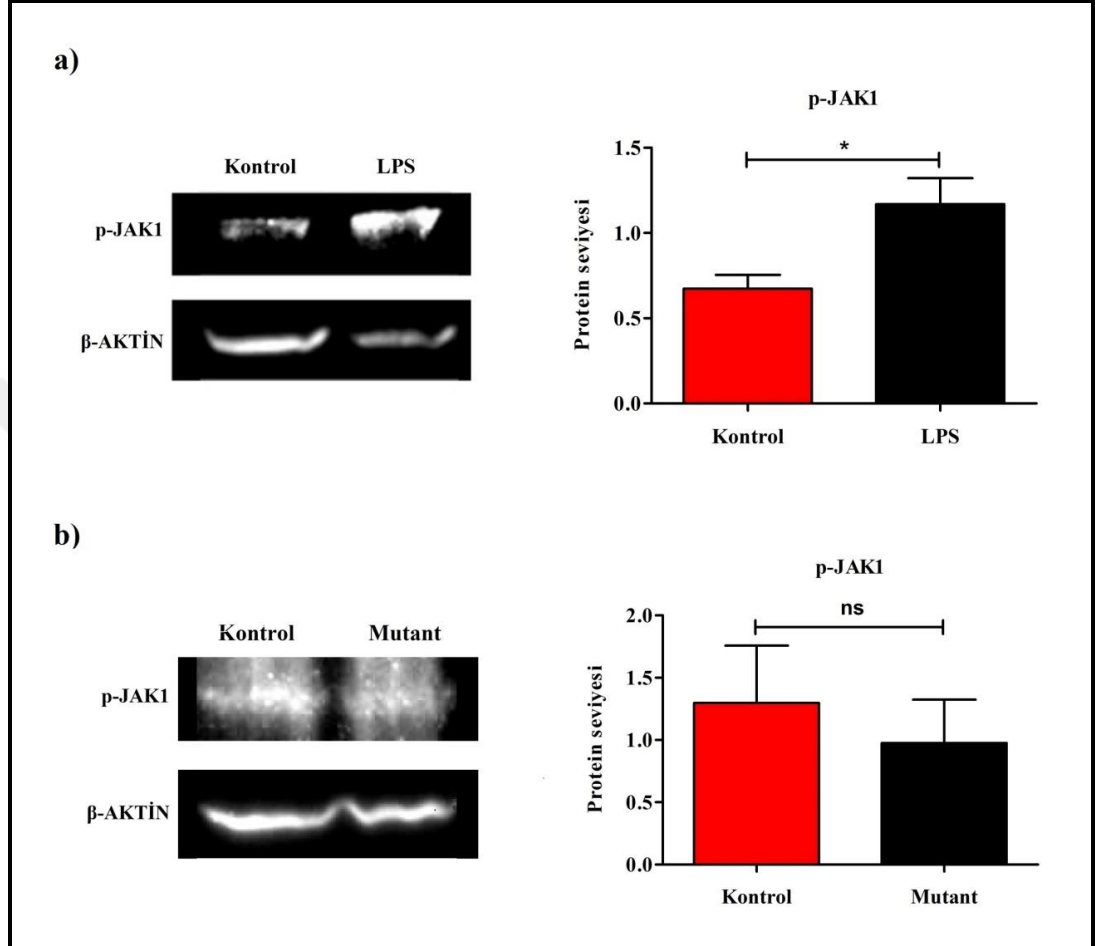


Şekil 4.19. LPS ve mutant grubu fare karaciğerinde IL-1 α protein ekspresyonlarının LPS ve mutanta bağlı olarak karşılaştırılması

*Sonuçlar, istatistiksel olarak nonparametrik spearman korelasyon analizi yapılarak karşılaştırıldı ve korelasyon katsayısı (r) hesaplandı

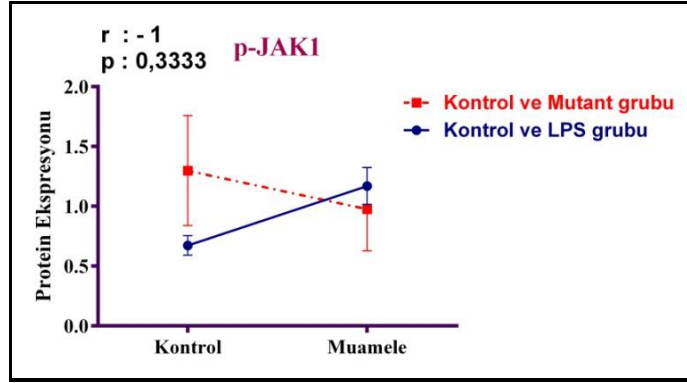
LPS ve mutant grupları birbiriyle karşılaştırıldığında kontrol gruplarına göre IL-1'nin protein ekspresyonu her iki grupta da paralel olarak azalmıştır (Şekil 4.19).

4.3.3. p-JAK1 proteinine ait western blot analizi



Şekil 4.20. Kontrol grupları, LPS muamele ve Tip60 mutant fare karaciğerinde inflamasyon yolağı proteinlerinden p-JAK1'in kantitatif ekspresyon analiz sonuçları
*a) LPS muamele grubu, b) Tip60 mutant grubu

Janus kinaz (p-JAK1) kantitatif protein ekspresyonu, kontrol grubu farelerle kıyaslandığında LPS muamele grubunda önemli bir artış gözlenmiştir ($p < 0,05$) (Şekil 4.20a). p-JAK1 kantitatif protein ekspresyonu, kontrol grubu farelerle kıyaslandığında karaciğer spesifik Tip60 mutant farelerde herhangi bir değişiklik olmadığı gözlenmiştir ($p > 0,05$) (Şekil 4.20b).

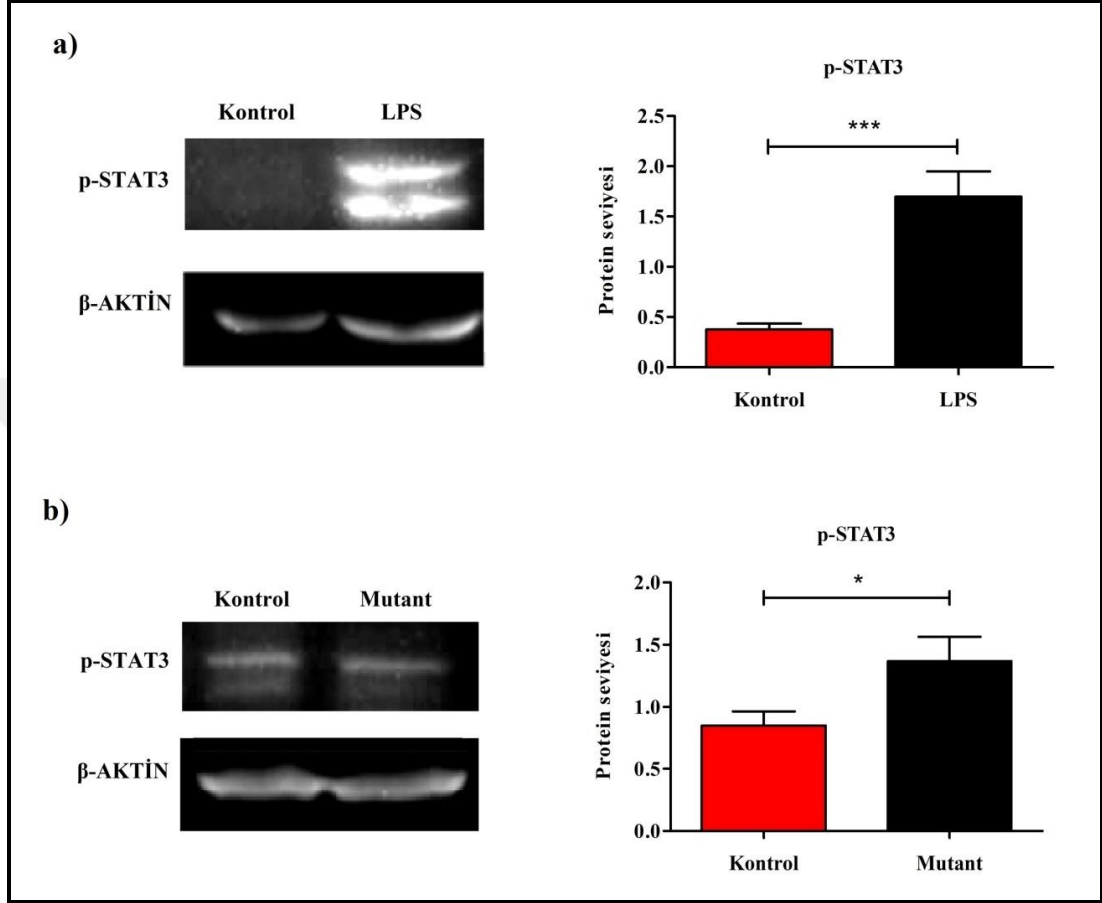


Şekil 4.21. LPS ve mutant grubu fare karaciğerinde p-JAK1 protein ekspresyonlarının LPS ve mutanta bağlı olarak karşılaştırılması

*Sonuçlar, istatistiksel olarak nonparametrik spearman korelasyon analizi yapılarak karşılaştırıldı ve korelasyon katsayısı (r) hesaplandı

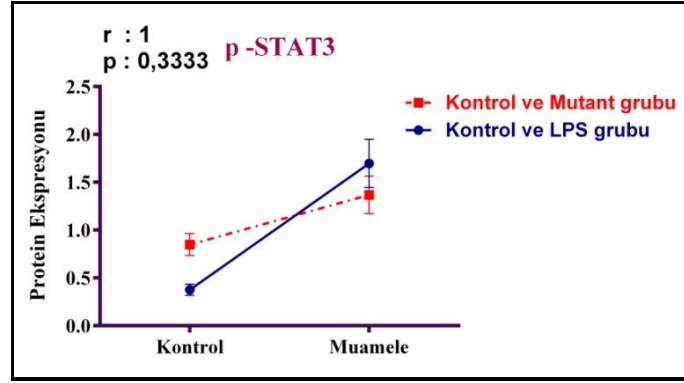
LPS ve mutant grupları birbiriyle karşılaştırıldığında kontrol gruplarına göre p-JAK1'in protein ekspresyon sonuçlarında antiparalellik gözlenmiştir (Şekil 4.21).

4.3.4. p-STAT3 proteinine ait western blot analizi



Şekil 4.22. Kontrol grupları, LPS muamele ve Tip60 mutant fare karaciğerinde inflamasyon yolağı proteinlerinden p-STAT3'ün kantitatif ekspresyon analiz sonuçları
*a) LPS muamele grubu, b) Tip60 mutant grubu

Sinyal ileticisi ve transkripsiyon aktivatörü 3 (p-STAT3) kantitatif protein ekspresyonu, kontrol grubu farelerle kıyaslandığında LPS muamele grubunda önemli bir artış gözlenmiştir ($p < 0,001$) (Şekil 4.22a). Kontrol grubu farelerle kıyaslandığında karaciğer spesifik Tip60 mutant farelerde ise önemli bir artış gözlenmiştir ($p < 0,05$) (Şekil 4.22b).

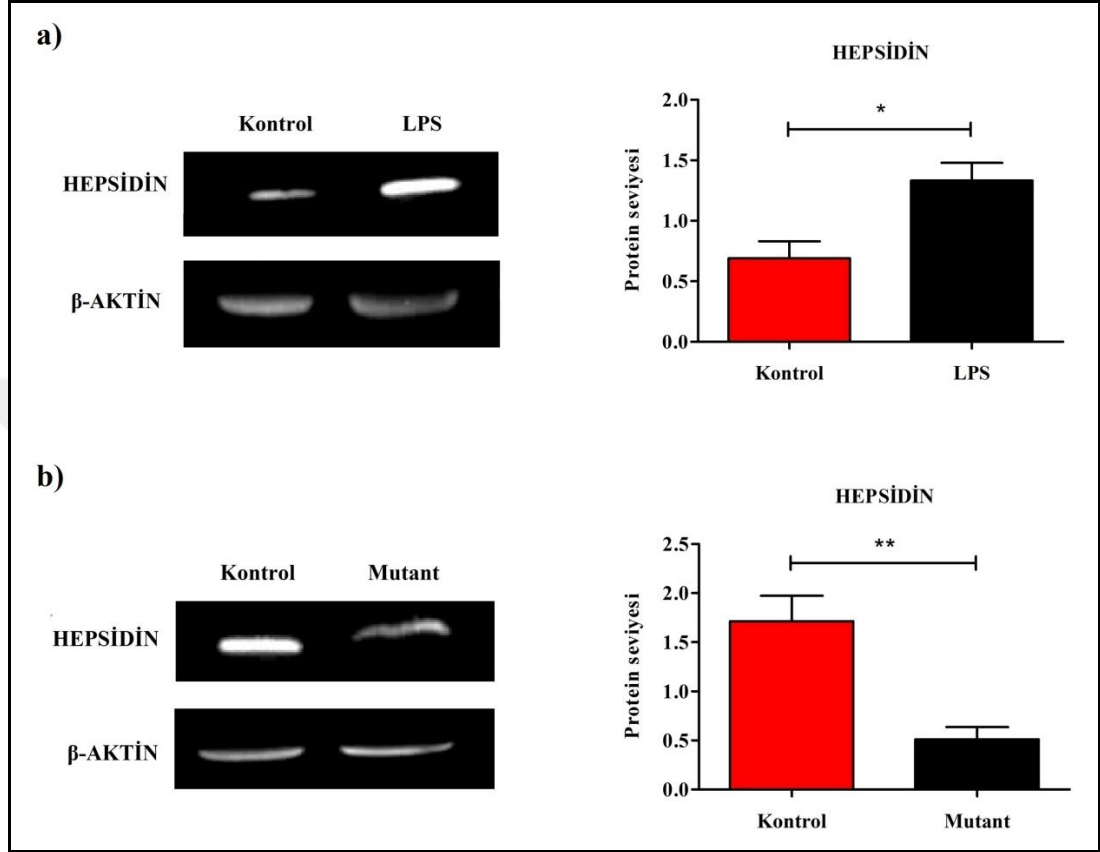


Şekil 4.23. LPS ve mutant grubu fare karaciğerinde p-STAT3 protein ekspresyonlarının LPS ve mutanta bağlı olarak karşılaştırılması

*Sonuçlar, istatistiksel olarak nonparametrik spearman korelasyon analizi yapılarak karşılaştırıldı ve korelasyon katsayısı (r) hesaplandı.

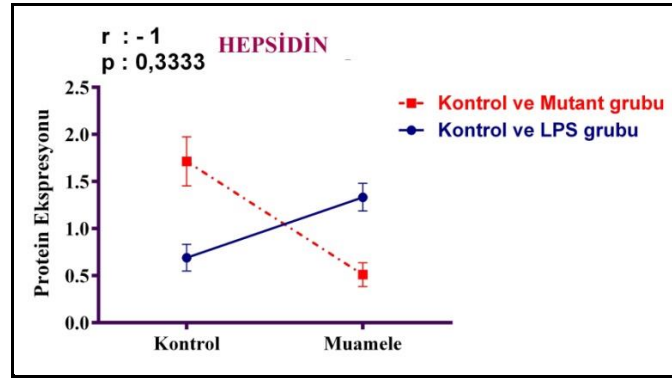
LPS ve mutant grupları birbiriyle karşılaştırıldığında kontrol gruplarına göre p-STAT3'ün protein ekspresyonu her iki grupta da paralel olarak artmıştır (Şekil 4.23).

4.3.5. Hepsidin proteinine ait western blot analizi



Şekil 4.24. Kontrol grupları, LPS muamele ve Tip60 mutant fare karaciğerinde inflamasyon yolağı proteinlerinden Hepsidin'in kantitatif ekspresyon analiz sonuçları
*a) LPS muamele grubu, b) Tip60 mutant grubu

Hepsidin kantitatif protein ekspresyonu, kontrol grubu farelerle kıyaslandığında LPS muamele grubunda önemli bir artış gözlenmiştir ($p < 0,05$) (Şekil 4.24a). Kontrol grubu farelerle kıyaslandığında karaciğer spesifik Tip60 mutant farelerde önemli derecede bir azalış gözlenmiştir ($p < 0,01$) (Şekil 4.24b).

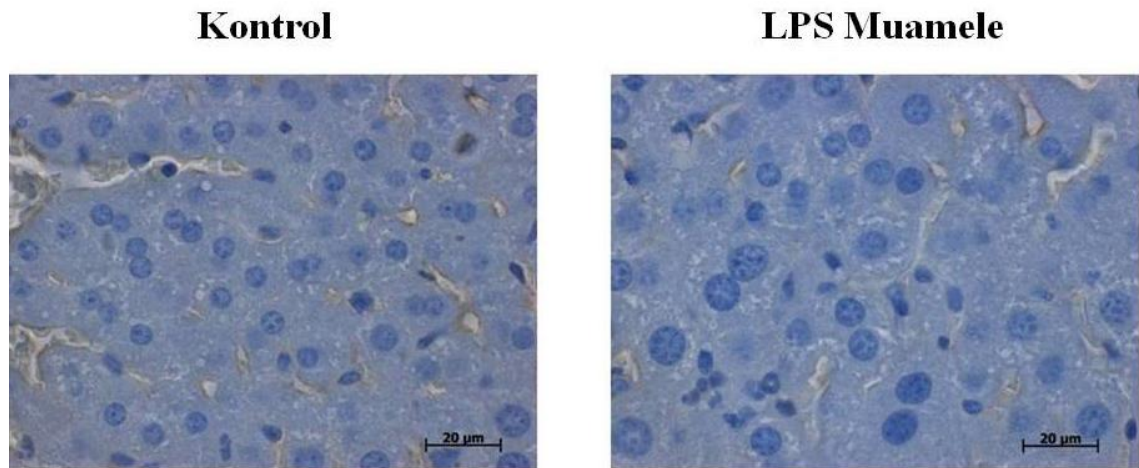


Şekil 4.25. LPS ve mutant grubu fare karaciğerinde Hepsidin protein ekspresyonlarının LPS ve mutanta bağlı olarak karşılaştırılması

*Sonuçlar, istatistiksel olarak nonparametrik spearman korelasyon analizi yapılarak karşılaştırıldı ve korelasyon katsayısı (r) hesaplandı

LPS ve mutant grupları birbiriyle karşılaştırıldığında kontrol gruplarına göre Hepsidin proteinin ekspresyonunda antiparalel bir sonuç gözlenmiştir, yani LPS grubundaki ekspresyon artarken mutant grubundaki ekspresyon azalmıştır (Şekil 4.25).

4.4. İmmünohistokimya Analizi

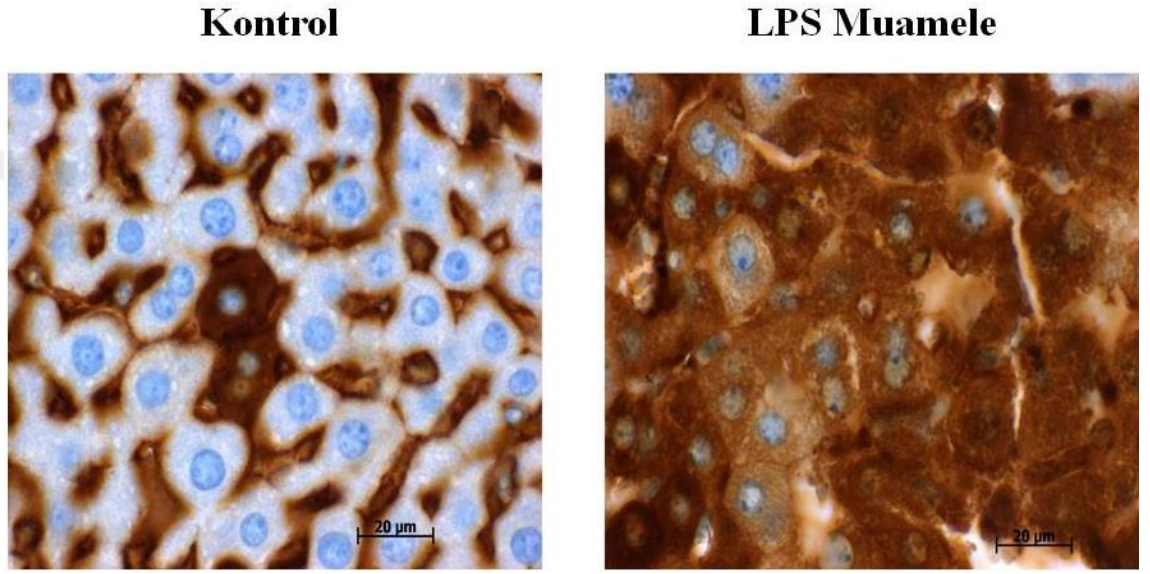


Şekil 4.26. Kontrol ve LPS muamele grubu fare karaciğer dokusundan hazırlanan 5 µm kalınlığında kesitler ile negatif kontrol olarak yapılan immünohistokimya sonuçları

Kontrol ve LPS muamele grubu fare karaciğer dokusundan alınan kesitlere negatif kontrol yapmak amacıyla antikor ile muamele edilmeden immünohistokimya analizi

yapıldı ve her iki grupta da herhangi bir sinyal gözlenmedi (Şekil 4.26). Bu durum immünohistokimya analizinde herhangi bir arkaplan (background) probleminin olmadığını göstermektedir.

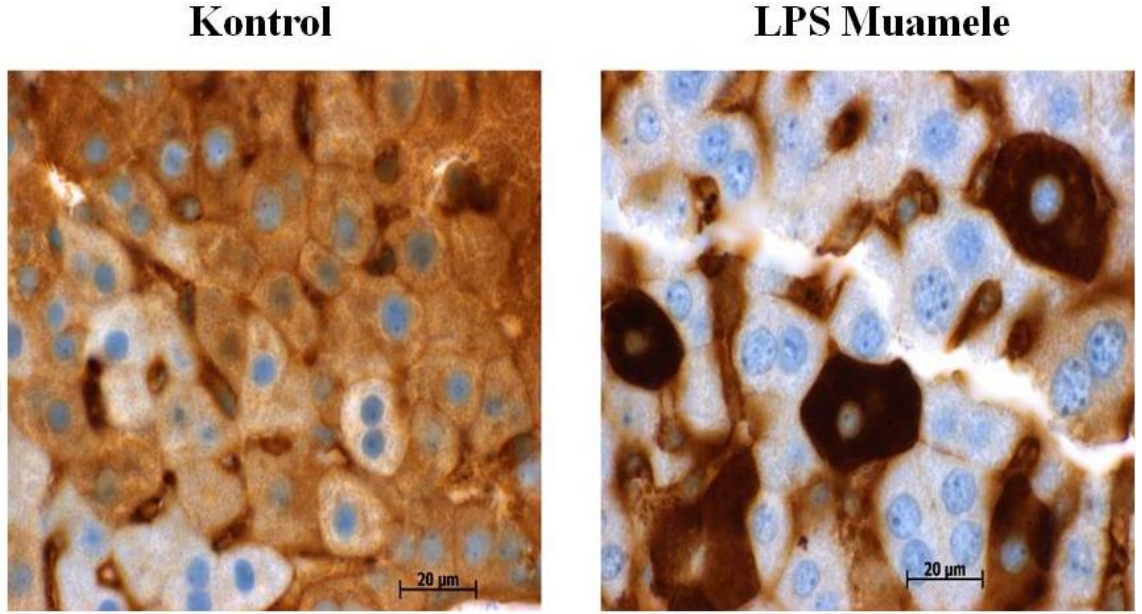
4.4.1. IL-6'nın immünohistokimya analizi



Şekil 4.27. Kontrol ve LPS muamele grubu fare karaciğer dokusundan hazırlanan 5 µm kalınlığında kesitler ile IL-6 proteini için yapılan immünohistokimya sonuçları

İnflamasyon yolağındaki proteinlerden olan ve ekspresyonunun artışı inflamasyon markırı olarak kabul edilen IL-6'nın ekspresyonu LPS muamele grubunda önemli derecede arttığı immünohistokimya yöntemiyle gösterildi (Şekil 4.27). Bu sonuç western blot analizi ile elde edilen sonuç ile paralellik göstermektedir. Ayrıca IL-6 proteininin sadece sitoplazmada lokalize olduğu net bir şekilde görülmektedir.

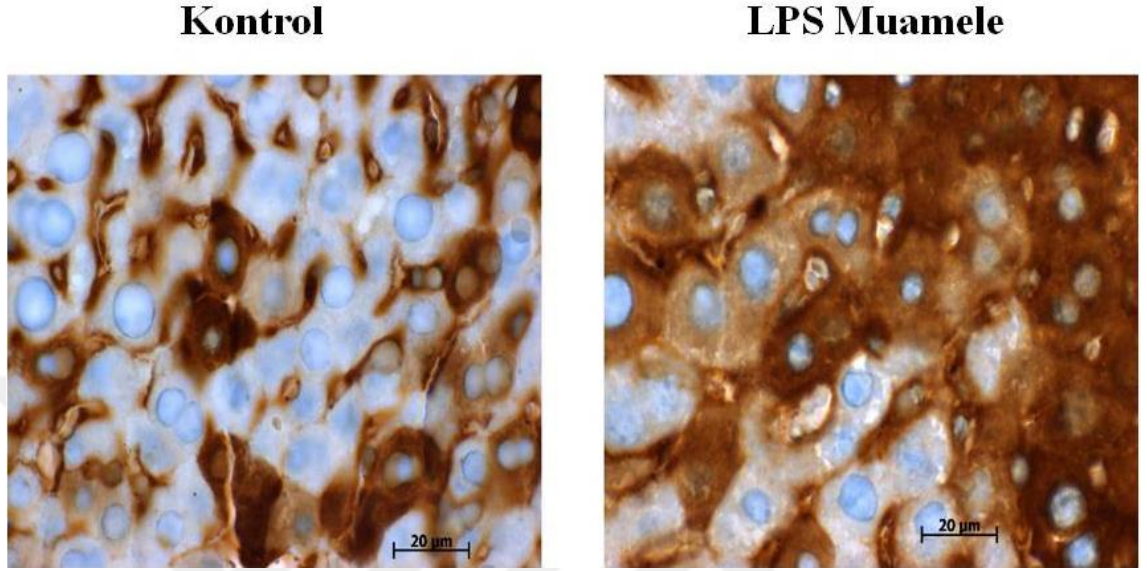
4.4.2. IL-1 α 'nın immünohistokimya analizi



Şekil 4.28. Kontrol ve LPS muamele grubu fare karaciğer dokusundan hazırlanan 5 μ m kalınlığında kesitler ile IL-1 α proteini için yapılan immünohistokimya sonuçları

İnflamasyon yolağındaki proteinlerden olan IL-1 α 'nın ekspresyonu LPS muamele grubunda önemli derecede azaldığı immünohistokimya yöntemiyle gösterildi (Şekil 4.28). Bu sonuç western blot analizi ile elde edilen sonuç ile paralellik göstermektedir. Ayrıca IL-1 α proteininin sadece sitoplazmada lokalize olduğu net bir şekilde görülmektedir.

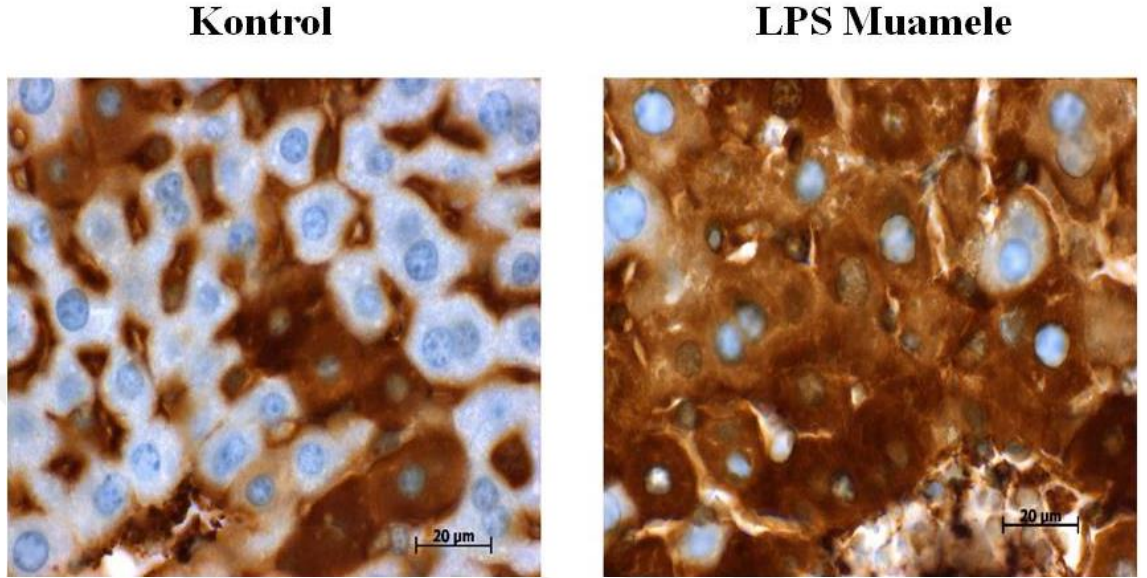
4.4.3. p-JAK1'in immünohistokimya analizi



Şekil 4.29. Kontrol ve LPS muamele grubu fare karaciğer dokusundan hazırlanan 5 µm kalınlığında kesitler ile p-JAK1 proteini için yapılan immünohistokimya sonuçları

İnflamasyon yolağındaki proteinlerden olan ve inflamasyon durumunda fosforillenen p-JAK1'in ekspresyonu LPS muamele grubunda önemli derecede arttığı immünohistokimya yöntemiyle gösterildi (Şekil 4.29). Bu sonuç western blot analizi ile elde edilen sonuç ile paralellik göstermektedir ve p-JAK1 proteininin sadece sitoplazmada lokalize olduğu görülmektedir.

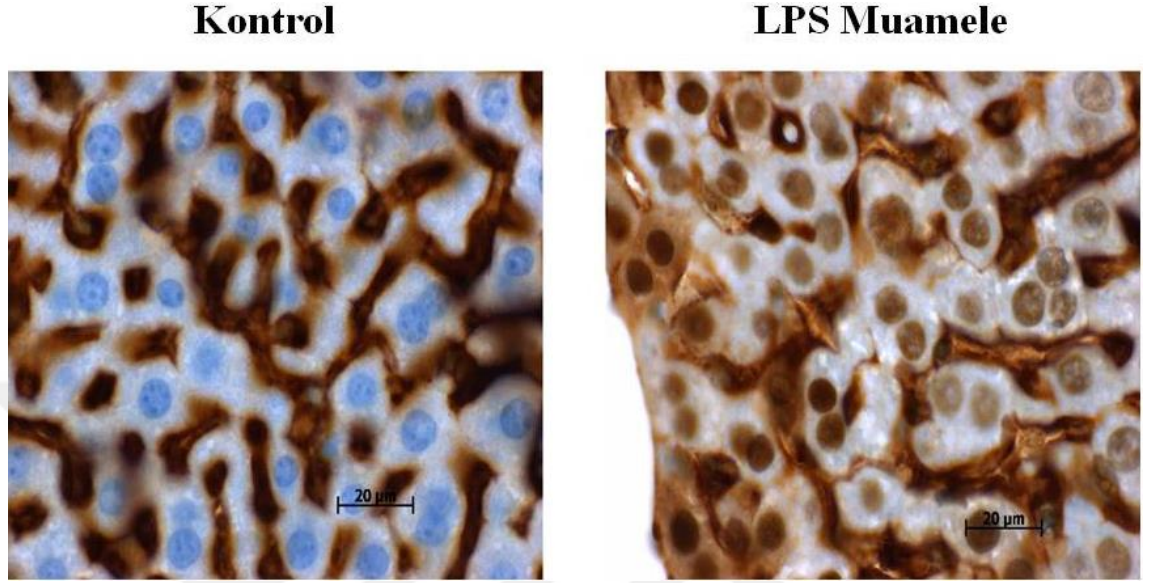
4.4.4. p-JAK2'nin immünohistokimya analizi



Şekil 4.30. Kontrol ve LPS muamele grubu fare karaciğer dokusundan hazırlanan 5 µm kalınlığında kesitler ile p-JAK2 proteini için yapılan immünohistokimya sonuçları

İnflamasyon yolağındaki proteinlerden olan ve inflamasyon durumunda fosforillenen p-JAK2'nin ekspresyonu LPS muamele grubunda önemli derecede arttığı immünohistokimya yöntemiyle gösterildi (Şekil 4.30). Ayrıca p-JAK2 proteini sadece sitoplazmada lokalize olduğu net bir şekilde görülmektedir.

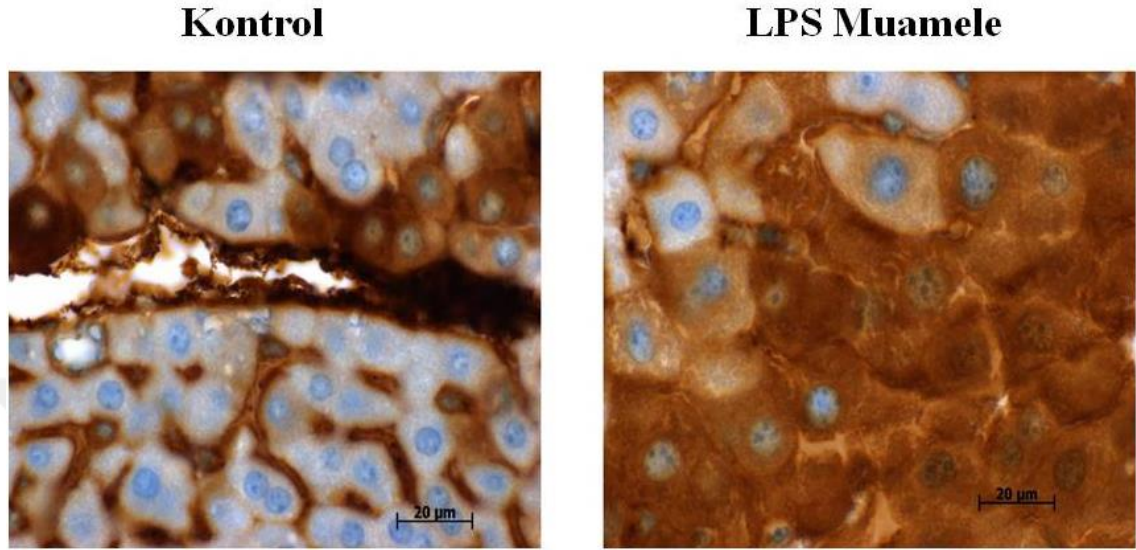
4.4.5. p-STAT3'ün immünohistokimya analizi



Şekil 4.31. Kontrol ve LPS muamele grubu fare karaciğer dokusundan hazırlanan 5 µm kalınlığında kesitler ile p-STAT3 proteini için yapılan immünohistokimya sonuçları

İnflamasyon yolağındaki proteinlerden olan ve inflamasyon durumunda fosforillenen p-STAT3'ün ekspresyonu LPS muamele grubunda önemli derecede arttığı immünohistokimya yöntemiyle gösterildi (Şekil 4.31). Bu sonuç western blot analizi ile elde edilen sonuç ile paralellik göstermektedir. Ayrıca p-STAT3 proteini sadece çekirdekte lokalize olduğu net bir şekilde görülmektedir.

4.4.6. TİP60'ın immünohistokimya analizi



Şekil 4.32. Kontrol ve LPS muamele grubu fare karaciğer dokusundan hazırlanan 5 µm kalınlığında kesitler ile TİP60 proteinini için yapılan immünohistokimya sonuçları

İnflamasyon durumunda TİP60 proteininin ekspresyonunun çok net bir şekilde arttığı ve sadece sitoplazmada lokalize olduğu immünohistokimya analizi sonrası görülmektedir (Şekil 4.32).

Çizelge 4.3. İnflamasyon yolağındaki proteinlerin subsellüler lokalizasyonu

Protein	Kontrol		LPS	
	Nükleer	Sitoplazmik	Nükleer	Sitoplazmik
IL-6	Yok	Var	Yok	Var
IL-1α	Yok	Var	Yok	Var
p-JAK1	Yok	Var	Yok	Var
p-JAK2	Yok	Var	Yok	Var
p-STAT3	Var	Yok	Var	Yok
TİP60	Yok	Var	Yok	Var

Tüm bu sonuçlar göz önüne alındığında protein seviyesinde western blot ile immünohistokimya analiz sonuçlarının birbirleriyle aynı doğrultuda olması çalışmanın güvenilirliği açısından önem arz etmektedir.



5. TARTIŞMA ve SONUÇ

1996 yılında HIV (Human immunodeficiency virus)-1 Tat interaktif protein olarak karakterize edilen TİP60 (KAT5) proteininin 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 bahsedilmiştir (McAllister *et al.* 2002; Doyon and Cote 2004). Daha sonraki yıllarda yapılan çalışmalarda da TİP60 proteinin nükleer fonksiyonlara sahip bir protein olduğu vurgulanmış, fakat bazı durumlarda sitoplazmada lokalize olarak içsel membran reseptörleri ile etkileşip kinaz metabolizması veya gen ekspresyonlarını down regüle edebileceği önerilmiştir (Sapountzi *et al.* 2006). 2013 yılında yapılan tez çalışmasında elde edilen veriler doğrultusunda, TİP60 proteininin hepsidin hormonunun ekspresyonunun düzenlenmesiyle ilişkili olduğu gösterilmiştir (Akyüz 2013). Hepsidin hormonunun demir homeostazisi ve inflamasyon yollarının regülasyonunda merkezi bir rol alması TİP60 proteinin bu düzenleyici yollar ve bu yollarda bulunan proteinler ile etkileşerek proteomu düzenleyen bir faktör olduğu düşüncesini bizde oluşturmuştur. Bu çalışma ile TİP60'ın inflamasyon mekanizması üzerinde de etkisinin olabileceğini ortaya koymak amacıyla karaciğer spesifik Tip60 şartlı (conditional) nakavt ederek bu ilişkinin boyutu hem moleküler hem de protein seviyesinde ortaya konulması amaçlanmaktadır. Bu amaçla kontrol, LPS muamele ve karaciğer spesifik Tip60 mutant farelerde çalışmalar yapılarak sonuçlar değerlendirilmiştir.

İnflamasyon, organizmada sağlıklı dokulara patojen veya patojen olmayan ajanların girişi ile tetiklenen doğal bir savunma mekanizması olarak tanımlanır (Pomin 2015). Organizma içerisinde mikrobiyal ajanların enfeksiyonu ile inflamasyon olaylarının takibinden sorumlu sitokinler açığa çıkar. Özellikle IL-6 olmak üzere sitokinler akut faz bileşenlerini uyararak, inflamasyona karşı savunma mekanizmasının ilk basamağı oluşturmaktadır (Pascual and Romay 1992). Gram-negatif bakterilerde hücre duvar yapısına katılan ve endotoksin olarak da bilinen lipopolisakkaritler (LPS) deney hayvanlarına muamele edildiğinde inflamasyona neden olduğu gözlenmiştir (Li *et al.* 2013).

Sing *et al.* BALB/c ırkı farelere uyguladıkları LPS enjeksiyonu sonrasında serumda bulunan IL-6 seviyesinin önemli derecede arttığını gözlemlemiştir (Singh *et al.* 2014). Bu tez çalışmasında da BALB/c ırkı fareler kullanılarak 5 mg/kg LPS enjeksiyonundan 6 saat sonra inflamatör bir markır olan IL-6 ve IL-1 α 'in gen ekspresyonlarında artış gözlenmiştir. Bu durum ile muamele grubunda inflamasyon modelinin olduğu sonucuna varıldı. Tip60 mutant farelerde IL-6 gen ve protein seviyesinde paralel bir artış görülürken, IL-1 α 'da ise gen seviyesinde artış olduğu protein seviyesinde azalış olduğu gözlenmiştir.

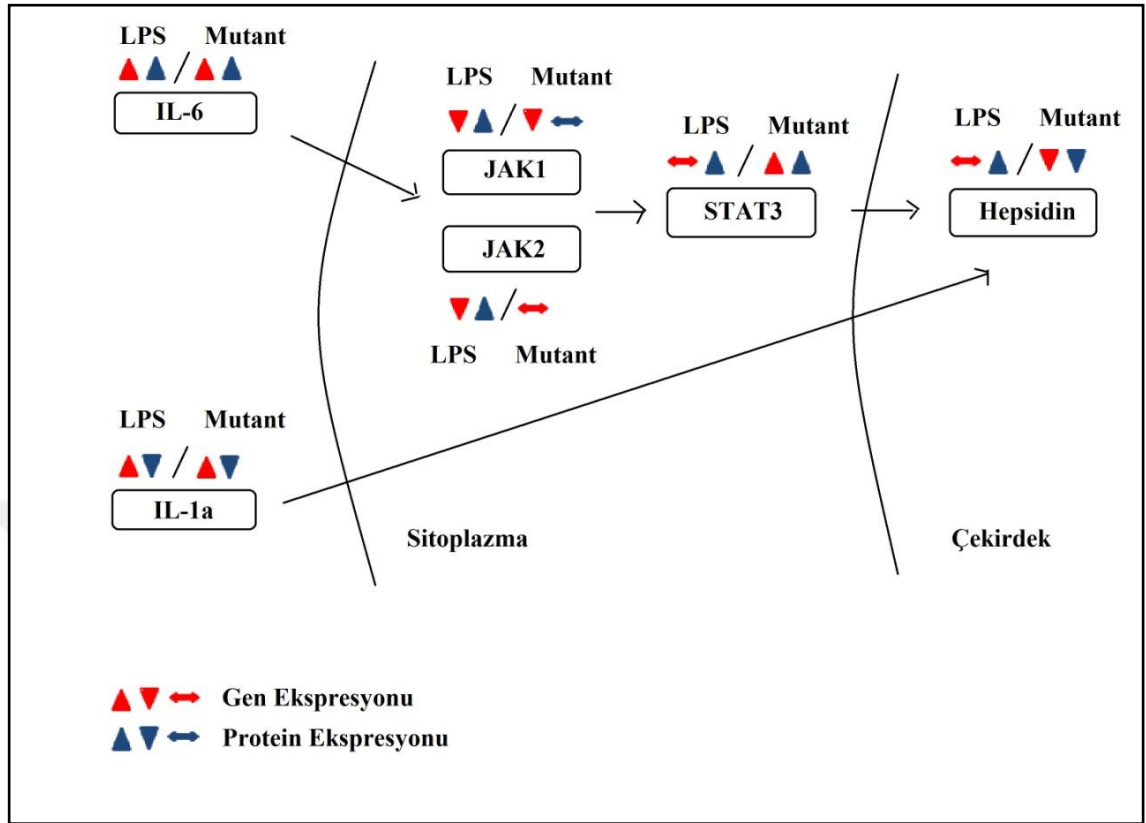
İnflamasyon ve Tip60'ın disfonksiyonel durumunda JAK1'in gen ekspresyonunun önemli derecede azaldığı gözlendi. Fakat inflamasyon durumunda fosforillenmiş JAK1 (p-JAK1)'in protein ekspresyonunun literatür ile paralel olarak arttığı gözlendi. Bu durum göz önüne alındığında yolağın gen seviyesinde değil protein seviyesinde aktive olduğu düşünülebilir. JAK2'de ise inflamasyon durumunda gen seviyesinde herhangi bir değişiklik gözlenmezken Tip60 mutant farelerde ise azaldığı gözlendi. İmmünohistokimya analiz sonuçlarına göre p-JAK2'nin sitoplazmada lokalize olduğu ve önemli derecede arttığı gözlendi.

Wrighting ve Andrews'in çalışmasında, IL-6'nın ekspresyonundaki artışa bağlı olarak JAK/STAT yolağına ait STAT3'ün ekspresyonunda artış gözlenmiştir (Wrighting and Andrews 2006). Bu tez çalışmasında da LPS muamele edilmiş gruplarda STAT3'ün gen ve protein ekspresyonunun arttığı gözlendi. Fakat Tip60 mutant farelerde ise STAT3'ün gen ekspresyonu değişmezken, protein seviyesinde ise önemli bir artış meydana gelmiştir. LPS indüklenmiş modelde IL-6 ve STAT3'ün artışı literatür ile paralellik göstermektedir. Tip60 mutant farelerde ise protein seviyesinde ki bu artış Tip60 yokluğundan dolayı immün sistemin devreye girdiğinin veya kanserli hücrelerde eksprese olduğu bilinen IL-6 ve STAT3'ün ekspresyonlarının Tip60 yokluğuna bağlı olarak meydana gelen kanserleşme sürecinde artmış olabileceğini düşünmekteyiz. Aynı zamanda Xiao ve arkadaşları bu düşüncüyü destekleyen nitelikte hepatoma HepG2 hücre hattında Tip60 ve STAT3 arasındaki ilişkiyi araştırmışlar ve bunun neticesinde de

Tip60'ın HDAC7 ile birlikte STAT3'ü baskıladığını gözlemlemişlerdir (Xiao *et al.* 2003).

İnflamasyon durumunda STAT3'ün aktive olması ile Hepsidin'in promotörüne bağlanarak ekspresyonu regüle ettiği literatürde mevcuttur, öte yandan bu çalışmada Hepsidin'in gen ekspresyonunda herhangi bir değişiklik gözlenmezken protein seviyesinde artış gözlemlendi. Hepsidin'deki bu artış epigenetik mekanizmalarla düzenleniyor olabilir. Tip60 mutant fare gruplarında ise hem gen ekspresyonu hem de protein ekspresyonunun azaldığı gözlemlendi. Tip60'ın olmadığı durumda ki bu değişiklik Tip60'ın hepsidin üzerinde doğrudan ya da dolaylı olarak bir etkisinin olduğunu göstermektedir.

İnflamasyon oluşturulmuş fare gruplarında Tip60 gen ekspresyonunda herhangi bir değişiklik gözlenmezken protein seviyesinde immünohistokimya analiz sonuçlarına göre arttığı ve sitoplazmada lokalize olduğu gözlemlenmiştir. Bu sonuçla birlikte Tip60'ın inflamasyon durumunda gen seviyesinden ziyade protein seviyesinde aktive olarak yolağı regüle ettiği anlaşılmaktadır. Tip60'ın sitoplazmada lokalize olması, özellikle de sitoplazmik proteinler üzerinde bir etkiye sahip olabileceği fikrini oluşturmuştur.



Şekil 5.1. LPS muamele ve karaciğer spesifik Tip60 mutant fare karaciğerinde JAK/STAT yolağına ait gen ve protein ekspresyonlarının şematik olarak gösterimi

Sonuç olarak; bu tez kapsamında aşağıdaki sonuçlar elde edilmiştir.

- I. LPS indüklenmiş fare modelinde IL-6'nin ekspresyonunda artış görülmesiyle birlikte inflamasyon modelinin oluştuğu sonucuna varıldı.
- II. IL-6'nin aktive olmasıyla birlikte JAK/STAT yolağının özellikle protein seviyesinde aktive olduğu görüldü.
- III. Tip60'ın inflamasyon durumunda rol oynadığı ve sitoplazmik proteinlerle de etkileşim halinde olduğu söylenebilir.
- IV. Tip60 mutant farelerde IL-6'nin ekspresyonundaki artışa paralel olarak IL-6'nin indüklediği STAT3 fosforilasyonunda da bir artış gözlenmesi Tip60 mutant farelerde immün yanıtın devreye girdiğini gösteriyor olabilir veya Tip60 yokluğunda hücrede ortaya çıkan kanserleşme eğiliminin yine kanserle ilişkisi olduğu düşünülen IL-6 ve STAT3'ün rol oynadığı düşünülebilir.

V. Bu bilgiler neticesinde, Tip60'ın yokluğunda kanserleşmeye başladığı düşünülen hücrelerde IL-6 ve STAT3 sinyal yollarının aktivasyonu ile artması beklenen Hepsidin ekspresyonunun diğer bir yol proteini olan IL-1 α 'nın etkileşimiyle azaldığı ve hepsidin ekspresyonuna yönelik negatif bir sonuç doğurduğu düşünülebilir.



KAYNAKLAR

- Abbas, A. J., Lichtman, A.H., 2007. Basic Immunology. Temel İmmünoloji.
- Akyüz, M., 2013. Karaciğer Spesifik Tip60 Nakavt Farelerde Hepsidin (Hamp) Gen Ekpresyonunun Araştırılması. Atatürk Üniversitesi Fen bilimleri Enstitüsü Erzurum.
- Anonymous, 2015. Inflammation, <https://en.wikipedia.org/wiki/Inflammation>
- Anonymous, 2016a. <http://accessphysiotherapy.mhmedical.com/content.aspx?bookid=333§ionid=40013175&jumpsectionID=40013682>.
- Anonymous, 2016b. <https://courses.washington.edu/conj/inflammation/acuteinflam.htm>.
- Anonymous, 2016c. <http://194.27.141.99/dosya-depo/ders-notlari/ahmet-gokhan-akkan/Sitokinler.pdf>.
- Avvakumov, N., and Cote, J., 2007. The MYST family of histone acetyltransferases and their intimate links to cancer. *Oncogene*, 26(37), 5395-5407. doi: 10.1038/sj.onc.1210608
- Bararia, D., Trivedi, A. K., Zada, A. A., Greif, P. A., Mulaw, M. A., Christopeit, M., Behre, G., 2008. Proteomic identification of the MYST domain histone acetyltransferase TIP60 (HTATIP) as a co-activator of the myeloid transcription factor C/EBPalpha. *Leukemia*, 22(4), 800-807. doi: 10.1038/sj.leu.2405101
- Bellone, S., Watts, K., Cane, S., Palmieri, M., Cannon, M. J., Burnett, A., Santin, A. D., 2005. High serum levels of interleukin-6 in endometrial carcinoma are associated with uterine serous papillary histology, a highly aggressive and chemotherapy-resistant variant of endometrial cancer. *Gynecol Oncol*, 98(1), 92-98. doi: 10.1016/j.ygyno.2005.03.016
- Budak, H., 2009. Memeli sirkadian sisteminde Tip60 geninin karakterizasyonu. Atatürk Üniversitesi Fen bilimleri Enstitüsü Erzurum.
- Budak, H., Kocpinar, E. F., Gonul, N., Ceylan, H., Erol, H. S., and Erdogan, O., 2014. Stimulation of gene expression and activity of antioxidant related enzyme in Sprague Dawley rat kidney induced by long-term iron toxicity. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, 166, 44-50. doi: 10.1016/j.cbpc.2014.07.002
- Budak, H., Koçpinar, E., Gönül, N., Çakır, Ş.,N., Bastem, A., 2016. Western Blot Tekniği. 24.
- Budhu, A., and Wang, X. W., 2006. The role of cytokines in hepatocellular carcinoma. *J Leukoc Biol*, 80(6), 1197-1213. doi: 10.1189/jlb.0506297
- Burton, G. J., and Jauniaux, E., 2011. Oxidative stress. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, 25(3), 287-299. doi: 10.1016/j.bpobgyn.2010.10.016
- Burton, G. J., and Jauniaux, E., 2011. Oxidative stress. *Best Practice & Research. Clinical Obstetrics & Gynaecology*, 25(3), 287-299. doi: 10.1016/j.bpobgyn.2010.10.016
- Circu, M. L., and Aw, T. Y., 2010. Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. *Free Radic Biol Med*, 48(6), 749-762. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2009.12.022
- Circu, M. L., and Aw, T. Y., 2012. Glutathione and modulation of cell apoptosis. Research Support, N.I.H., Extramural

- Coleman, D. L., King, R. N., and Andrade, J. D., 1974. The foreign body reaction: a chronic inflammatory response. *J Biomed Mater Res*, 8(5), 199-211. doi: 10.1002/jbm.820080503
- Dağdelen, B., 2015. İnflamasyonun Oksidatif Stres Üzerine Etkisinin Fare Böbrek Dokusunda Transkriptomik ve Proteomik Seviyede Araştırılması. Atatürk Üniversitesi Fen bilimleri Enstitüsü Erzurum.
- Darnell, J. E., Jr., 1997. STATs and gene regulation. *Science*, 277(5332), 1630-1635.
- De Domenico, I., Zhang, T. Y., Koenig, C. L., Branch, R. W., London, N., Lo, E., Kaplan, J., 2010. Hepcidin mediates transcriptional changes that modulate acute cytokine-induced inflammatory responses in mice. *J Clin Invest*, 120(7), 2395-2405. doi: 10.1172/jci42011
- Doyon, Y., and Cote, J., 2004. The highly conserved and multifunctional NuA4 HAT complex. *Curr Opin Genet Dev*, 14(2), 147-154. doi: 10.1016/j.gde.2004.02.009
- Ernst, M., Najdovska, M., Grail, D., Lundgren-May, T., Buchert, M., Tye, H., Jenkins, B. J., 2008. STAT3 and STAT1 mediate IL-11-dependent and inflammation-associated gastric tumorigenesis in gp130 receptor mutant mice. *J Clin Invest*, 118(5), 1727-1738. doi: 10.1172/JCI34944
- Fischer, M., Goldschmitt, J., Peschel, C., Brakenhoff, J. P., Kallen, K. J., Wollmer, A., Rose-John, S., 1997. I. A bioactive designer cytokine for human hematopoietic progenitor cell expansion. *Nat Biotechnol*, 15(2), 142-145. doi: 10.1038/nbt0297-142
- Frank, S. R., Parisi, T., Taubert, S., Fernandez, P., Fuchs, M., Chan, H. M., Amati, B., 2003. MYC recruits the TIP60 histone acetyltransferase complex to chromatin. *EMBO Rep*, 4(6), 575-580. doi: 10.1038/sj.embor.embor861
- Galley, H. F., 2011. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in sepsis. *Br J Anaesth*, 107(1), 57-64. doi: 10.1093/bja/aer093
- Ganz, T., and Nemeth, E., 2015. Iron homeostasis in host defence and inflammation. *Nat Rev Immunol*, 15(8), 500-510. doi: 10.1038/nri3863
- Gaughan, L., Brady, M. E., Cook, S., Neal, D. E., and Robson, C. N., 2001. Tip60 is a co-activator specific for class I nuclear hormone receptors. *J Biol Chem*, 276(50), 46841-46848. doi: 10.1074/jbc.M103710200
- Gaughan, L., Logan, I. R., Cook, S., Neal, D. E., and Robson, C. N., 2002. Tip60 and histone deacetylase 1 regulate androgen receptor activity through changes to the acetylation status of the receptor. *J Biol Chem*, 277(29), 25904-25913. doi: 10.1074/jbc.M203423200
- Gavaravarapu, S., and Kamine, J., 2000. Tip60 inhibits activation of CREB protein by protein kinase A. *Biochem Biophys Res Commun*, 269(3), 758-766. doi: 10.1006/bbrc.2000.2358
- Gong, F., and Miller, K. M., 2013. Mammalian DNA repair: HATs and HDACs make their mark through histone acetylation. *Research Support, Non-U.S. Gov't*
- Gonul, N., 2013. Karaciğer Spesifik Tip60 Nakavt Farelerde karbonik anhidraz enzimlerinin (I,II ve VII) Ekpresyon Analizi.
- Grant, A. P., 2001. A tale of histone modifications. *Genome Biology*(2), 1-6.
- Guo, Y., Xu, F., Lu, T., Duan, Z., and Zhang, Z., 2012. Interleukin-6 signaling pathway in targeted therapy for cancer. *Cancer Treat Rev*, 38(7), 904-910. doi: 10.1016/j.ctrv.2012.04.007

- Hirano, T., 1998. Interleukin 6 and its receptor: ten years later. *Int Rev Immunol*, 16(3-4), 249-284. doi: 10.3109/08830189809042997
- Hohaus, S., Massini, G., Giachelia, M., Vannata, B., Bozzoli, V., Cuccaro, A., Leone, G., 2010. Anemia in Hodgkin's lymphoma: the role of interleukin-6 and hepcidin. *J Clin Oncol*, 28(15), 2538-2543. doi: 10.1200/jco.2009.27.6873
- Ihle, J. N., 1996. STATs: signal transducers and activators of transcription. *Cell*, 84(3), 331-334.
- Ikura, T., Ogryzko, V. V., Grigoriev, M., Groisman, R., Wang, J., Horikoshi, M., Nakatani, Y., 2000. Involvement of the TIP60 histone acetylase complex in DNA repair and apoptosis. *Cell*, 102(4), 463-473.
- Kamine, J., Elangovan, B., Subramanian, T., Coleman, D., and Chinnadurai, G., 1996. Identification of a cellular protein that specifically interacts with the essential cysteine region of the HIV-1 Tat transactivator. *Virology*, 216(2), 357-366. doi: 10.1006/viro.1996.0071
- Karin, M., and Greten, F. R., 2005. NF-kappaB: linking inflammation and immunity to cancer development and progression. *Nat Rev Immunol*, 5(10), 749-759. doi: 10.1038/nri1703
- Keha, E. E., Küfrevioğlu, Ö.İ., 2009. *Biyokimya. Aktif Yayınevi, Erzurum.*
- Kim, C. H., Kim, J. W., Jang, S. M., An, J. H., Seo, S. B., and Choi, K. H., 2015. The chromodomain-containing histone acetyltransferase TIP60 acts as a code reader, recognizing the epigenetic codes for initiating transcription. *Biosci Biotechnol Biochem*, 79(4), 532-538. doi: 10.1080/09168451.2014.993914
- Kim, H. Y., Park, E. J., Joe, E. H., and Jou, I., 2003. Curcumin suppresses Janus kinase-STAT inflammatory signaling through activation of Src homology 2 domain-containing tyrosine phosphatase 2 in brain microglia. *J Immunol*, 171(11), 6072-6079.
- Kim, J. W., Jang, S. M., Kim, C. H., An, J. H., Kang, E. J., and Choi, K. H., 2012. New molecular bridge between RelA/p65 and NF-kappaB target genes via histone acetyltransferase TIP60 cofactor. *J Biol Chem*, 287(10), 7780-7791. doi: 10.1074/jbc.M111.278465
- Klug, W. S., Cummings, R.M., ve grupları 2003. *Genetik Kavramalar (Çeviri: C. Öner). Palme Yayıncılık.*
- Kocpinar, E. F., 2015. *Tip60 Geninin Oksidatif Stres Üzerine Etkisinin Karaciğer Spesifik Tip60 Nakavt Farelerde Araştırılması Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.*
- Lang, S. E., and Hearing, P., 2003. The adenovirus E1A oncoprotein recruits the cellular TRRAP/GCN5 histone acetyltransferase complex. *Oncogene*, 22(18), 2836-2841. doi: 10.1038/sj.onc.1206376
- Lee, M. T., Leung, Y. K., Chung, I., Tarapore, P., and Ho, S. M., 2013. Estrogen receptor beta (ERbeta1) transactivation is differentially modulated by the transcriptional coregulator Tip60 in a cis-acting element-dependent manner. *J Biol Chem*, 288(35), 25038-25052. doi: 10.1074/jbc.M113.476952
- Li, L., Ma, P., Liu, Y., Huang, C., O, W. S., Tang, F., and Zhang, J. V., 2013. Intermedin attenuates LPS-induced inflammation in the rat testis. *PLoS One*, 8(6), e65278. doi: 10.1371/journal.pone.0065278
- Liu, Y., Liu, A., Li, H., Li, C., and Lin, J., 2011. Celecoxib inhibits interleukin-6/interleukin-6 receptor-induced JAK2/STAT3 phosphorylation in human

- hepatocellular carcinoma cells. *Cancer Prev Res (Phila)*, 4(8), 1296-1305. doi: 10.1158/1940-6207.capr-10-0317
- Lutticken, C., Wegenka, U. M., Yuan, J., Buschmann, J., Schindler, C., Ziemiecki, A., *et al.*, 1994. Association of transcription factor APRF and protein kinase Jak1 with the interleukin-6 signal transducer gp130. *Science*, 263(5143), 89-92.
- Maliken, B. D., Nelson, J. E., and Kowdley, K. V., 2011. The hepcidin circuits act: balancing iron and inflammation. *Hepatology*, 53(5), 1764-1766. doi: 10.1002/hep.24267
- Mantovani, A., Allavena, P., Sica, A., and Balkwill, F., 2008. Cancer-related inflammation. *Nature*, 454(7203), 436-444. doi: 10.1038/nature07205
- Margueron, R., Trojer, P., and Reinberg, D., 2005. The key to development: interpreting the histone code? *Curr Opin Genet Dev*, 15(2), 163-176. doi: 10.1016/j.gde.2005.01.005
- Martinko, M. T., Martinco, J. M., 2006. Brock Biology of Microorganisms. Mikroorganizmaların Biyolojisi.
- Mates, J. M., 2000. Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. Research Support, Non-U.S. Gov't
- McAllister, D., Merlo, X., and Lough, J., 2002. Characterization and expression of the mouse tat interactive protein 60 kD (TIP60) gene. *Gene*, 289(1-2), 169-176.
- Medzhitov, R., and Janeway, C., Jr., 2000. Innate immunity. *N Engl J Med*, 343(5), 338-344. doi: 10.1056/nejm200008033430506
- Meldrum, N. U., and Tarr, H. L., 1935. The reduction of glutathione by the Warburg-Christian system. *Biochem J*, 29(1), 108-115.
- Michael, D., and Oren, M., 2002. The p53 and Mdm2 families in cancer. *Curr Opin Genet Dev*, 12(1), 53-59.
- Mogensen, T. H., 2009. Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses. *Clin Microbiol Rev*, 22(2), 240-273, Table of Contents. doi: 10.1128/cmr.00046-08
- Mohamadin, A. M., Elberry, A. A., Elkablawy, M. A., Gawad, H. S., and Al-Abbasi, F. A., 2011. Montelukast, a leukotriene receptor antagonist abrogates lipopolysaccharide-induced toxicity and oxidative stress in rat liver. *Pathophysiology*, 18(3), 235-242. doi: 10.1016/j.pathophys.2011.02.003
- Narazaki, M., Yasukawa, K., Saito, T., Ohsugi, Y., Fukui, H., Koishihara, Y., Kishimoto, T., 1993. Soluble forms of the interleukin-6 signal-transducing receptor component gp130 in human serum possessing a potential to inhibit signals through membrane-anchored gp130. *Blood*, 82(4), 1120-1126.
- Nemeth, E., Rivera, S., Gabayan, V., Keller, C., Taudorf, S., Pedersen, B. K., and Ganz, T., 2004. IL-6 mediates hypoferrremia of inflammation by inducing the synthesis of the iron regulatory hormone hepcidin. *J Clin Invest*, 113(9), 1271-1276. doi: 10.1172/jci20945
- Nemeth, E., Tuttle, M. S., Powelson, J., Vaughn, M. B., Donovan, A., Ward, D. M., Kaplan, J., 2004. Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. *Science*, 306(5704), 2090-2093. doi: 10.1126/science.1104742
- Nohl, H., Gille, L., and Staniek, K., 2005. Intracellular generation of reactive oxygen species by mitochondria. *Biochem Pharmacol*, 69(5), 719-723. doi: 10.1016/j.bcp.2004.12.002

- Orcan, S., 2006. Epigenetik ve Epigenomik. Hacettepe Üniversitesi. http://yunus.hacettepe.edu.tr/~mergen/derleme/d_epigenetik.pdf.
- Park, C. H., Valore, E. V., Waring, A. J., and Ganz, T., 2001. Hecpidin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver. *J Biol Chem*, 276(11), 7806-7810. doi: 10.1074/jbc.M008922200
- Pascual, C., and Romay, C., 1992. Effect of antioxidants on chemiluminescence produced by reactive oxygen species. *J Biolumin Chemilumin*, 7(2), 123-132. doi: 10.1002/bio.1170070205
- Patel, J. H., Du, Y., Ard, P. G., Phillips, C., Carella, B., Chen, C. J., McMahon, S. B., 2004. The c-MYC oncoprotein is a substrate of the acetyltransferases hGCN5/PCAF and TIP60. *Mol Cell Biol*, 24(24), 10826-10834. doi: 10.1128/mcb.24.24.10826-10834.2004
- Pehlivan, M., 2008. Kronik Miyeloid Lösemi(KML) Hastalarında Sfrp1 Genininpromotör Bölgesinin Epigenetik Ve Genetik Değişikliklerinin İncelenmesi. Yüksek Lisans, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İzmir.
- Polevoda, B., and Sherman, F., 2002. The diversity of acetylated proteins. *Genome Biol*, 3(5), reviews0006.
- Pomin, V. H., 2015. Sulfated glycans in inflammation. *Eur J Med Chem*, 92, 353-369. doi: 10.1016/j.ejmech.2015.01.002
- Reddy, M. M., Mahipal, S. V., Subhashini, J., Reddy, M. C., Roy, K. R., Reddy, G. V., Reddanna, P., 2006. Bacterial lipopolysaccharide-induced oxidative stress in the impairment of steroidogenesis and spermatogenesis in rats. *Reprod Toxicol*, 22(3), 493-500. doi: 10.1016/j.reprotox.2006.03.003
- Research Support, U.S. Gov't, P.H.S. *J Biol Chem*, 278(13), 11197-11204. doi: 10.1074/jbc.M210816200
- Review. *Biochim Biophys Acta*, 1823(10), 1767-1777. doi: 10.1016/j.bbamcr.2012.06.019
- Review. *Int J Biochem Cell Biol*, 38(9), 1496-1509. doi: 10.1016/j.biocel.2006.03.003
- Review. *Int J Biochem Cell Biol*, 39(1), 44-84. doi: 10.1016/j.biocel.2006.07.001
- Review. *Mutat Res*, 750(1-2), 23-30. doi: 10.1016/j.mrfmmm.2013.07.002
- Review. *Toxicology*, 153(1-3), 83-104.
- Robson, K. J., 2004. Hecpidin and its role in iron absorption. *Gut*, 53(5), 617-619. doi: 10.1136/gut.2003.027631
- Rodriguez, C., Mayo, J. C., Sainz, R. M., Antolin, I., Herrera, F., Martin, V., and Reiter, R. J., 2004. Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin. *J Pineal Res*, 36(1), 1-9.
- Santer, F. R., Malinowska, K., Culig, Z., and Cavarretta, I. T., 2010. Interleukin-6 trans-signalling differentially regulates proliferation, migration, adhesion and maspin expression in human prostate cancer cells. *Endocr Relat Cancer*, 17(1), 241-253. doi: 10.1677/ERC-09-0200
- Sapountzi, V., Logan, I. R., and Robson, C. N., 2006. Cellular functions of TIP60. Research Support, Non-U.S. Gov't
- Scambia, G., Testa, U., Benedetti Panici, P., Foti, E., Martucci, R., Gadducci, A., Mancuso, S., 1995. Prognostic significance of interleukin 6 serum levels in patients with ovarian cancer. *Br J Cancer*, 71(2), 354-356.

- Schindler, C., and Darnell, J. E., Jr., 1995. Transcriptional responses to polypeptide ligands: the JAK-STAT pathway. *Annu Rev Biochem*, 64, 621-651. doi: 10.1146/annurev.bi.64.070195.003201
- Singh, M., Hamid, A. A., Maurya, A. K., Prakash, O., Khan, F., Kumar, A., Bawankule, D. U., 2014. Synthesis of diosgenin analogues as potential anti-inflammatory agents. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 143, 323-333. doi: 10.1016/j.jsbmb.2014.04.006
- Sousa, T., Afonso, J., 2012. Lipid peroxidation and antioxidants in arterial hypertension.
- Stahl, N., Boulton, T. G., Farruggella, T., Ip, N. Y., Davis, S., Witthuhn, B. A., 1994. Association and activation of Jak-Tyk kinases by cntf-lif-osm-il-6 beta receptor components. *Science*, 263(5143), 92-95.
- Stephen, C. M., 1996. Spring. *The Intercollegiate Review* 31, no. 2.
- Sterner, D. E., and Berger, S. L., 2000. Acetylation of histones and transcription-related factors. *Microbiol Mol Biol Rev*, 64(2), 435-459.
- Streetz, K., Luedde, T., Manns, M., and Trautwein, C., 2000. Interleukin 6 and liver regeneration. *Gut*, 47(2), 309-312. doi: 10.1136/gut.47.2.309
- Suleyman, H., Demircan, B., Karagoz, Y., Oztasan, N., and Suleyman, B., 2004. Anti-inflammatory effects of selective COX-2 inhibitors. *Pol J Pharmacol*, 56(6), 775-780.
- Taga, T., and Kishimoto, T., 1997. Gp130 and the interleukin-6 family of cytokines. *Annu Rev Immunol*, 15, 797-819. doi: 10.1146/annurev.immunol.15.1.797
- Tang, Y., Luo, J., Zhang, W., and Gu, W., 2006. Tip60-dependent acetylation of p53 modulates the decision between cell-cycle arrest and apoptosis. *Mol Cell*, 24(6), 827-839. doi: 10.1016/j.molcel.2006.11.021
- Trautwein, C., Boker, K., and Manns, M. P., 1994. Hepatocyte and immune system: acute phase reaction as a contribution to early defence mechanisms. *Gut*, 35(9), 1163-1166.
- Utley, R. T., and Cote, J., 2003. The MYST family of histone acetyltransferases. *Curr Top Microbiol Immunol*, 274, 203-236.
- Valko, M., Izakovic, M., Mazur, M., Rhodes, C. J., and Telser, J., 2004. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Mol Cell Biochem*, 266(1-2), 37-56.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T., Mazur, M., and Telser, J., 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Research Support, Non-U.S. Gov't*
- Vousden, K. H., and Lu, X., 2002. Live or let die: the cell's response to p53. *Nat Rev Cancer*, 2(8), 594-604. doi: 10.1038/nrc864
- Wrighting, D. M., and Andrews, N. C., 2006. Interleukin-6 induces hepcidin expression through STAT3. *Blood*, 108(9), 3204-3209. doi: 10.1182/blood-2006-06-027631
- Xiao, H., Chung, J., Kao, H. Y., and Yang, Y. C., 2003. Tip60 is a co-repressor for STAT3. *Research Support, Non-U.S. Gov't*
- Xing, Z., Gauldie, J., Cox, G., Baumann, H., Jordana, M., Lei, X. F., and Achong, M. K., 1998. IL-6 is an antiinflammatory cytokine required for controlling local or systemic acute inflammatory responses. *J Clin Invest*, 101(2), 311-320. doi: 10.1172/jci1368

- Yamaoka, K., Saharinen, P., Pesu, M., Holt, V. E. T., Silvennoinen, O., and O'Shea, J. J., 2004. The Janus kinases (Jaks). *Genome Biology*, 5(12), 253-253. doi: 10.1186/gb-2004-5-12-253
- Yang, X. Y., Wang, L. H., and Farrar, W. L., 2008. A Role for PPARgamma in the Regulation of Cytokines in Immune Cells and Cancer. *PPAR Res*, 2008, 961753. doi: 10.1155/2008/961753
- Yu, H., Kortylewski, M., and Pardoll, D., 2007. Crosstalk between cancer and immune cells: role of STAT3 in the tumour microenvironment. *Nat Rev Immunol*, 7(1), 41-51. doi: 10.1038/nri1995
- Yu, H., Pardoll, D., and Jove, R., 2009. STATs in cancer inflammation and immunity: a leading role for STAT3. *Nat Rev Cancer*, 9(11), 798-809. doi: 10.1038/nrc2734



ÖZGEÇMİŞ

05.09.1992 yılında Ankara'da doğdu. İlk ve orta öğrenimini Erzurum Başöğretmen İlköğretim Okulu'nda tamamladı. 2006-2010 yılları arasında Erzurum Mehmet Akif Ersoy Anadolu Lisesi'nde lise öğrenimini tamamladı. 2010-2014 tarihleri arasında Atatürk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nü bitirip aynı yıl Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü'nde Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Genetik Bilim dalında yüksek lisans eğitimine başladı. Ağustos 2014'de başlayıp Haziran 2016'da bitirdiği yüksek lisans programındaki tüm laboratuvar çalışmalarını Atatürk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Genetik Araştırma Laboratuvarı, Atatürk Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Patoloji ABD laboratuvarı ve Atatürk Üniversitesi, Tıbbi Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde yaptı. 2015-2016 tarihleri arasında TÜBİTAK tarafından desteklenen ve halen devam etmekte olan 114Z277 nolu 1001 projesinde bursiyer araştırmacı olarak çalıştı.