

**KARACİĞER SPESİFİK TİP60 NAKAVT FARELERDE
HEPSİDİN (HAMP) GEN EKSPRESYONUNUN
ARAŞTIRILMASI**

Mesut AKYÜZ

**Yüksek Lisans Tezi
Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı
Yrd. Doç. Dr. Harun BUDAK
2013
Her hakkı saklıdır**

**ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**KARACİĞER SPESİFİK TİP60 NAKAVT FARELERDE HEPsİDİN
(HAMP) GEN EKSPRESYONUNUN ARAŞTIRILMASI**

Mesut AKYÜZ

MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANA BİLİM DALI

ERZURUM

2013

Her hakkı saklıdır



T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



TEZ ONAY FORMU

**KARACİĞER SPESİFİK TİP60 NAKAVT FARELERDE HEPsİDİN (HAMP)
GEN EKSPRESYONUNUN ARAŞTIRILMASI**

Yrd. Doç. Dr. Harun BUDAK danışmanlığında, Mesut AKYÜZ tarafından hazırlanan bu çalışma 17/07/2013 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak **oybirliği** ile kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Orhan ERDOĞAN

İmza :

Üye : Prof. Dr. Şükrü BEYDEMİR

İmza :

Üye : Yrd. Doç. Dr. Harun BUDAK

İmza :

Yukarıdaki sonucu onaylıyorum

Prof. Dr. İhsan EFEOĞLU
Enstitü Müdürü

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

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

KARACİĞER SPESİFİK TIP60 NAKAVT FARELERDE HEPİDİN (HAMP) GEN EKSPRESYONUNUN ARAŞTIRILMASI

Mesut AKYÜZ

Atatürk Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Harun BUDAK

Histon asetiltransferaz (HATs) MYST protein ailesinin bir üyesi olan TIP60'ın metabolizmada DNA tamiri, hücre döngüsü, apoptosis mekanizması, sirkadian sistem ve hücrel yanıt üretilmesi gibi birçok fonksiyonu vardır. APP proteini ile TIP60 arasındaki ilişki yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Özellikle ferroportin ile etkileşim halinde demir transportunda görev alan APP, ferooksidaz aktiviteye sahiptir. APP proteini ile ilişkili olan TIP60'ın demir metabolizmasında fonksiyon gösterebileceğini düşündük. Hepsidin karaciğerde üretilen peptid yapılı bir hormondur ve insan ve diğer memelilerde demir homeostasisinin düzenlenmesinden sorumludur. TIP60'ın metabolizmada birçok fonksiyonu bilinmesine rağmen demir düzenleyici hormon hepsidin üzerindeki rolü hakkında literatürde herhangi bir bilgi mevcut değildir. Hepsidin hormonu ile Tip60 arasındaki ilişkinin gösterilmesinin amaçlandığı bu tez çalışması ile elde edilen bulguların, Anemi ve Alzheimer gibi demir bağımlı düzensizliklerin mekanizmalarının daha iyi anlaşılmasını sağlayabileceği önerildi.

Bu çalışmada, Real-Time PCR tekniği kullanılarak, hepsidin gen ekspresyon seviyesi günün farklı zaman dilimlerinde toplanan kontrol grubu ve karaciğere spesifik Tip60 kontrollü nakavt fare dokularıyla çalışılarak gösterilmiştir. Ayrıca hepsidinin gün içinde beslenme, egzersiz gibi günlük ritimlerle düzenlendiği bilinmektedir. Böylece biz karaciğerde hepsidin (Hamp) geninin sirkadian ekspresyon profilini analiz ettik. Sonuçta hepsidin ekspresyonunun 12 saat aydınlık 12 saat karanlık döngüde karanlık fazın dördüncü saatinde maksimum seviyeye ulaştığını gösterdik.

2013, 70 sayfa

Anahtar Kelimeler: Demir metabolizması, Hepsidin, Amiloid prekürsör protein (APP), Tip60, Ekspresyon.

ABSTRACT

Master Thesis

INVESTIGATION OF HEPCIDIN (HAMP) GENE EXPRESSION ON LIVER SPECIFIC TIP60 CONDITIONAL KNOCKOUT MICE

Mesut AKYÜZ

Atatürk University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Molecular Biology and Genetics

Supervisor: Asst. Prof. Dr. Harun BUDAK

TIP60 is a member of the MYST protein family of histone acetyltransferases (HATs) with multiple functions in metabolism such as DNA repair, apoptosis, circadian rhythm and production of cellular response mechanisms. It has already been published that there is an interaction between TIP60 and APP protein. APP possesses ferroxidase activity (iron export), facilitating iron export through interaction with ferroportin. We thought that if Tip60 has a relationship with APP protein, TIP60 might have a function in iron metabolism. Heparin is a peptide hormone produced by the liver, and appears to be the master regulator of iron homeostasis in humans and other mammals. Although many function of TIP60 is known very well, there is no any information in literature about its effects on iron regulatory hormone as called “hepcidin”. The findings from this thesis might provide to deeply understanding reasons of iron disorder such as Anemia, Alzheimer.

In this thesis, the expression levels of hepcidin gene was analyzed by Real-Time PCR in liver tissues which were collected from the liver-specific Tip60 conditional knockout and control group mice in different times points of day. Additionally, it is known that amount of hepcidin in liver are daily arranged by exercise and nutrition. Thus, we examined the circadian expression profiles of hepcidin (Hamp) gene in liver. The results showed that hepcidin reached maximum level during the fourth hour of the dark phase of the 12 hr light:12 hr dark.

2013, 70 pages

Keywords: Iron metabolism, Heparin, Amyloid precursor protein (APP), Tip60, Expression.

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışması Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Genetik Araştırma Laboratuvarında yürütülmüştür.

Bu araştırmanın yürütülmesinde büyük emeği geçen, her aşamasında ilgisini ve yardımlarını esirgemeyen, danışmanım, Sayın Yrd. Doç. Dr. Harun BUDAK'a ve Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölüm Başkanı Sayın Prof. Dr. Orhan ERDOĞAN'a teşekkür ederim.

Çalışmalarımız için gerekli dokuların temini aşamasında göstermiş oldukları yardımlarından dolayı Max Planck Enstitüsü Biyofiziksel Kimya, Gen ve Davranışlar Bölümü (Göttingen, Almanya) laboratuvar direktörü Sayın Prof. Dr. Gregor EICHELE ve bölüm çalışanlarına teşekkür ederim.

Çalışmalarımın farklı aşamalarında bana yardımcı olan değerli arkadaşlarım Sayın Nurdan GÖNÜL'e, Sayın Enver Fehim KOÇPINAR'a, Sayın Hasan CAN'a ve ayrıca Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü elemanlarının tümüne teşekkür ederim.

Yüksek lisans çalışmalarım için gerekli görevlendirmelerde bana sağladıkları kolaylıktan dolayı Bingöl Üniversitesi Biyoloji Bölüm Başkanlığı'na ve bu bölümdeki mesai arkadaşlarıma bana gösterdikleri anlayıştan dolayı teşekkür ederim.

Çalışmalarım süresince maddi manevi her türlü desteklerinden dolayı anneme, babama ve ailemin bütün fertlerine sonsuz teşekkürler.

Mesut AKYÜZ

Temuz 2013

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
1. GİRİŞ.....	1
2. KURAMSAL TEMELLER.....	4
2.1. Demir ve Demir Metabolizması	4
2.1.1. Demirin vücutta dağılımı.....	4
2.1.2. Demir emilimi	6
2.1.2.a. Hem demirinin emilimi	6
2.1.2.b. İnorganik (hem dışı) demirin emilimi	7
2.1.3. Demir döngüsü ve depolanması	8
2.1.4. Organizmada demir dengesi	10
2.1.4.a. Hücre içi demir dengesi	10
2.1.4.b. Sistemik demir dengesi.....	11
2.1.5. Hepsidinin keşfi ve yapısı	12
2.1.6. Hepsidinin biyolojik işlevleri	13
2.1.7. Hepsidin ferroportin ilişkisi.....	14
2.1.8. Hepsidin üretiminin düzenlenmesi	15
2.2. Histon Proteinleri	17
2.2.1. Tip60 histon asetil tranferaz	18
2.2.2. TIP60 kompleksi	20
2.2.3. Sitoplazmik TIP60.....	20
2.2.4. TIP60'ın transkripsiyon baskılayıcı rolü	21
2.2.5. TIP60 ve Amiloid Prekürsör Protein (APP) ilişkisi	23
2.2.5.a. Amiloid- β ($A\beta$)	23

2.2.5.b. β -Amiloid Prekürsör Protein (APP)'nin demir taşıyıcı ferooksidaz aktivitesi	24
2.2.6. TIP60 ile APP etkileşiminin nörodejenaratif bozukluklar üzerine etkisi.....	26
2.3. Sirkadian Sistem.....	28
2.3.1. Biyolojik saat çeşitleri	30
2.3.2. SCN yapısı ve organizasyonu.....	31
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	34
3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Materyaller	34
3.2. Kullanılan Alet ve Cihazlar	35
3.3. Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması	36
3.4. Tip60 Geninin Karaciğer Spesifik Silinmesi.....	36
3.5. RNA İzolasyonu	39
3.6. RNA'nın Agaroz Jel Elektroforezinde Kontrolü.....	40
3.6.1. Jelde yürütülecek RNA örneğinin hazırlanışı	41
3.6.2. Jelin hazırlanışı.....	42
3.6.3. Elektroforez işlemi	42
3.7. cDNA Kütüphanesinin Hazırlanması	42
3.7.1. Gerekli kimyasallar	42
3.7.2. Yöntem	43
3.8. Hamp Geni İçin Primer ve Prob Temini	44
3.9. Real-Time PCR Uygulaması	44
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	47
4.1. RNA İzolasyonunun Jel Elektroforez İle Kontrolü.....	47
4.2. Real-Time PCR Sonuçları	48
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	55
5.1. Öneriler.....	61
KAYNAKLAR	62
ÖZGEÇMİŞ	71

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ApoTf	Apotransferrin
APP	Amiloid Prekürsör Protein
cDNA	Komplementer DNA
CP	Seruloplazmin
Dcytb	Duodenal sitokrom b
DMT1	Divalan metal taşıyıcı 1
Fe ₂ -Tf	Diferrik transferrin
FPN	Ferroportin
Hamp	Hepsidin antimikrobiyal peptid
Hb	Hemoglobin
HCP	Hem taşıyıcı protein
IRE	Iron responsive element
IRP	Iron responsive protein
NTBI	Non transferrin bound iron
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
SCN	Suprakiazmatik nükleus
Tf	Transferrin
TfR	Transferrin reseptörü
Tip60	Tat-interaktif protein 60 kDa
ZT	Zeitgeber zaman birimi

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Demirin vücutta dağılımı	5
Şekil 2.2. Demirin enterosit hücreğine girişi	7
Şekil 2.3. Plazmadan demirin hücre içine alınması	10
Şekil 2.4. Hepsidin yapısı	13
Şekil 2.5. Hepsidin ferroportin ilişkisi	15
Şekil 2.6. Hepsidin ekspresyonunun düzenlenmesi	17
Şekil 2.7. TIP60'ın gen transkripsiyonunu içeren basit modeli	22
Şekil 2.8. APP'nin hücrenel demir taşınmasındaki model rolü ve Alzheimer hastalığında inhibisyonu	26
Şekil 2.9. SCN'nin senkronizasyonu	32
Şekil 3.1. Tamoxifenin indüklediği SACre rekombinazın Tip60 genini karaciğer spesifik olarak silme etkinliğinin southern blot ile gösterilmesi	38
Şekil 3.2. RNA'nın jel görüntüsü	41
Şekil 4.1. Örneklerden izole edilen RNA'nın jel elektroforez görüntüsü	47
Şekil 4.2. ZT0 zaman diliminde alınan kontrol ve mutant fare karaciğer dokusunda Hamp gen ekspresyon seviyesinin gösterilmesi	49
Şekil 4.3. ZT4 zaman diliminde alınan kontrol ve mutant fare karaciğer dokusunda Hamp gen ekspresyon seviyesinin gösterilmesi	50
Şekil 4.4. ZT8 zaman diliminde alınan kontrol ve mutant fare karaciğer dokusunda Hamp gen ekspresyon seviyesinin gösterilmesi	50
Şekil 4.5. ZT12 zaman diliminde alınan kontrol ve mutant fare karaciğer dokusunda Hamp gen ekspresyon seviyesinin gösterilmesi	51
Şekil 4.6. ZT16 zaman diliminde alınan kontrol ve mutant fare karaciğer dokusunda Hamp gen ekspresyon seviyesinin gösterilmesi	52
Şekil 4.7. ZT20 zaman diliminde alınan kontrol ve mutant fare karaciğer dokusunda Hamp gen ekspresyon seviyesinin gösterilmesi	52
Şekil 4.8. Gün içerisinde değişen zaman dilimlerinde kontrol grubu arasında anlamlı bulunan Hamp gen ekspresyon seviyesinin değişiminin gösterilmesi	54

Şekil 4.9. Kontrol ve mutant örneklerin gün içerisinde değişen zaman birimlerinde Hamp ekspresyon seviyelerinin gösterilmesi	54
Şekil 5.1. Kontrol grubunda Hamp ekspresyonunun gün içindeki değişimi	59
Şekil 5.2. Mutant grubunda Hamp ekspresyonunun gün içindeki değişimi	60

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Temel biyolojik saat çeşitleri	31
Çizelge 3.1. Kullanılan kimyasal maddeler ve materyaller	34
Çizelge 3.2. Zeitgeber zaman biriminin hesaplanması	39
Çizelge 3.3. Multipleks Real-Time PCR karışımı (25 µl için.....	45
Çizelge 4.1. Karaciğere spesifik Tip60 kontrollü nakavt ve kontrol grubu fare karaciğer dokularında Hamp gen ekspresyon seviyelerinin istatistiksel sonuçlarının gösterimi	48
Çizelge 4.2. Tukey çoklu karşılaştırmalı test sonuçları	53
Çizelge 5.1. Hamp gen ekspresyon seviyesi üzerine etki eden faktörler.....	60

1. GİRİŞ

Yer kabuğunda ve özellikle çekirdekte yoğun olarak bulunan demirin biyolojik önemi eski çağlardan beri bilinmektedir. Ancak demirin özellikle son on yılda emilimi, depolanması, moleküler kontrolü ve hücre döngüsündeki rolü yeni bulunan proteinlerle anlaşılabilmiştir. Demir pek çok canlı ve insan için yaşamsal öneme sahip temel bir elementtir. Elektron alıp verme özelliği nedeniyle oksijen taşınmasında, enerji yapımındaki birçok enzimin katalizlenmesinde, bağışıklık sisteminde, deoksiribonükleik asit (DNA), ribonükleik asit (RNA) ve protein sentezinde önemli fonksiyonları vardır (Ganz 2004, 2007).

Bu önemli elementin vücuttaki homeostazisinin sağlanmasının, karaciğerde hepatositlerinden sentezlenen, demir metabolizmasını ve vücutta demir dağılımını düzenleyen peptid yapısındaki hepsidin hormonu kontrolünde gerçekleştiği son yıllarda keşfedilmiştir (Pigeon *et al.* 2001).

Ağırlıklı olarak karaciğerde sentezlenen, 2-3kDa molekül ağırlığında, sisteince zengin, disülfid köprüleri içeren ve küçük katyonik bir peptid hormon olan hepsidin, günümüzde demir homeostazisinin düzenlenmesinde temel hormon olarak kabul edilmektedir (Park *et al.* 2001; Nemeth *et al.* 2006; Fleming and Bacon 2005).

Demir metabolizmasındaki düzensizlikler Alzheimer, Parkinson, Herediter hemakromatosis, Beta-talasemi, demir eksikliği anemisi gibi çeşitli durumlara ve serbest halde bulunan toksik demirin hücre içinde birikmesiyle de organ yetmezliklerine neden olabilmektedir (Johannesson *et al.* 2012; Ganz 2004, 2007; Andrews 1999).

Amiloid Prekürsör Protein (APP), Alzheimer hastalığının patolojisinde yer alan ve nöronlarda ekprese olan büyük glikoprotein yapısında transmembran yerleşimli yaygın bir proteindir (Kinoshita *et al.* 2002; Cao and Sudhof 2001, 2004; Sumioka *et al.* 2005).

APP'nin CP benzeri bir ferooksidaz olduğu ve dolayısıyla nöronal demir eksportunda görev aldığı gösterilmiştir (Duce *et al.* 2010). APP'nin ferooksidaz aktivitesi ferroportin-seruloplazmin ilişkisine benzer şekilde demir taşınmasına yardım eder (De Domenico *et al.* 2007).

APP'nin HEK293T hücreleri ve kortikal nöronlar gibi CP bakımından yoksun belli hücrelerde ferooksidaz aktivitede rol oynadığı gösterilmiştir (Duce *et al.* 2010).

APP, spesifik sekretazlar ile proteolitik ayrılmalar yoluyla işlenmektedir. Bu işlenme sonucunda transkripsiyonel düzenlenmelerde yer alan 'APP hücreler arası domain' (AICD) gibi küçük sitoplazmik peptidlerin yanı sıra Alzheimer hastalarında oluşan plaklarda biriken amiloid- β peptidler oluşmaktadır. AICD'ler TIP60 ile bir kompleks oluşturmaktadır (Cao and Sudhof 2001, 2004; Sumioka *et al.* 2005; Telese *et al.* 2005).

Lisin asetiltransferazlar, MYST (MOZ, Ybf2/Sas3, Sas2 ve Tip60) enzim ailesini de içeren birkaç kategoriye ayrılmaktadırlar. MYST enzim ailesinin üyeleri gen regülasyonu, DNA hasar tamiri, dozaj kompensasyon ve tümörögenesiz gibi çok geniş bir aralıkta biyolojik aktiviteye sahiptirler (Utley and Cote 2003).

TIP60 ile beraber MYST enzim ailesinin birçok üyesi lösince zengin bölge, kromo çinko parmak bölgesi ve histon asetil transferaz (HAT) domainleri içermektedir (Gaughan *et al.* 2001; Doyon and Cote 2004).

Histon asetiltransferaz TIP60 (Tat interaktif Protein 60kDa), MYST enzim ailesinden en iyi karakterize edilen enzimdir (Sternier and Berger 2000). TIP60 ilk olarak HIV (Human immunodeficiency virüs)-1 Tat interaktif protein olarak karakterize edilmiştir (Kamine *et al.* 1996).

Transkripsiyonun düzenlenmesinde TIP60 proteinin rolü; hücre sinyalleri, DNA hasar tamiri, hücre döngüsü ve bu döngüdeki kontrol noktaları ile apoptosis olayınıda içeren

çeşitli süreçlerle ilişkisinin ortaya konulmasıyla açıklığa kavuşturulmuştur (Sapountzi *et al.* 2006).

Alzheimer hastalığında görülen demir düzensizlikleri ve bu düzensizliklerden sorumlu olduğu düşünülen ve transmembran protein olan Amiloid Prekürsör Protein (APP) ile Tip60 histon asetil transferaz geni arasındaki ilişki gösterilmiştir. APP'nin çekirdekteki transkripsiyonunun Tip60'ın aktivasyonu ile ilişkili olduğu belirtilmiştir (Kinoshita *et al.* 2002).

Hayvan genomları, 15.000 (*Drosophila*) ve 25.000 (insan, fare) arasında gen ihtiva ederler; bu genlerin bir kısmı düzenleyici proseslerde gerekli olan proteinleri kodlar. Tip60 geni proteomu düzenleyen genlerden bir tanesidir ve bu genin fonksiyon gösterdiği birçok metabolik yol açıklanmıştır. Histon asetiltransferaz (HATs) MYST protein ailesinin bir üyesi olan TIP60'ın, metabolizmada DNA hasar tamiri, hücre döngüsü, apoptosis ve APP ile etkileşim gibi birçok fonksiyonu olduğu bilinmesine karşın demir metabolizmasındaki rolü hakkında herhangi bir bilgi üretilmemiştir. Dolayısıyla TIP60'ın demir metabolizmasını düzenleyen hepsidin hormonu üzerinde herhangi bir fonksiyonunun olup olmadığı hakkında bugüne kadar yayımlanmış bir bilgi bulunmamaktadır.

Bu çalışmada, farenin sadece karaciğerinde silinen Tip60 geninin, karaciğerde sentezlenen ve demir metabolizmasını düzenleyen hepsidin (HAMP) hormonunun gen ekspresyon seviyesi üzerine etkileri ve gün içinde hepsidin hormonunun gen ekspresyon değişimi Real-Time PCR yöntemi ile gösterilmeye çalışılmıştır.

2. KURAMSAL TEMELLER

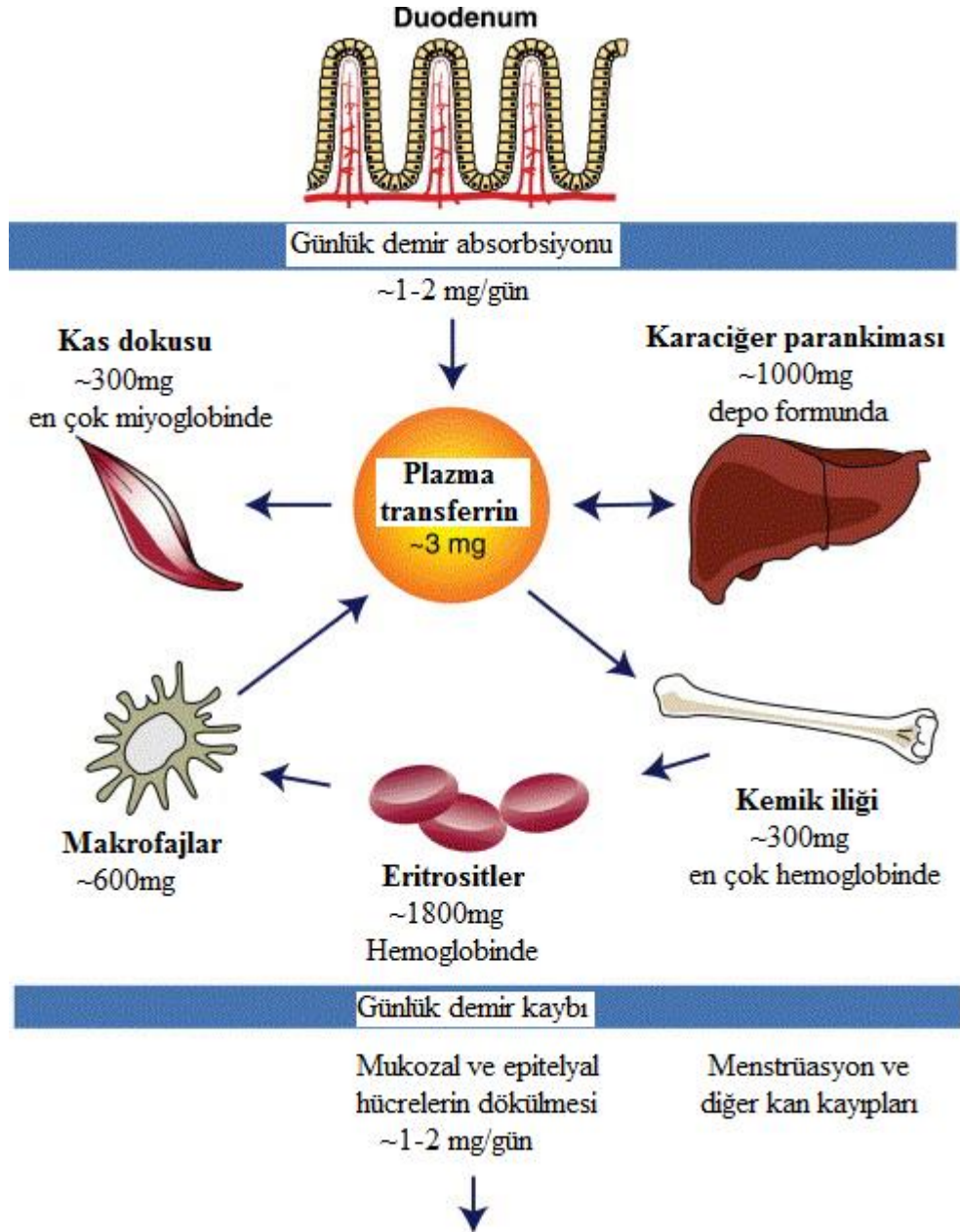
2.1. Demir ve Demir Metabolizması

Latincesi *ferrum* olan demir (Fe), atom numarası 26 olan ve biyolojik önemi eski çağlardan beri bilinen bir elementtir. Pek çok canlı ve insan için yaşamsal öneme sahip olan demir yer kabuğunda ve özellikle çekirdekte yoğun olarak bulunur. Elektron alıp verme özelliği nedeniyle başta oksijen taşınmasında, birçok enerji anabolizması enziminin yıkımında, immün sistemde, hücrenin kalıtsal materyalleri olan deoksiribonükleik asit (DNA), ribonükleik asit (RNA) ve protein sentezinde fonksiyoneldir. Demir metabolizmasının anlaşılması moleküler kontrol yolları ile birlikte demirin emilim, depolanma ve organizma demir döngüsünün moleküler yolları ile ilgili yeni proteinlerin keşfi ile olmuştur (Ganz 2004, 2007).

2.1.1. Demirin vücutta dağılımı

Vücuttaki demir miktarı demirin günlük absorpsiyonunun son derece hassas bir şekilde kontrolü ile düzenlenir (Anderson 2002). Organizmada bulunan demirin yaklaşık %60-70'i hemoglobinin (Hb) yapısında, %10'u miyogloblin, sitokromlar ve demir içeren enzimlerin yapısında bulunurken geri kalan %20-30'u başlıca karaciğer ve retiküloendotelial sistem (RES) makrofajlarında gerektiğinde kullanılmak üzere depolanır. Organizmanın günlük demir kaybı 1-2mg'dır. Bu kayıp gastrointestinal sistem enterositlerinin dökülmesiyle ve deriden dökülen epitelyal hücreler ile kadınlarda menstrüel kanamalar aracılığıyla olur. Bu olayların dışında vücutta demir atılımı fizyolojik olarak mümkün değildir. Günlük olarak diyetle alınan 10-20mg demirin ancak 1-2mg'ı intestinal sistemden emilir. Bunun yanında organizmada demirin geri dönüşümünü sağlayan makrofajlar aracılığıyla yaşanan eritrositlerin yıkımı sonucu demir yeniden kullanıma alınır. Diyetle alınan ve makrofajlardan sağlanan demir, plazmada bulunan demir taşıma proteini olan transferrin (Tf) molekülü aracılığıyla organizmada başta kemik iliği olmak üzere demir gereksinimi olan hücrelere taşınır.

Plazmada birkaç saat içinde yenilenen, hareket halinde yaklaşık olarak 3mg demir bulunur (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Demirin vücutta dağılımı (Papanikolaou and Pantopoulos 2005'den uyarlanmıştır)

Demir hücrelerde ve vücut sıvılarında daima iki oksidasyon formu olan ferrik (Fe^{+3}) veya ferröz (Fe^{+2}) formda bulunur (Andrews 1999). Bu reaktif özelliği nedeniyle, organizmada hem yararlı olan hem de hasar oluşturabilen demirin esansiyel

fonksiyonları yerine getirecek fakat hücre ve dokularda hasar meydana getirmeyecek miktarda alınması için canlılar çeşitli mekanizmalar geliştirmişlerdir (Nemeth and Ganz 2006).

Demir fazlalığında oluşan ve plazmada transferrin molekülüne bağlı olmayan serbest demir, hücreler için son derece zararlı olan serbest oksijen radikallerinin yapılmasına neden olur. Hücre ve dokulara girerek hasara yol açabilen bu demir molekülü nedeniyle organizma demiri hiçbir zaman serbest bırakmamaya çalışır. Demirin hücre sıvıları ve dokulardaki miktarı ve dengesi, intestinal sistem enterositlerinden emilimin ve eritrositlerin fagositozuyla makrofaj bünyesine geçen demirin salınımının kontrol edilmesiyle sağlanır (Andrews 1999).

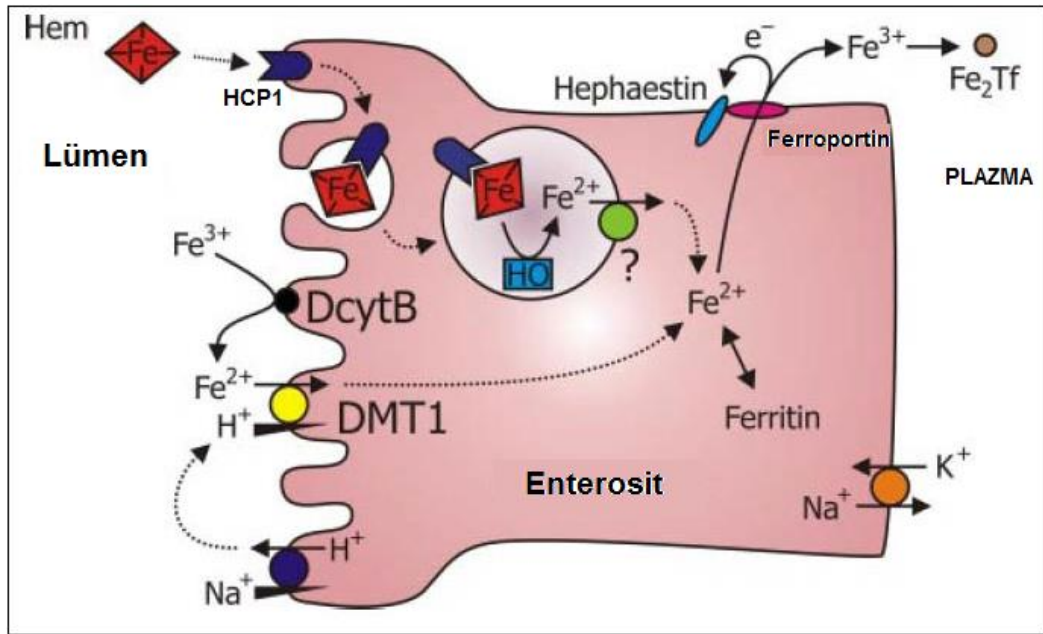
2.1.2. Demir emilimi

Diyet demiri, intestinal sistemden emilimleri farklı yollar izleyen et kaynaklı Hem demiri ve et dışı kaynaklardan alınan non-hem ya da inorganik demir olarak iki şekilde bulunur. Demirin çoğu duodenumdan absorbe edilirken bazı durumlarda mide, ince ve kalın bağırsaktan da absorpsiyonu yapılabilir. Duodenal mukozanın epitelyal hücreleri demirin intestinal sistemden plazmaya taşınmasının düzenlenmesinden sorumludurlar (Santos *et al.* 1997; Shayeghi *et al.* 2005).

2.1.2.a. Hem demirinin emilimi

Demirin büyük bir miktarı hemoglobin, miyoglobin ve demir içeren enzimlerin (katalaz ve sitokromlar gibi) yapısında bulunan Hem demiri formundadır (Conrad and Umbreit 2000). Ette bulunan hemoglobin ve miyoglobin intestinal sisteme girdikten sonra buradaki gastrik ve pankreatik enzimler sayesinde Hem ve globine ayrılır. Daha sonra açığa çıkan Hem demiri mukoza hücreleri tarafından alınır (Conrad *et al.* 1991). Hem kaynaklı demir vücut depo demirini sağlamada çok önemlidir. Ferröz (Fe^{+2}) formda bulunan Hem demiri enterositlere hem taşıyıcı protein (HCP) 1 ve 'heme responsive gene-1' (HRG-1) proteinleri aracılığıyla girer (Rajagopal *et al.* 2008). Son derece

korunmuş olan HCP1'in duodenum ve ince bağırsakta (Shayeghi *et al.* 2005), HGP-1'in ise beyinde, kalpte, böbrekte ve ince bağırsakta ekspresyona uğradığı bulunmuştur (Rajagopal *et al.* 2008). Bu proteinler ile enterosit içerisine alınan hem demiri daha sonra inorganik demirle aynı metabolik yolu kullanarak ya plazmaya geçer ya da hücrede ferritin şeklinde depolanır. Hem demirinin enterositte emilimi ve plazmaya çıkışı Şekil 2.2'de görülmektedir.



Şekil 2.2. Demirin enterosit hücreğine girişi (Mackenzie and Garrick 2005'den uyarlanmıştır)

2.1.2.b. İnorganik (hem dışı) demirin emilimi

Diyetle alınan Hem dışı demirin çoğu ferrik (Fe^{+3}) yapıda olup lümen içi pH'yı düşüren mide asiditesi yardımı ile enterosite alınır (Mackenzie and Garrick 2005). Büyük oranda duodenumda gerçekleşen bu demir emilimi, ferrik (Fe^{+3}) demirin ferröz (Fe^{+2}) demire indirgenmesi, apikal alım, hücre içi depolanma veya hücreler arası etkileşim ve basolateral salınım gibi oldukça karmaşık ve moleküler olarak sıkı bir şekilde kontrol edilen çeşitli basamaklardan oluşmaktadır. Diyetle alınan Fe^{+3} duodenumun fırçası kenarında önce membrana bağlı bir redüktaz olan 'duodenal sitokrom b' (DcytB) tarafından Fe^{+2} şekle indirgenir ve daha sonra 'divalan metal taşıyıcı' (DMT)1

aracılığıyla fırçamsı kenar membranından enterositlere alınır. DMT1, Hem dışı demirin enterosite alımını sağlayan en önemli proteindir ve üretimi demir eksikliği durumunda artmaktadır. Hücreye alınan Fe^{+2} ya ferritin olarak depolanıp gerektiğinde kullanılır veya dökülen enterositlerle atılır ya da bir demir taşıyıcısı olan ferroportin aracılığıyla plazmaya salınmaktadır (Mackenzie and Garrick 2005; Fleming and Bacon 2005).

Hem ve hem dışı demirin plazmaya salınmadan ve seruloplazmin benzeri bir transmembran protein olan hephaestin (Heph) tarafından kanda bulunan demir taşıyıcısı transferin molekülüne bağlanmadan önce ferröz (Fe^{+2}) halden ferrik hale (Fe^{+3}) çevrilmesi gerekmektedir. Fe^{+3} hale gelen demir, transferin molekülüne bağlanarak taşınmaktadır. Demirin, demir depolayan ve transfer eden hücreler olan enterosit, hepatosit ve makrofajlardan çıkışını sağlayan protein olan ferroportin aracılı salınımı demir homeostazisinin önemli bir belirteci olarak gösterilebilir (Fleming and Bacon 2005). Ferroportin genlerinde meydana gelen mutasyonlar demir transferini azaltır veya durdurur (Donovan *et al.* 2005). Sonuçta enterositlerde ağır demir birikimi gelişir. İnorganik demirin enterositte emilimi ve plazmaya çıkışı Şekil 2.2’de görülmektedir.

2.1.3. Demir döngüsü ve depolanması

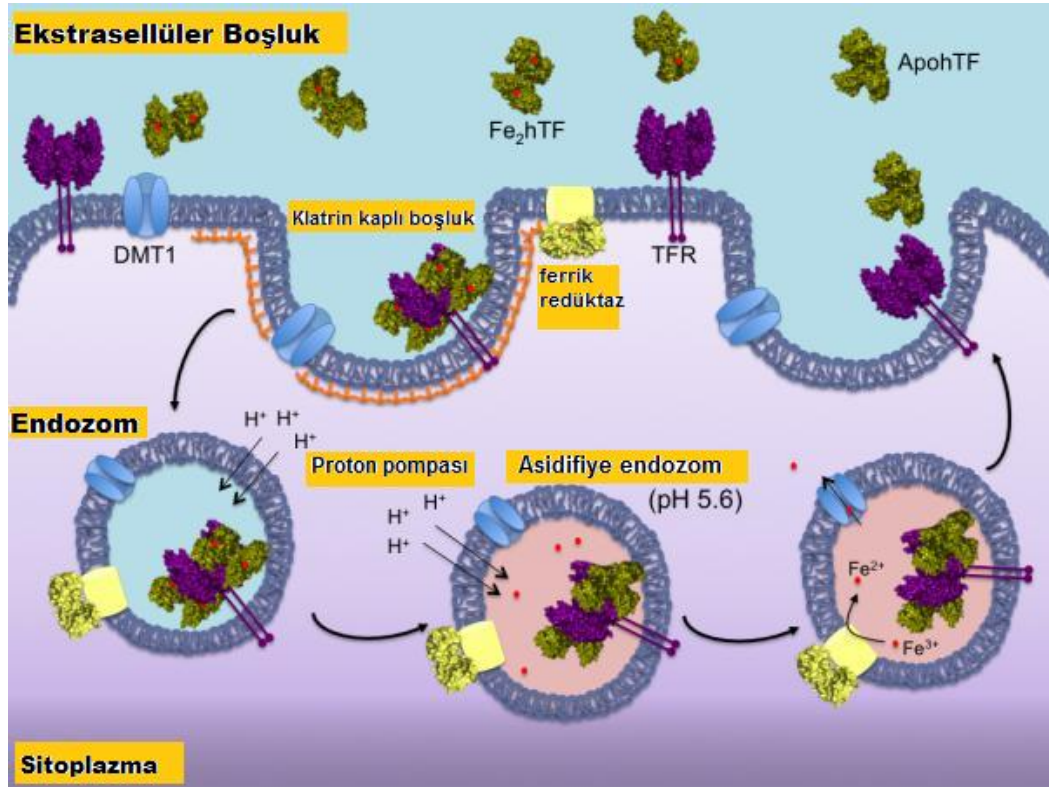
Demir, plazmada karaciğerde sentezlenen 80kDa büyüklüğünde bir glikoprotein olan Tf’e bağlanarak taşınır (Morgan and Baker 1986). Ferroportin tarafından enterositte plazmaya verilen ve hephaestin ile ferrik (Fe^{+3}) hale getirilip transferine yüklenen demir daha sonra kemik iliği, karaciğer ve beyin başta olmak üzere tüm vücut hücrelerine taşınır. Transferrin molekülü, iki tane ferrik (Fe^{+3}) demiri güçlü bir şekilde bağlar. Değişik hücreler demiri farklı yollardan alırlar. Yaşlanan eritrositler özellikle dalak ve karaciğerde makrofajlar tarafından fagosite edilirler ve yapılarındaki Hb’e bağlı bulunan demir fagozom membranından DMT1 yoluyla makrofajlara geçer. Makrofajların içine alınan demir, vücut gereksinimleri göz önüne alınarak ya makrofaj membranında yerleşik ferroportin ile plazmaya verilir ya da makrofaj içerisinde ferritine bağlanarak depolanır (Ganz 2007).

Makrofaj içinde asidik etkiyle ferröz (Fe^{+2}) forma dönüşen demir, karaciğerde sentezlenen ve plazmada bakır bağlayan bir ferroksidaz olan seruloplazmin aracılığıyla tekrar ferrik (Fe^{+3}) hale dönüştürülerek Tf'e yüklenir (Harris *et al.* 1999). Seruloplazmin eksikliği olan hastalarda makrofajlarda demir birikimi ve demir salınımında yetersizlik görülmüş bununla beraber ferroportin eksikliği olan farelerde şiddetli anemi ile makrofajlarda şiddetli demir birikimi olduğu gözlenmiştir (Donovan *et al.* 2005).

Dolaşıma salınan demir, Tf molekülüne bağlanmakta ve demir gereksinimi olan hücreler yüzeylerinde yer alan Transferin reserptörü (TfR) ile bu demiri almaktadır. Tf'in demir bağlama kapasitesi dolduğunda, plazmada Tf'e bağlı olmayan demir (NTBI) oluşur ve bu demir özellikle karaciğer ve kalp hücreleri tarafından kolaylıkla alınabilmektedir. NTBI demir girdiği hücrelerde hasar oluşturabilmektedir. Hepatosit hücreleri, plazmadan TfR aracılığıyla aldıkları demiri depolamakta ve gerektiğinde ferroportin aracılığıyla tekrar dolaşıma vermektedirler. Hepatositlerin diğer hücrelere oranla serbest demiri alma oranları yüksektir ve diğer hücrelere göre daha düşük ferroportin içerikleri nedeniyle demir depolanmasında önemli bir bölge haline gelmişlerdir (Abboud and Haile 2000).

Plazmada Tf'e bağlı iki atom demirin oluşturduğu differrik Tf ($\text{Fe}_2\text{-Tf}$ veya holotransferrin), hücre membranında, hücre içi demir gereksinimine göre belirlenmiş miktarda bulunan TfR'ne bağlanarak hücre içine girmektedir. Oluşan Tf-TfR kompleksi hücre içine alınmaktadır. Daha sonra bir endozom oluşturularak bu endozom içine proton pompası yardımıyla alınan hidrojen (H^+) iyonları tarafından, endozom içi pH düşürülmektedir. Oluşturulan asidik etkiyle transferrin molekülü demirden ayrılmakta ve başta ferrik (Fe^{+3}) formda olan demir tekrar ferröz (Fe^{+2}) forma dönüştürülmektedir. Tf'den ayrılan ve ferröz (Fe^{+2}) forma gelen demirin DMT1 yoluyla endozomal membrandan sitoplazmaya geçişi gerçekleşmektedir. Sitoplazmaya geçen demir ya mitokondride Hem sentezinde ya da diğer metabolik işlerde kullanılmakta veya ferritin şeklinde depolanmaktadır. Bağladığı demiri bir endozom yardımıyla hücre içerisine bırakmış apotransferrin (apo-Tf)-TfR kompleksi hücre yüzeyine gönderilmekte ve Tf

yeniden kullanılmak üzere plazmaya salınmaktadır (Michelle *et al.* 2006; Steere *et al.* 2011) (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. Plazmadan demirin hücre içine alınması (Steere *et al.* 2011'den uyarlanmıştır)

2.1.4. Organizmada demir dengesi

2.1.4.a. Hücre içi demir dengesi

Demirin hücre yüzeyinde taşınması, depolanması, kullanımı ile ilgili tüm ana proteinlerin üretimi, hücre içi demir miktarı esas alınarak ilgili proteinlerin mRNA'ları üzerinden düzenlenmektedir (Meyron-Holtz *et al.* 2004; Andrews 2008). Sitoplazmada bulunan 'Iron responsive protein' (IRP), hücresel demir düzeyini algılayarak bu düzenlemeyi yapmaktadır (Mackenzie and Garrick 2005; Meyron-Holtz *et al.* 2004). IRP'ler demir metabolizmasıyla ilgili diğer proteinlerin mRNA'ları üzerindeki 'Iron responsive element' (IRE) bölgelerine bağlanarak çalışmaktadırlar (Mackenzie and

Garrick 2005; Eisenstein 2000). IRE'lere yüksek oranda bağlanma özelliğine sahip iki farklı moleküler formda IRP vardır (IRP1 ve IRP2). Hücre içi demir eksikliği meydana geldiğinde, IRP1 ve IRP2 aktif hale gelerek IRE'lere bağlanırken bu durum demir fazlalığında değişmekte ve IRP1 şekil değiştirerek, IRP2 ise parçalanarak IRE'lere bağlanamaz duruma gelmektedir. Bu şekilde IRP/IRE etkileşimi TfR1 ve DMT1 yapımını artırmasına karşın ferritin, ferroportin ve delta aminolevulinik asit sentetazın yapımını azaltmakta, sonuçta hücreye demir alımının artmasına, demirin plazmaya verilmesinin azalmasına ve demir düzeyinin hücre sitoplazmasında yükselmesine neden olmaktadır. Hücre içi demir fazlalığı durumunda ise, IRP/IRE etkileşimi gerçekleşmeyeceği için TfR1 ve DMT1 mRNA'larının dengesi bozulup yıkımı artarken, ferritin ve ferroportin mRNA'larının üretimi artacaktır. Bu durumun sonunda ise hücreye demir alımı dururken, sitoplazmada bulunan demir ya depolanacak ya da ferroportin yoluyla plazmaya verilecektir (Cooperman *et al.* 2005; Galy *et al.* 2005).

2.1.4.b. Sistemik demir dengesi

Vücut demir düzeyi, normal şartlarda, intestinal sistem kriptlerinde yer alan kript hücreleri tarafından algılanmakta ve daha sonra bu hücreler olgun enterosit haline geldiklerinde önceden programlanan düzeyde emilim yapmaktadırlar (Roy and Enns 2000).

Organizma sistemik demir dengesinin ise eritropoetik regülatör ve depo regülatörü olmak üzere iki düzenleyici tarafından kontrol edildiği düşünülmektedir (Ganz 2004, 2007; Andrews 2008). Eritropoetik regülatörün kemik iliğinden gelen sinyallerle çalıştığı düşünülmekte ve eritropoetik aktivitenin çok arttığı durumlarda demir depoları dolu olsa bile intestinal sistemden demir emilimi artmaktadır. Depo regülatörü de karaciğer, iskelet kası ve plazmadaki demir miktarının azaldığını algılayarak intestinal sistemden demir emilimini artırmaktadır. Eritropoetik regülatör, aktif demir emilimini depo regülatörüne göre çok daha fazla etkilemektedir. İnflamasyon ve hipoksi ise bu iki regülatöre ilaveten organizma sistemik demir dengesi üzerine etki eden diğer faktörlerdir (Kemna *et al.* 2008; Ganz 2004, 2007; Andrews 2008).

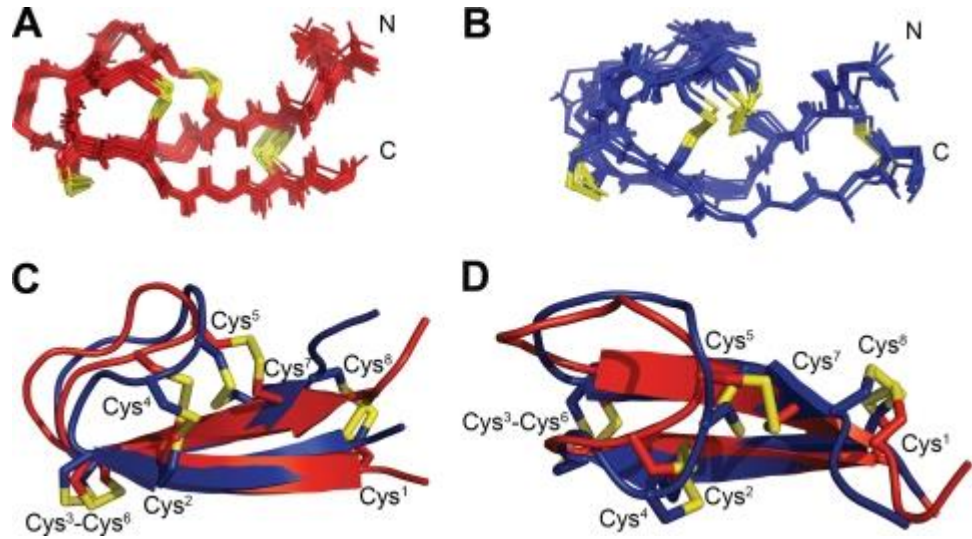
2.1.5. Hepsidin keşfi ve yapısı

Hepsidin, 2000 yılında Krause ve arkadaşları tarafından plazma ultrafiltratından izole edilerek karaciğerde çalışan antimikrobiyal peptid (liver expressed antimicrobial peptide- LEAP-1) olarak adlandırılmış, eş zamanlı ancak bağımsız olarak 2001 yılında ise Park ve arkadaşları tarafından idrarda karaciğer kaynaklı ve *in vitro* antibakteriyel özelliklere sahip yeni bir peptid olarak bulunmuş ve hepsidin (hepatic bactericidal protein) olarak adlandırılmıştır (Park *et al.* 2001; Krause *et al.* 2000). Diyetle demir yüklenen farelerin karaciğerinde hepsidin mRNA'sının aşırı ekprese olduğunun gözlenmesiyle de demir dengesindeki rolü anlaşılmıştır (Pigeon *et al.* 2001).

Ağırlıklı olarak karaciğerde sentezlenen, 2-3kDa molekül ağırlığında, sisteinden zengin, disülfid köprüleri içeren ve küçük katyonik bir peptid hormon olan hepsidin, günümüzde demir homeostazisinin düzenlenmesinde temel hormon olarak kabul edilmektedir (Park *et al.* 2001; Nemeth *et al.* 2006; Fleming and Bacon 2005).

Hepatositlerde, 84 amino asitlik pre-propeptid (pre-prohepsidin) şeklinde sentezlenen hepsidin, farede 7., insanda ise 19.kromozom üzerinde yer alan Hamp geni tarafından kodlanır (Pigeon *et al.* 2001; Anderson *et al.* 2007).

Çoklu teknikler kullanılarak, hepsidin yapısının farklı sıcaklıklardaki 4 disülfid bağına da içeren yapısı (Cys¹-Cys⁸, Cys³-Cys⁶, Cys²-Cys⁴ ve Cys⁵-Cys⁷) yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Jordan *et al.* 2009) (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. Hepsidin yapısı (Jordan *et al.* 2009)

* Düşük sıcaklıktaki NMR yapısı (A), yüksek sıcaklıktaki NMR yapısı (B), yüksek (kırmızı) ve düşük (mavi) sıcaklık yapılarının üst üste bindirilmesiyle oluşturulan yapısal grupların gösterimi (C), 90 derecelik alternatif açıyla gösterimi (D).

2.1.6. Hepsidin biyolojik işlevleri

Hepsidin bilinen işlevleri arasında antimikrobiyal işlev ve demir düzenleyici işlev yer almaktadır (Başol vd 2007). İnsan hepsidini, *in vitro* olarak yüksek konsantrasyonlarda antibakteriyel ve antifungal özellikler göstermektedir. Antimikrobiyal etkisini mikroorganizma membranında hasar meydana getirerek ve inflamasyonda serum demirini düşürüp mikroorganizmalara uygunsuz bir çevre oluşturarak göstermektedir (Kemma *et al.* 2008; Rivera *et al.* 2005).

Hepsidin demir düzenleyici işlevi ise transgenik fare modelleriyle yapılan çalışmalarda hepsidin eksikliği ve fazlalığının etkileri çalışılarak ve fare hepsidin düzeyinin, bağırsakta demir emiliminin, plasentadan demir taşınmasının ve makrofajlardan demir salınımının negatif düzenleyicisi olduğu gösterilerek anlaşılmıştır (Roy and Enns 2000).

Hepsidin intestinal sistem enterositlerinden demir emilimini azaltır, yaşlanan eritrositlerin fagositozu yoluyla makrofajlar tarafından geri kazanılan demirin plazmaya

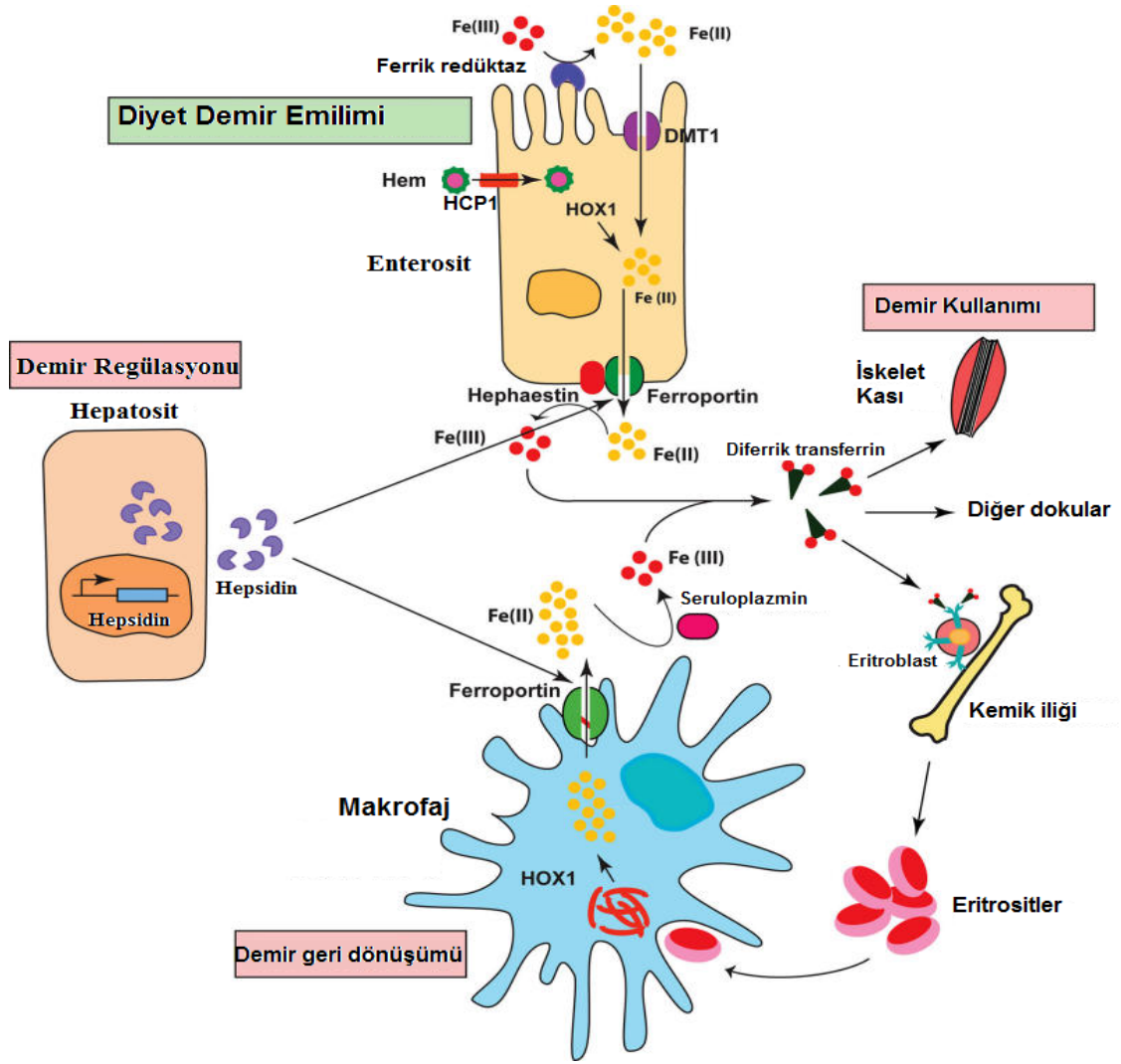
çıkışını ve karaciğerde bulunan demir depolarından demirin mobilizasyonunu engeller (Ganz 2003; Nemeth *et al.* 2004). Hepsidin eksikliği, demir emiliminde artışa ve aşırı demir depolanmasına yol açarken, hepsidin aşırı salınımının olduğu durumlarda ise demir eksikliği meydana gelmektedir (Donovan *et al.* 2005).

2.1.7. Hepsidin ferroportin ilişkisi

İlk kez 2000 yılında tanımlanan transmembran yerleşimli bir protein olan ferroportin (FPN), demirin hücreden plazmaya geçişini ve bir ferrokسيداز olan hephaestin'in yardımıyla plazmada bulunan Tf'e bağlanarak taşınmasını sağlamaktadır (Rossi 2005; Donovan *et al.* 2005). Hepsidin reseptörü olan ve dokulardan demir salınımını sağlayan ferroportin, özellikle hepatositlerin, duodenal enterositlerin, makrofajların, embriyonik ve plasental hücrelerin yüzeyinde bulunmaktadır (Nemeth and Ganz 2006). Hepsidin ferroportin ile etkileşime geçerek hücre sel demir çıkışını düzenlemektedir (Rossi 2005). Hepsidin direkt olarak ferroportine bağlanır ve onun hücre içerisine alınarak internalizasyonuna yol açar. Bu şekilde ferroportinin hücre membranından uzaklaştırılması hücre sel demir çıkışını durdurmaktadır (Nemeth *et al.* 2003).

Karaciğer hepatositlerinde, hepsidin üretimi, vücutta yeterli veya yüksek demir depolarının bulunduğu durumlarda artarak, enterositlerin ve makrofajların yüzeyinde bulunan ferroportinin kaybına neden olur ve demirin hücrelerden plazmaya geçişini engeller. Sonuçta intestinal sistemden demir emilimi azalır, enterositler ve makrofajlarda demir birikimi artar, plazmaya daha az demir çıkar, Tf molekülüne bağlanarak hücrelere giden ve eritrosit yapımına katılan demir miktarı azalır (De Domenico *et al.* 2005; Schimanski *et al.* 2005). Vücutta demir depolarının düşük olduğu durumda ise hepatositlerden hepsidin üretimi azalarak, ferroportinin plazmaya demir sağlayan hücrelerin yüzeyinde artmasına neden olur. Bu durumun sonucunda ise demirin plazmaya çıkışı hızlandırılarak vücut demir gereksinimi sağlanır (Ganz 2005, 2006).

Vücutta demir homeostazisinin oluşturulmasında hepsidin ferroportin ilişkisi çok önemli bir yere sahiptir (Bkz. Şekil 2.5).



Şekil 2.5. Hepsidin ferroportin ilişkisi

2.1.8. Hepsidin üretiminin düzenlenmesi

Plazma demir düzeyinin ve dokulardaki demir depolarının artışı ile hepatositlerde sentezi uyarılan hepsidin, duodenal enterositlerden ve makrofajlardan plazmaya demir salınımını azaltarak, plazma demirinin sabit bir aralıkta tutulmasını sağlarken, aşırı demir emilimini ve dokularda demir birikmesini önlemektedir (Anderson *et al.* 2007). İnflamasyon, hepsidin proteinin neden olduğu ve hipoferremi ile sonuçlanan bir

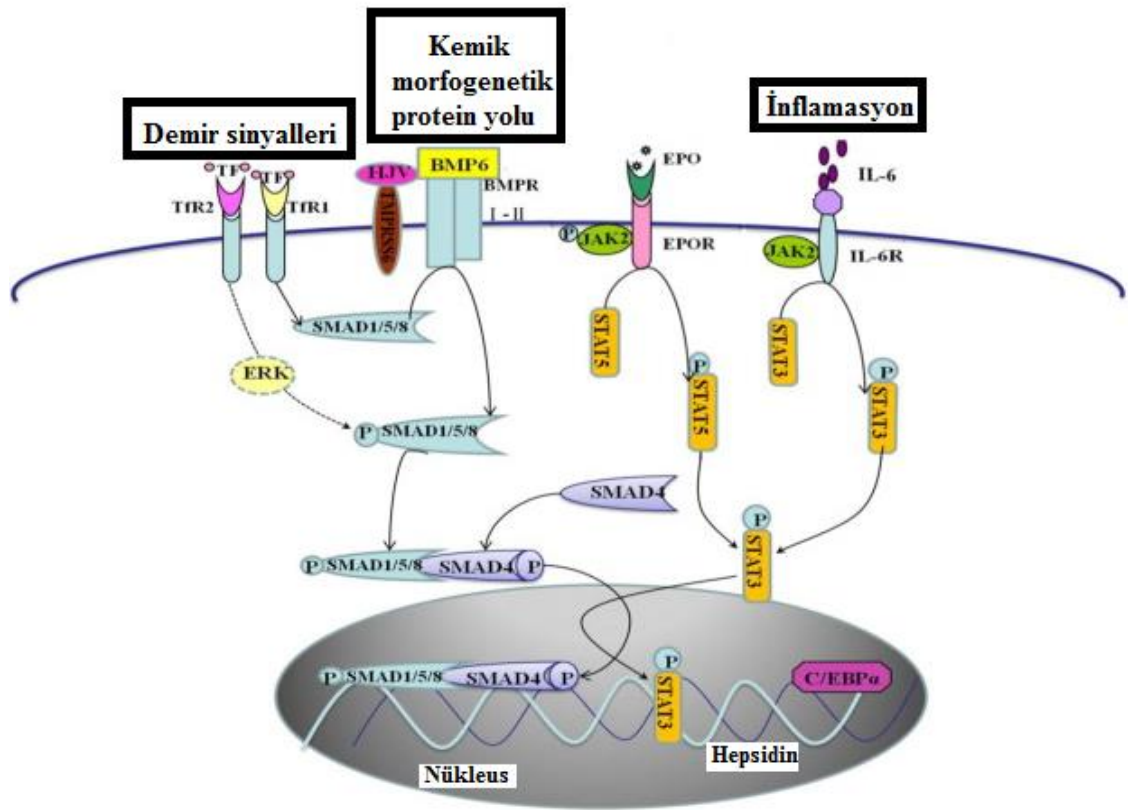
durumdur. İnterlökin 6 (IL-6) hepsidin yapımını artırmakta, IL-6 eksikliği ise azaltmaktadır (Nemeth *et al.* 2004).

İnflamasyon durumunda IL-6 salınarak reseptörüne bağlanmakta ve IL-6 ligand reseptör ilişkisi Janus kinazların (JAK) aktivasyonuna yol açmaktadır. Aktive olan JAK'lar 'Signal transducer and activator of transcription' (STAT) proteinlerinin fosforilasyonuna neden olmaktadır. STAT proteinlerden özellikle fosforilasyon sonucu aktif hale gelen STAT 3, hücre çekirdeğine gider ve Hamp geninin transkripsiyonunu uyarak, hepsidin üretimini arttırır (Ganz 2003). STAT 3 artışının IL-6 artışından bağımsız olarak da hepsidin artışına neden olduğu ve yine STAT 3 baskılandığı durumlarda hepsidin sentezinin gerçekleşmediği gösterilmiş ve buradan yola çıkılarak STAT 3'ün inflamasyonda görülen hepsidin artışında önemli rolü olduğu anlaşılmıştır. IL-6'nın yanı sıra IL-1'inde hepsidin düzenleyicisi olduğu fare hepatositlerinde yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Lee *et al.* 2005) (Bkz.Şekil 2.6).

Hepsidin üretiminin düzenlenmesinde rol alan diğer bir kritik yol ise 'kemik morfogenetik protein' (BMP) yoludur. Kemik morfogenetik proteinler, 'transforming growth factor beta' (TGF- β) ailesinden otokrin hormonlardır ve bunlar hücre çoğalmasında, farklılaşmasında, dokulara migrasyonda ve apoptoziste önemli düzenleyicilerdir. Kemik morfogenetik proteinler, tip I ve tip II BMP reseptörlerine bağlanarak, R-Smad olarak bilinen hücre içi proteininin fosforilasyonunu gerçekleştirir. Ardından Smad4 aktive olarak hücrenin çekirdeğine girer ve oradaki hedef geni olan Hamp genini aktive eder (Nemeth 2008; Babitt *et al.* 2006; Wang *et al.* 2005; Xiao *et al.* 2007) (Bkz.Şekil 2.6).

Demire hepsidin cevabının gelişmesi plazma Fe₂-Tf yoğunluğunun hepsidini düzenlemesiyle olmaktadır. Fe₂-Tf'in organizmanın demir durumunu algılamasını sağlayan araçları TfR2 ve HFE/TfR1 kompleksidir. Demir miktarı algılayıcısı olan HFE demir eksikliği durumunda TfR1 ile etkileşime geçmekte, ancak bu komplekse Fe₂-Tf bağlandığında HFE serbestleşmektedir. Plazma Fe₂-Tf miktarı arttığında, HFE TfR1'den ayrılarak TfR2 ile etkileşime girmekte ve HFE ve TfR2 kompleksi

membrandaki HJV'yi sabitleştirmektedir. Ardından sHJV miktarı azalmakta ve böylece sHJV'in BMP üzerindeki inhibisyonu engellenerek ve BMP yolağı aktif hale gelerek hepsidin üretimini arttırmaktadır (Lin 2007; Goswami and Andrews 2006; Robb 2004; Nemeth 2005, 2008) (Bkz.Şekil 2.6).



Şekil 2.6. Hepsidin ekspresyonunun düzenlenmesi (Zhang 2012'den uyarlanmıştır)

2.2. Histon Proteinleri

Ökaryotik organizmalarda genetik materyalin yapısı, kromozomu oluşturan DNA'nın çok büyük miktarda oluşu ve ökaryotik DNA'nın çok sayıda proteinle ilişkili oluşundan dolayı virüs ve prokaryot genetik materyalinden daha karmaşık bir yapıdadır. Bu karmaşık ve hücre çekirdeğine oranla büyük genetik materyal hücre içerisine ileri derecede bir düzenli sıkıştırma ve katlanma ile yerleştirilmektedir (Klug 2003). Ökaryotik DNA'nın temel birimleri olan nükleozomlar, kromozomlarda yerleşik DNA

molekölünün lizin ve arginine zengin bazik karakterdeki histon proteinleriyle oluşturduğu komplekslerdir. Histon proteinlerinin yanısıra ökaryotik DNA molekülü transkripsiyon ve replikasyon enzimleri, transkripsiyon faktörleri ve hormon reseptörleri gibi fonksiyonel proteinlerle de birleşmiş halde olabilmektedir. H1, H2A, H2B, H3, H4 olarak 5 çeşit histon proteini vardır ve bunlar bütün ökaryotik organizmalarda benzer yapı ve büyüklüktedir (Keha ve Küfrevioğlu 2004).

Histon moleküllerinin asetilasyon, metilasyon, fosforilasyon ve ADP-ribozilasyon gibi kovalent modifikasyonlara maruz kaldıkları yapılan araştırmalarla gösterilmiştir. Buradan yola çıkılarak DNA yapılanması ve fonksiyonunun düzenlenmesinde transkripsiyon sonrası oluşan histon modifikasyonlarının etkili olduğu anlaşılmıştır (Raphael 2005; Keha ve Küfrevioğlu 2004).

2.2.1. Tip60 histon asetil transferaz

Kromatinin şekil değiştirdiği iki farklı işlem vardır. Bunlardan birinci işlem ATP hidrolizi ile katalizlenen şekillenme kompleksinin oluşumudur. Tanımlanmış ilk yeniden şekillendirme komplekslerinden biri SWI/SNF'dir. İlk olarak 11 alt birimli bir kompleks olarak maya hücrelerinde tanımlanmış ve daha sonra ökaryotlarda da yaygın olarak bulunduğu anlaşılmıştır. Transkripsiyon faktörlerinin yardımı ile yeniden şekillendirme kompleksi özgül gen bölgesine yönlendirilmektedir. Birçok histon asetil transferaz enzimlerinden (HAT) biri tarafından katalizlenen histon modifikasyonu ise bir diğer kromatin yapısını değiştirme işlemidir (Klug 2003).

Asetil transferazlar, asetil CoA'dan ya N-terminal amino asitlerin α -amino gruplarına ya da içindeki lizin rezidülerinin ϵ -amino gruplarına asetil gruplarının transferini katalizleyen enzimlerdir. Ökaryotik proteinlerin çoğunda N-terminal asetilasyonu transkripsiyon sırasında olur. Lizin asetilasyonu, birçok proteinin fonksiyonunu, DNA bağlanmalarını, protein-protein etkileşimlerini, enzimatik aktivite ve stabiliteyi etkileyen bir transkripsiyon sonrası modifikasyondur (Polevoda and Sherman 2002). Asetillenmiş lizin

proteinlerinin en karakterize örneğini histonlar oluşturmaktadır (Strahl and Allis 2000; Turner 2002).

Lisin asetiltransferazlar, MYST (MOZ, Ybf2/Sas3, Sas2 ve Tip60) enzim ailesini de içeren birkaç kategoriye ayrılmaktadırlar. MYST enzim ailesinin üyeleri gen regülasyonu, DNA hasar tamiri, dozaj kompensasyon ve tümör genesiz gibi çok geniş bir aralıkta biyolojik aktiviteye sahiptirler (Utley and Cote 2003). MYST enzim ailesine ait 23-225 kDalton arasında değişen molekül büyüklüğüne sahip yaklaşık 12 enzim tanımlanmıştır. TIP60 ile beraber MYST enzim ailesinin birçok üyesi lüsence zengin bölge, kromo çinko parmak bölgesi ve histon asetil transferaz (HAT) domainleri içermektedir (Gaughan *et al.* 2001; Doyon and Cote 2004).

Histon asetiltransferaz TIP60 (Tat interaktif Protein 60kDa), MYST enzim ailesinden en iyi karakterize edilen enzimdir (Sternier and Berger 2000). TIP60 ilk olarak HIV (Human immunodeficiency virüs)-1 Tat interaktif protein olarak karakterize edilmiştir (Kamine *et al.* 1996). Alternatif splicing sonucu en az üç izoformu (Tip60 izoform 1, Tip60 izoform 2 (Tip60 α) ve Tip60 izoform 3 (Tip60 β)) meydana gelen insan Tip60 geni toplam 14 ekzon içermektedir. Tip60 izoform 2 en iyi karakterize edilen splicing varyantıdır. İntron 1'in translasyonu sonucu oluşan izoform 1, potansiyel olarak farklı fonksiyonlara sahip yeni bir proteini kodlar (Legube and Trouche 2003). Ekzon 5'in çıkarılmasıyla da izoform 3 (Tip60 β) meydana gelmektedir (Ran and Pereira-Smith 2000).

Oluşan Tip60 izoformları dokulardan hücrelere kadar geniş bir yelpazede düşük seviyelerde eksprese olur ve hücre tipine özel fonksiyon gösterirler (Hlubek *et al.* 2001). Tip60 izoform 2 (Tip60 α) bir N-terminal kromodomaini ve bir C-terminal korunmuş MYST domaini içeren 513 (58kDa) amino asit proteini kodlamaktadır. Kromodomainler birçok kromatin düzenleyici proteinlerde bulunmaktadır ve fonksiyonları bilinir. Ancak Tip60 kromodomainin fonksiyonu henüz anlaşılamamıştır (Akhtar *et al.* 2000; Utley and Cote 2003).

Bir katalitik domain olan MYST domaini asetil CoA'ya ve substratlarına bağlanan kısa zincirleri içermektedir. MYST domaini ayrıca asetil transferaz aktivitesi ve protein-protein ilişkileri için gerekli olan bir Cyc-Cyc-His-Cyc çinko parmak içermektedir (Nordentoft and Jorgensen 2003; Xiao *et al.* 2003). TIP60 keşfedildikten hemen sonra histon asetiltransferaz (HAT) aktivitesine sahip olduğu gösterilmiştir. Rekombinant Tip60 H2A, H3 ve H4 çekirdek histonlarını asetillemektedir (Ikura *et al.* 2000). Hücresel Tip60 ise histonların haricinde androjen reseptörler, 'upstream binding transcription factor' (UBF) ve 'myelocytomatosis oncogene c' (c-Myc) gibi transkripsiyon faktörlerini de asetilleyebilmektedir (Gaughan *et al.* 2002; Halkidou *et al.* 2004).

2.2.2. TIP60 kompleksi

TIP60, hücresel işlevlere bağlı olarak uygun bağlanma partnerleri ile geçici kompleksler oluştururken, hücresel TIP60 molekülünün çoğunluğu en az 18 alt birimden oluşan sabit çekirdek multiprotein kompleksi halinde bulunur. Bu şekilde birçok transkripsiyonel işlevleri ve TIP60 fonksiyonuyla ilişkili DNA tamir işlevlerini yerine getirmektedir (Ikura *et al.* 2000).

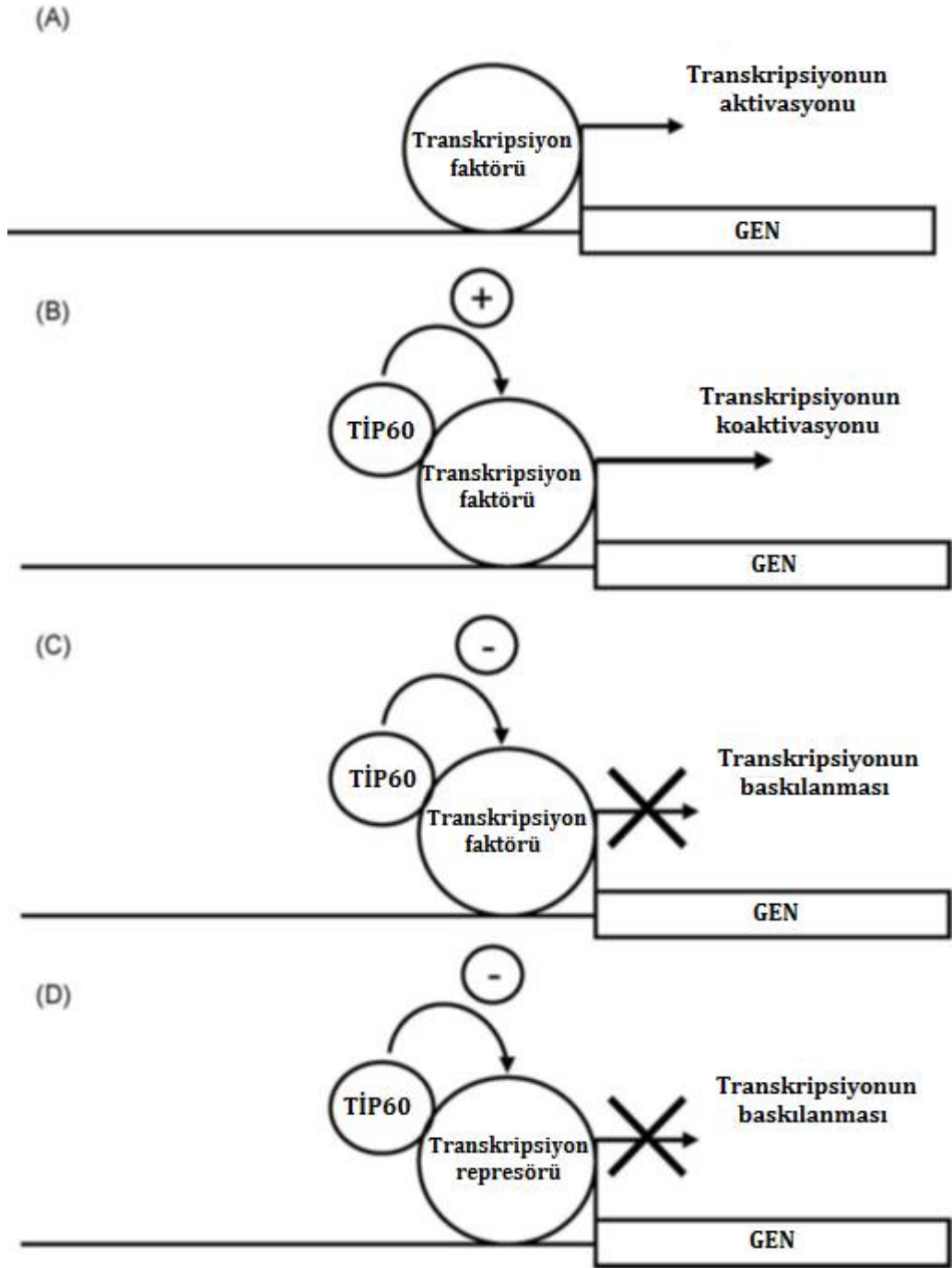
2.2.3. Sitoplazmik TIP60

TIP60 α ve TIP60 β 'nın her ikisi de çekirdekteki süreçlerde yer alan genelde çekirdek proteinleridirler (Cao and Sudhof 2001; Gavaravarapu and Kamine 2000). Fakat bazı durumlarda TIP60 internalize olmuş membran reseptörleri ile ilişkili olarak sitoplazmada lokalize bulunur ve böylece kinaz pathwaylerini ya da gen ekspresyonunu düzenler. Örneğin TIP60'ın fonksiyonel işlevleri interlökin-9 (IL-9) sinyallerini, sitokin proliferasyonunu, büyüme düzenleyicilerini ve apoptosis inhibisyonunu kapsamaktadır. TIP60 sitoplazmada 'signal transducer and activator of transcription 3' (STAT 3) transkripsiyon faktörünün yanı sıra interlökin-9 reseptörü (IL-9R) ile de etkileşim içindedir (Sliva *et al.* 1999; Xiao *et al.* 2003).

Transkripsiyonun baskılanmasında, IL-9'un uyarılmasıyla çekirdekte STAT3- TIP60 kompleksinin harekete geçmesi önemli bir yere sahiptir (Lee *et al.* 2001). TIP60'ın sitoplazmada bulunduğu bilinmesine rağmen çekirdek-stoplazma arasındaki hareket mekanizmaları bilinmemektedir. TIP60 translokasyonunun henüz bilinmeyen spesifik bağlanmalar ile gerçekleştiği, ayrıca sitokinler ve hormonlar gibi çeşitli hücre içi ve hücrelerarası uyarıcılarla düzenlendiği düşünülmektedir (Halkidou *et al.* 2003; Sliva *et al.* 1999).

2.2.4. TIP60'ın transkripsiyon baskılayıcı rolü

Yapılan birçok çalışma ile TIP60'ın gen ekspresyonunu aktive ettiği gösterilmiştir. Ancak TIP60'ın varlığı daima transkripsiyonel aktivasyon ile ilişkili değildir. Alternatif olarak TIP60 belli genlerin ekspresyonlarını aktive ederken diğerlerinin ekspresyonunu baskılamaktadır. Bu durum transkripsiyonda TIP60'ın gene spesifik düzenleyici rolünü desteklemektedir (Şekil 2.7). TIP60 genellikle deasetilazlar gibi diğer bazı komplekleri harekete geçirerek gen baskılanmasında görev alır. 'cAMP response element binding protein' (CREB) ve STAT3 gibi transkripsiyon faktörlerinin baskılanması TIP60 aracılığıyla olmaktadır (Gavaravarapu and Kamine 2000; Xiao *et al.* 2003). CREB, hormonlar ve protein kinaz A (PKA) ile fosforile olan büyüme faktörleri aracılığıyla uyarılan bir transkripsiyonel aktivatördür. TIP60'ın CREB'i baskılaması, doğrudan CREB'e bağlanarak ve PKA ile CREB'in uyarılmasını baskılayarak gerçekleşmektedir (Gavaravarapu and Kamine 2000). STAT3 aktivitesi ise TIP60/HDAC7 kompleksi ile ayarlanmaktadır (Xiao *et al.* 2003). TIP60 ayrıca transkripsiyonel baskılayıcılar ile işbirliği yoluyla gen ekspresyonunu baskılayabilmektedir. 'Zinc finger E box' (ZEB) bağlanma proteini TIP60 ile ilişkili represör bir proteindir ve bu proteinin represör aktivitesi belli hücre tiplerinde TIP60 aracılığıyla uyarılmaktadır (Hlubek *et al.* 2001).



Şekil 2.7. TIP60'ın gen transkripsiyonunu içeren basit modeli (Sapountzi *et al.* 2006)

* Genelde transkripsiyon faktörleri temel transaktivasyon aktiviteye sahiptir (A). Bu aktivite TIP60 ile artırılır (B). TIP60 ayrıca transkripsiyon faktörlerini baskılayarak gen transkripsiyonunu baskılar (C) ya da transkripsiyonel aktivatörlere yardım eder (D).

2.2.5. TIP60 ve Amiloid Prekürsör Protein (APP) ilişkisi

2.2.5.a. Amiloid- β ($A\beta$)

Amiloid Prekürsör Protein (APP), Alzheimer hastalığının patolojisinde yer alan ve nöronlarda eksprese olan büyük glikoprotein yapısında transmembran yerleşimli yaygın bir proteindir (Kinoshita *et al.* 2002; Cao and Sudhof 2001, 2004; Sumioka *et al.* 2005).

APP, spesifik sekretazlar ile proteolitik ayrılmalar yoluyla işlenmektedir. Bu işleme sonucunda transkripsiyonel düzenlenmelerde yer alan APP hücrelerarası domain (AICD) gibi küçük sitoplazmik peptidlerin yanı sıra Alzheimer hastalarında oluşan plaklarda biriken amiloid- β peptidler oluşmaktadır. AICD'ler TIP60, transkripsiyonel protein Fe65, 'nuclear assembly factor SET' ve 14-3-3 γ ile bir kompleks oluşturmaktadır (Cao and Sudhof 2001, 2004; Sumioka *et al.* 2005; Telese *et al.* 2005). Bu kompleks histon asetilasyonunu uyarırken (Kim *et al.* 2004) apoptosis ve nörotoksositeyle ilişkili gen promotörlerini aktive eder (Kinoshita *et al.* 2002). Son yıllarda yapılan çalışmalarla TIP60'ın bu kompleksde bir Fe65 baskılayıcısı olduğu düşünülmektedir (Sumioka *et al.* 2005; Yang *et al.* 2006). AICD'ye benzer şekilde TIP60 ile Fe65 (TIP60/Fe65) birlikte, düşük yoğunluklu 'lipoprotein receptor related protein' (LRP) ve 'amyloid- β precursor like protein 1,2' (APLP1/2) gibi proteolitik ayrılmalar yoluyla işlenen diğer transmembran proteinlerin sitoplazmik parçalarıyla transkripsiyon düzenleyici kompleksleri oluştururlar (Kinoshita *et al.* 2003; Li and Sudhof 2004).

Monomerik $A\beta$ peptidleri (39-43 aa uzunluğunda), β -sekretazlar ve γ -sekretazlar aracılığıyla APP'nin ayrılmasıyla oluşturulur. Bu peptidler bir hidrofilik N-terminal bölge ve bir hidrofobik C-terminal bölgelerden oluşmaktadırlar. Alzheimer hastalarının beyinlerinde bulunan $A\beta$ peptidlerinin yaygın bulunan iki formu $A\beta_{1-40}$ ve $A\beta_{1-42}$ 'dir. $A\beta_{1-40}$ 'dan daha toksik olduğu düşünülen $A\beta_{1-42}$ senil plaklarda baskın olarak bulunan bileşendir (Jakob-Roetne and Jacobsen 2009; Rauk 2009; Hardy and Higgins 1992). Oluşturulan monomerik $A\beta$ türleri çoğunlukla hidrofobik etkileşimler yoluyla birikme

yeteneğindedir (Rauk 2009). Son yıllarda yapılan çalışmalar ile düşük moleküler ağırlıklı oligomerik A β türlerinin, Alzheimer patogenesiyle doğrudan ilişkili olduğu bulunmuş ancak bu türlerin tam olarak yapıları aydınlatılamamıştır (Rauk 2009; DeToma *et al.* 2012; Pithadia and Lim 2012).

Metal iyonlarının vücutta özellikle beyinde önemli rolleri vardır (Scott and Orvig 2009). Bu iyonların homeoatazının ve bölümlere ayrılmasının sürdürülmesi, beyindeki nörolojik fonksiyonlar için gereklidir. Elde edilen bulgular bakır (Cu), çinko (Zn) ve demir (Fe) gibi geçiş metallerinin düşük milimolar konsantrasyonlardaki amiloid plaklarda yüksek mikromolar seviyelerde bulunduğunu göstermiştir (0,4mM Cu, 1mM Zn ve 0,9mM Fe) (Rauk 2009; Scott and Orvig 2009; DeToma *et al.* 2012). Bu gözlemler Alzheimer hastalarının beyinlerinde metal iyon homeostazisinin bozulmasını açıklamak için kullanılmaktadır (Pithadia and Lim 2012).

2.2.5.b. β -Amiloid Prekürsör Protein (APP)'nin demir taşıyıcı ferooksidaz aktivitesi

A β , tip I transmembran prekürsör protein (APP)'den henüz bilinmeyen bir fonksiyonla türemiş ve çeşitli parçalara ayrılmıştır. APP mRNA'sının 5' untranslated region (UTR) bölgesi 'Iron responsive element' (IRE) fonksiyonuna sahiptir (Rogers *et al.* 2002). Böylece, APP translasyonu sitoplazmik serbest demir seviyesinden sorumludur ve ayrıca doğal cis-trans demir regülatör sistemde ferritin ve TfR'ne demir regülatör proteinlerin (IRPs) bağlanmasını yönetmektedir (Klausner *et al.* 1993). Hücrel demir seviyesi yükseldiğinde, APP ve demir depolayıcı protein olan ferritinin translasyonu artarken (Rogers *et al.* 2002), hücrelere demir alımından sorumlu TfR RNA'sı düşmektedir (Duce *et al.* 2010).

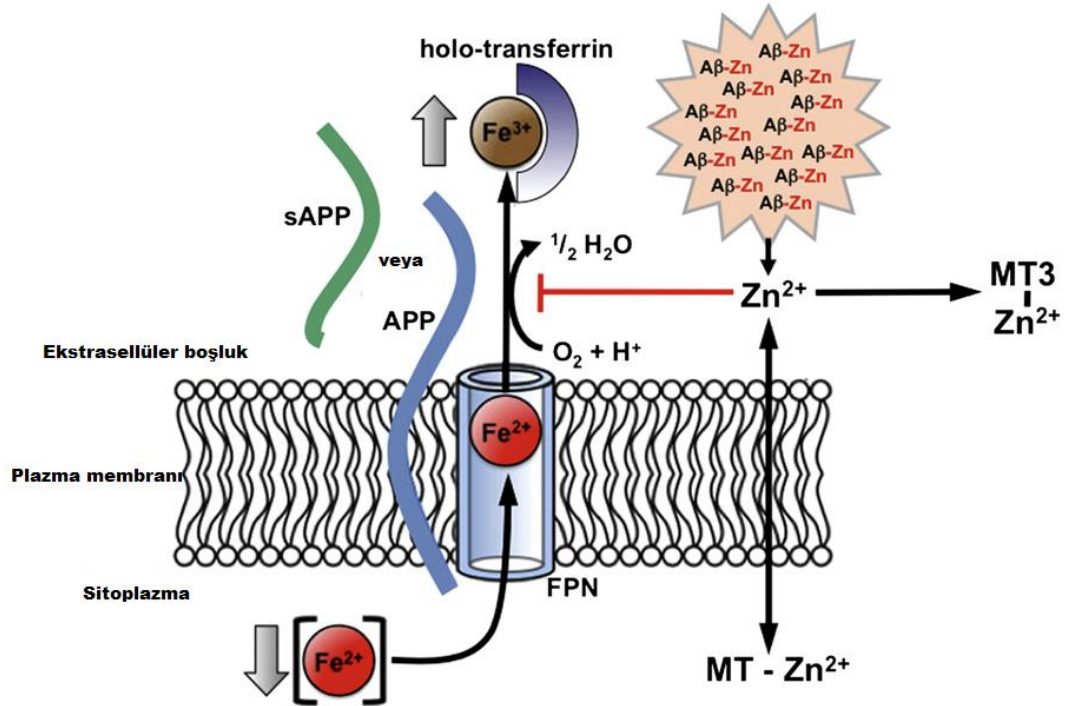
Ferooksidazlar, Fe⁺²'nin Fe⁺³'e yükseltgenmesi ile Fenton ve Haber-Weiss kimyası yoluyla oluşan oksitativ stresi önlemektedirler. Ferooksidaz aktivitenin kaybı patolojik Fe⁺² birikimine ve multicopper ferooksidaz seruloplazmin (CP) mutasyonu ile ortaya çıkan ve gliyal demir birikmesi ve bunama ile sonuçlanan aceruloplasminemia gibi

nörodejeneratif hastalıklara neden olur (Chinnery *et al.* 2007; Harris *et al.* 1995; Mantovan *et al.* 2006; Patel *et al.* 2002).

Demiri hücre içinden dışarıya aktaran ferroksidazlar olan CP ve hephaestin, ferroportinle ilişkilidirler ve ferroportin aracılığıyla sitoplazmadan plazmaya çıkan demirin transferrin ile taşınmasını kolaylaştırırlar (De Domenico *et al.* 2007). Bağırsakiçi epitelyal hücre yüzeylerinde hephaestin, gliyal hücrelerde ise CP ekspresyonu bu hücreler için spesifiktir fakat neokortikal nöronlar için bilinen herhangi bir demir aktaran ferroksidaz tanımlanmamıştır (Klomp *et al.* 1996).

CP'e benzer şekilde APP transmembranlarda ekprese olur ve saklanmış formları vardır. APP'nin CP benzeri bir ferroksidaz olduğu ve dolayısıyla nöronal demir eksportunda görev aldığı gösterilmiştir (Duce *et al.* 2010). APP'nin ferroksidaz aktivitesi ferroportin-seruloplazmin ilişkisine benzer şekilde demir taşınmasına yardım eder (De Domenico *et al.* 2007). Bütün hücrelerde ekprese olan ferroportinin aksine CP bazı spesifik hücelere özgüdür ve dolayısıyla APP'nin HEK293T hücreleri ve kortikal nöronlar gibi CP bakımından yoksun belli hücrelerde ferroksidaz aktivitede rol oynayabileceği düşünülmüş (De Domenico *et al.* 2007; Klomp *et al.* 1996) ve yapılan çalışmalar bunu doğrulamıştır (Duce *et al.* 2010).

APP'nin normal ve çözünabilir türlerinin (sAPP), nöronlar gibi belli hücrelerden demir eksportunu kolaylaştırmak için ferroportin ile etkileşime girdiği ve Zn^{+2} 'nin Alzheimer hastalarında APP ferroksidaz aktivitenin bir inhibitörü olduğu gösterilmiştir (Duce *et al.* 2010) (Şekil 2.8).



Şekil 2.8. APP'nin hücresel demir taşınmasındaki model rolü ve Alzheimer hastalığında inhibisyonu (Duce *et al.* 2010'dan uyarlanmıştır)

* Ferroportin (FPN) Fe^{+2} 'yi sitoplazmadan plazma membranı boyunca taşır. Fe^{+2} daha sonra membrana bağlı veya solübl halde bulunan CP veya APP gibi ferooksidazlar ile Fe^{+3} formuna dönüştürülür. Bu ferooksidaz aktivitenin kaybı ekstrasellüler boşluklarda demir salınımının düşmesine yol açmaktadır. (Fe^{+2} 'nin Fe^{+3} 'e dönüşümü gerçekleşmez). Ayrıca APP ferooksidazlar Alzheimer hastalarında ekstrasellüler Zn^{+2} ile inhibe edilirler.

2.2.6. TIP60 ile APP etkileşiminin nörodejeneratif bozukluklar üzerine etkisi

Histon asetilasyonu ile kromatin yapısının epigenetik düzenlenmesi, zihinsel yetenekler için kritik olan nöroplastisiteden etkilenen nöronlarda koordineli ve dinamik transkripsiyonel cevabı düzenlemektedir (Graff and Mansuy 2009). TIP60, ilk olarak HIV-1 transaktivatör protein ile etkileşimi yoluyla belirlenen bir hücresel asetiltransferaz proteindir (Kamine *et al.* 1996). Transkripsiyonun düzenlenmesinde TIP60 proteinin rolü hücre sinyalleri, DNA hasar tamiri, hücre döngüsü ve bu döngüdeki kontrol noktaları ile apoptosis olayında içeren çeşitli süreçlerle ilişkisinin ortaya konulmasıyla yoğun bir şekilde araştırılmıştır (Sapountzi *et al.* 2006).

Son yapılan çalışmalar ile TIP60 HAT aktivitenin sinaptik plastisitenin düzenlenmesinin yanı sıra nöronal fonksiyonlarda rol alan genlerin transkripsiyonel düzenlenmesi içinde gerekli olduğu gösterilmiştir (Lorbeck *et al.* 2011; Sarthi and Elefant 2011).

Bu bulgularla uyumlu olarak, TIP60, aynı zamanda Amiloid Prekürsör Protein (APP) intraselüler domain (AICD) ile oluşturduğu transkripsiyon düzenleyici kompleks aracılığıyla, Alzheimer hastalığı gibi nörodejeneratif hastalıklarda da rol almaktadır. Oluşturulan bu kompleks, epigenetik olarak gen transkripsiyonunu düzenleyen seçilmiş histon proteinlerini asetilleyen belirli hedef genlerin promotörlerini çalıştırır (Coa and Sudhof 2001; Slomnicki and Lesniak 2008). Bu genlerin bazılarının ekspresyonlarındaki anormallik Alzheimer hastalığının patofizyolojisiyle de ilişkilidir (Baek *et al.* 2002; Muller *et al.* 2007).

Yapılan bu tür çalışmalarla uygun olmayan kompleks oluşumunun, nörojenez için gerekli hedef genlerin, yanlış düzenlenmesi sonucu Alzheimer hastalığına yol açabileceği ileri sürülmüştür. Yine nöronlar arasındaki sinyallerin kesintiye uğramasının ve zihinsel bozulmanın bu hastalığın ilk adımı olduğu gösterilmiştir (Trinchese *et al.* 2008).

In vivo olarak yapılan çalışmada sinir sisteminin gelişimi sırasında Alzheimer ile ilişkili nöronal süreçlerde, APP'nin bozulmasında, TIP60 HAT aktivitenin yanlış düzenlenmesinin doğrudan ya da dolaylı olarak etkili olduğu açıklanmıştır (Pirooznia *et al.* 2012).

Apoptosis ya da programlı hücre ölümleri, hücre ve organların fizyolojik gelişiminde kritik rol oynarken özellikle merkezi sinir sisteminin gelişimi için de önemlidirler (Rouaux *et al.* 2003). Bu süreçlerin yanlış düzenlenmesi, progresif nörodejeneratif hastalıklarda (Alzheimer gibi) ortaya çıkan yanlış zamanlı olarak gerçekleşen spesifik apoptotik hücre ölümlerinin başlatılmasına yol açmaktadır. TIP60 ve AICD apoptosisin başlatılmasında birbirinden farklı ve kritik roller oynarlar. Örneğin TIP60 proteini hücre

döngüsünü durduran ya da apoptosise sürükleyen p53 bağımlı hücre yolaklarını doğrudan ayarlayarak hücre döngüsünün ilerletilmesinde aracı rol oynar. TIP60 bu rolünü ilk aşamada onarılamaz DNA hasarını hissederek daha sonra ise HAT aktivitesi aracılığıyla p53 bağımlı yolakları başlatarak yapar (Tang *et al.* 2006).

İlginç bir şekilde, TIP60 ile AICD fragmentlerinden türeyen γ -sekretaz arasındaki etkileşim, insan beyin ve nöronal hücre modellerinde, p53 ekspresyonunu ve aktivitesini artırarak, p53 bağımlı hücre ölümünü tetiklemektedir (Alves da Costa *et al.* 2006).

İlaveten, H4 nöroglom hücrelerinde AICD'nin ektopik ekspresyonunun belirgin bir çekirdek lokalizasyonuna ve apoptosise neden olduğu gösterilmiş ve ayrıca bu çalışmada APP' nin çekirdekteki transkripsiyonunun Tip60'ın aktivasyonu ile ilişkili olduğu belirtilmiştir (Kinoshita *et al.* 2002).

γ -sekretaz kompleksini oluşturan AICD'nin presenilin proteinindeki mutasyonlar nörodejenerasyonla ve Alzheimer hastalığının gelişimiyle ilişkilidirler (Wolozin *et al.* 1996; Alves da Costa *et al.* 2002).

TIP60 ve APP arasındaki ilişki *in vivo* olarak *Drosophila melanogaster* meyve sineği üzerinde çalışılarak da gösterilmiştir. Bu çalışma sonucunda, TIP60 HAT aktivitesinin sinir sistemi üzerindeki kaybının, APP aracılı lethaliteyi ve bu transgenik sineklerin merkezi sinir sisteminin gelişiminde nöronal apoptotik hücre ölümlerini artırdığı gösterilmiştir. Yine aynı çalışmada, Tip60'ın over ekspresyonunun bu defektleri etkisizleştirdiği de açıklanmıştır (Pirooznia *et al.* 2012).

2.3. Sirkadian Sistem

Dünya üzerindeki yaşam, günlük değişimlerin etkisi altındadır ve yeryüzündeki bütün canlıların hayatta kalabilmeleri için yaşadığı ortamdaki tüm değişimlere uyum sağlaması gerekir. Bu amaçla canlılar yaşadıkları ortama adapte olmak için davranışsal ve fizyolojik cevaplar geliştirmek zorundadırlar. Fizyolojik ve davranışsal tepkilerin 24

saatlik zaman aralıklarında tekrarlanması olayına günlük döngü (sirkadian) denir. Sirkadian, latin kökenli bir kelime olan ve döngü anlamına gelen *circa* ile gün anlamına gelen *dies* kelimelerinin birleşimidir (Dunlap 1999; Panda et al. 2002; Storch et al. 2002). Memeli canlılardaki kalp atışı, uyuma ve uyanma döngüsü, bağışıklık sistemindeki ve metabolizmadaki fonksiyonlar gibi birçok fizyolojik süreç sirkadian sistemin kontrolü altında gerçekleşmektedir (Sensi 1993).

En basit bir hücreli canlıdan insana kadar gelişim ve değişim gösteren biyolojik saatler, canlıların yaşamdan maksimum verim alabilmesini sağlamak için düzenli olarak değişen çevresel değişimleri önceden sezinleyip, vücudu senkronize etmeyi amaçlar (Rensing et al. 2001). İnsanlar gibi diğer canlılarda, yaşadığımız atmosferik çevre ile uyum içinde hayatlarını devam ettirirler. Atmosferik çevrenin değişimi doğadaki her canlı gibi insan vücudunda da değişimler meydana getirir. Vücut metabolizması gün boyunca bir programa ayak uydurur biçimde artan veya azalan ritmik değişikliklere maruz kalır (Eldebiran 2003).

Kişinin biyolojik vücut ritimlerini inceleyen bilim dalına ‘kronobiyoloji’ denilmektedir. Kronos-zaman; bios-yaşam; logos-bilim anlamına gelmektedir (Pittendrigh 1993). Kronobiyoloji, biyolojik ritimlerle ilgilenir ve genel olarak ritim, periyod, sıklık, büyüklük ve faz gibi özellikler gösteren, tekrarlayıcı karakterdeki olaylar olarak tanımlanabilir. Ritimlerin bu özelliklerinin kısa tanımları ise şu şekildedir;

PERİYOD: Ritmin bir döngüsü için geçen zaman.

SİKLİK (Frequency): Birim zamanda tekrarlanan döngü sayısı.

GENLİK (Amplitude): Ortalama değerden sapma miktarı.

EVRE (Phase): Ritmin kendine has özellikler gösteren kısmı

Mimosa pudica (küstüm otu) bitkisi ile 1729 yılında yapılan çalışmayla biyolojik ritimlerin içsel bir mekanizma mı yoksa kendisini çevresel işaretlere göre ayarlayabilen bir sistem mi olduğu anlaşılmaya çalışılmıştır. Bu amaçla, yapraklarını yaklaşık 24 saatlik bir zaman diliminde gündüz açıp gece kapayan *Mimosa* bitkisi tamamen doğal

ortamından farklı, karanlığın sürekli olduğu, çevresel işaretlerden izole edilmiş laboratuvar ortamında muhafaza edilmiştir. Sonuçta bitkinin yapraklarını açıp kapatmaya devam ettiğinin gözlenmesiyle bitkinin bu döngüsünün sadece ışığa bağımlı olmadığı aynı zamanda içsel bir saatin olduğuda ortaya çıkmıştır (Nevo *et al.* 1982).

Canlıların yürüttüğü biyolojik fonksiyonların ritimleri genellikle döngüsel özellik gösteren çevre şartlarıyla eşzamanlı olarak yürür. Bir canlı eğer dış ortamla doğrudan ilişkili ise ve ritimlerini dış dünyadan gelen uyarılara göre düzenleyebiliyorsa, böyle ritimlere, bağlı (entrained) ritimler denir. Eğer canlı laboratuvar ortamında, çevresel uyaranlardan yalıtılmış bir biçimde yetiştirilirse bu durumda tam olarak çevresel uyaranlarla tutarlı olmasa da bir iç ritmi sürdürdüğü görülür. Bu tip ritimlere de serbest (free-running) ritimler denir. Canlıların çevreden aldığı sinyallerin bir kısmı içsel ritimlerini düzenlemesi için bir işaret görevi görür. Örnek olarak ışık ve karanlık canlıların gece ve gündüz göstereceği faaliyetleri ayarlaması için çevresel bir işaret olarak kullanılır. Bunun gibi çevresel işaretlere, zeitgeber (almanca zeit=zaman, geber=verici) veya ritim verici denilmektedir. Bu ritim verici faktörler ayın devri, yılın mevsimleri, güneşin durumu vb. olabilir. Ancak bunların arasında en önemlisi ışıktır. Günlük döngünün düzenli yürümesi vücut içinde bir biyolojik saatle kontrol edildiğini göstermektedir (Pittendrigh 1993; Canan 2001).

2.3.1. Biyolojik saat çeşitleri

Dünyanın dönüşü ile ilişkili olan sirkadian ritme benzer biyolojik saatlerde mevcuttur.

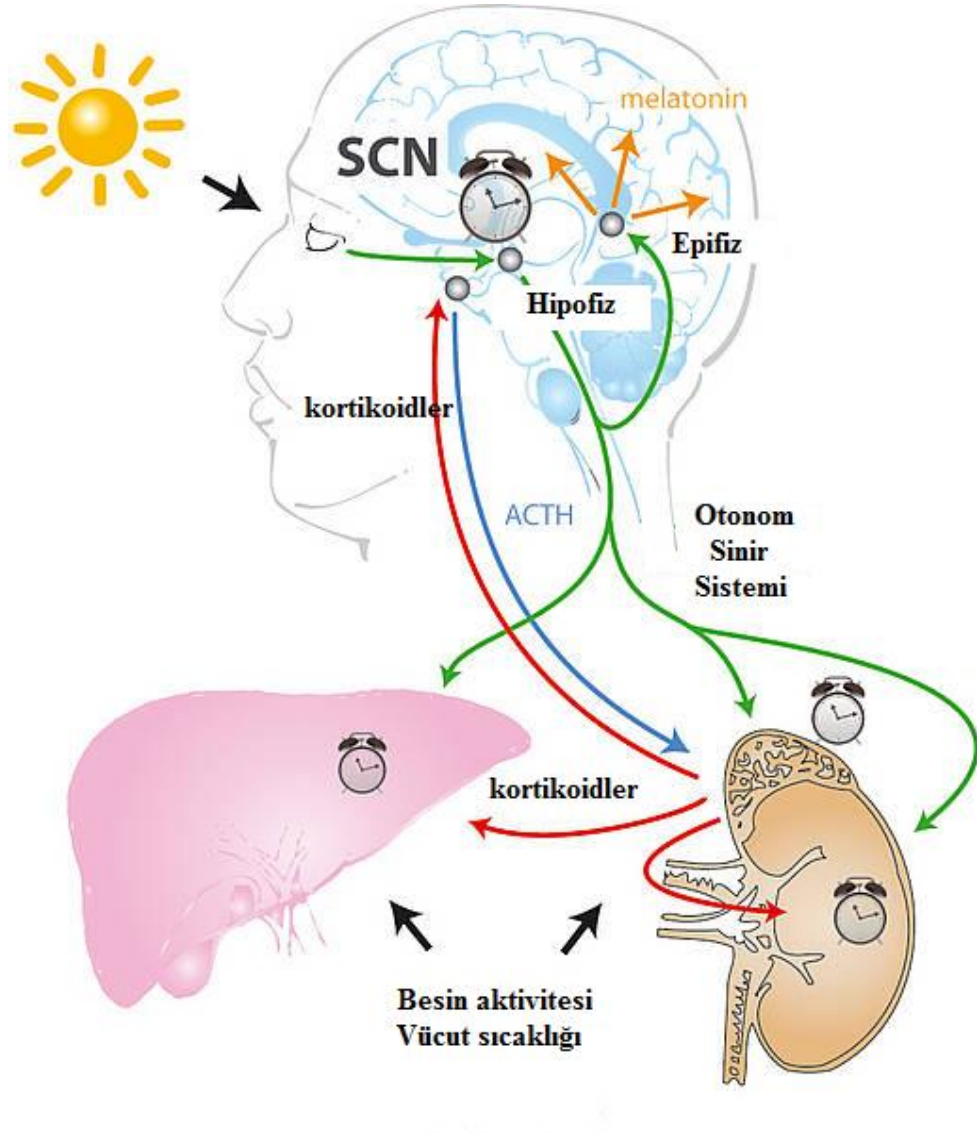
Çizelge 2.1. Temel biyolojik saat çeşitleri (Bunney 2000; Eldebiran 2003)

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

2.3.2. SCN yapısı ve organizasyonu

SCN (suprakiazmatik nükleus); beyin hipotalamusunun ön kısmında yer alan yaklaşık 8000-10000 farklı nöronal elemandan oluşan ve herbir nöronal elemanın kendine ait spesifik özelliği bulunan bir grup sinir hücresi (biyolojik saat merkezi) olarak tanımlanır (Ralph *et al.* 1990) Zamana bağımlı davranışların organizasyonunda çok önemli fonksiyonları olan SCN hipotalamusun tanımlanmasından beri bilinmektedir. Ancak buna rağmen 1970’li yıllara kadar sirkadian sistemdeki fonksiyonu anlayamamıştır. 1970’li yıllardan hemen sonra peşpeşe yapılan çalışmalarda, SCN dokusu lezyona uğratılmış memelilerde, biyolojik saat fonksiyonlarının kaybolmaya başladığı belirlenmiştir (Moore and Eichler 1972; Stephan and Zucker 1972).

SCN, retinadan özel girişler alır ve bunun yanı sıra başta epifiz bezi olmak üzere birçok bölge ile ilişki içerisinde olan üst saat vazifesi görür (Van Den Pol *et al.* 1992). Bu ünlü biyolojik saat merkezi uyku, tansiyon, uyanma, vücut sıcaklığı gibi birçok yaşam ritmini düzenler (Oster 2002) (Şekil 2.9).



Şekil 2.9. SCN'nin senkronizasyonu (<http://circadianrhythms.mpibpc.mpg.de/> adresinden modifiye edildi)

SCN, ışığa bağımlı metabolik olayları iki farklı mekanizma ile koordine etmektedir ve bu mekanizmalar endokrin sistem ve sirkadian ritimin ana enzimlerinin aktivitesinin doğrudan düzenlemesi ile ilişkilidir (Buijs and Kalsbeek 2001). SCN, kısmen beyin epifizinden salgılanan melatonin ile kısmen de hipotalamus yolu ile endokrin sistemi yönetir (Schwartz *et al.* 2001). Uyku düzenini sağlayan melatonin seviyesi gece en yüksek değere ulaşır ve hipofiz bezi üzerinde etkilidir. Ayrıca böbrek üstü bezinden

kortizol hormonunun salgılanmasında ve kontrolünde etkindir. Vücut sıcaklığının gün içindeki değişimlerinden doğrudan hipotalamus sorumludur. Hipofiz bezi, gonadotropik hormon (GH), prolaktin, adrenokortikotropik hormon (ACTH) ve uyarıcı endokrin bezlerden salgılama yapılmasını (yumurtalıklardan cinsiyet hormonlarının salgılaması gibi) sağlar (Goldman 2001).

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Materyaller

Çalışmalarda çizelge 3.1’de belirtilen kimyasal maddeler ve materyaller kullanıldı.

Çizelge 3.1. Kullanılan kimyasal maddeler ve materyaller

Qiazol Lysis Reagent 50 MI	Qiagen
Rneasy Lipid Tissue Mini Kit (50)	Qiagen
cDNA Sentez Kiti	SuperScript III First-Strand (İnvitrogen)
PCR Ekstraksiyon Kiti	Qiagen
FastStart TaqMan Probe Master Mix	Roche
MOPS	Sigma
Formamid	Sigma
Sodyum Asetat (Anhydros)	Carloerba
EDTA	Sigma
DEPC	Sigma
Agaroz	Sigma
Etidium Bromür	Sigma

3.2. Kullanılan Alet ve Cihazlar

1. Su saflaştırma cihazı	:mp MINI Pure
2. Elektroforez	:Sigma Altrich
3. Santrifüj	:Heraeus Spatech
4. Mikrosantrifüj (soğutmalı)	:Hermle Labotechnic
5. Vortex	:Fisons
6. Minisantrifüj	:Aosheng
7. Blok ısıtıcı	:Lab-Line
8. Isıtıcıly manyetik karıştırıcı	:Wisd Wisestir Msh-20 A
9. PCR	:Biorad C1000 Thermal Cyclor
10. Hassas terazi	:Denver
11. Nanodrop	:Termo
12. Qiacube RNA izolasyon robotu	:Qiagen
13. Otomatik pipet takımı	:Eppendorf
14. Güç kaynağı	:TermoEC EC 135-90
15. pH Metre	:Mettler Toledo
16. Derin dondurucu (-86)	:New Brunswick Premium U410
17. Çekerocak	:Space Series Fume Cupboard
18. Buzdolabı	:Bosch
19. Otoklav	:Hmc Hırayama
20. Kar makinesi	:ScotsmanAF80
21.Yatay elektroforez	:Sigma
22. Real-Time PCR	:Strategene
23. Homojenizatör	:TissueLyser II
24. Çeşitli cam malzemeler (beher, ölçü silindiri, erlenmayer vs.)	
25. Mikrodalga fırın	:Beko MD 1500
26. UV görüntüleme cihazı	:Becman Coulter
27. Steril kabin	:Space Series Fume Cupboard

3.3. Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

1. 20X MOPS Çözeltisi: 41,9g MOPS, 4,1g sodyum asetat ve 2,6g EDTA 350ml DEPC suda çözdürüldü. NaOH ile pH 7'ye ayarlandı. 500ml'ye tamamlanıp otoklavlandı. +4°C'de saklandı.

2. DEPC (Dietil pirokarbonat)'li su: 1ml DEPC alındı, 800ml dd su ilave edildi. Hacim dH₂O ile 1000ml'ye tamamlandı. 1 gece oda sıcaklığında bekletildi. Daha sonra otoklavlanarak oda sıcaklığında saklandı.

3. Jelde yürütülecek RNA çözeltisi: 1µl izole edilen RNA 3,5µl ddH₂O, 0,5µl MOPS solüsyonu, 5µl formamid karıştırılarak 65°C'de 15dk inkübasyona bırakılarak hazırlandı.

4. %0,9'luk izotonik çözelti: 0,9g NaCl alınıp hacmi 100ml'ye tamamlanarak hazırlandı.

3.4. Tip60 Geninin Karaciğer Spesifik Silinmesi

Genomik DNA üzerinde, hedeflediğimiz bölgeyi, istediğimiz hücre tipinde, istediğimiz zaman silebilmek için Cre/LoxP sistemi kullanıldı. Bu sistemde kullanılan Cre rekombinaz enzimi lox P olarak adlandırılan 34 baz çiftlik dizilimi spesifik olarak tanır. Bir gen üzerinde silmek istenen bölge iki lox P dizilimi arasına alınır. Cre rekombinaz enzimi o kısmı karşılıklı olarak silmeyi katalizler. Bu özelliğinden dolayı Cre/lox sistemi ökaryotik canlılardaki gen manüplasyonlarında kullanılan çok kullanışlı bir tekniktir.

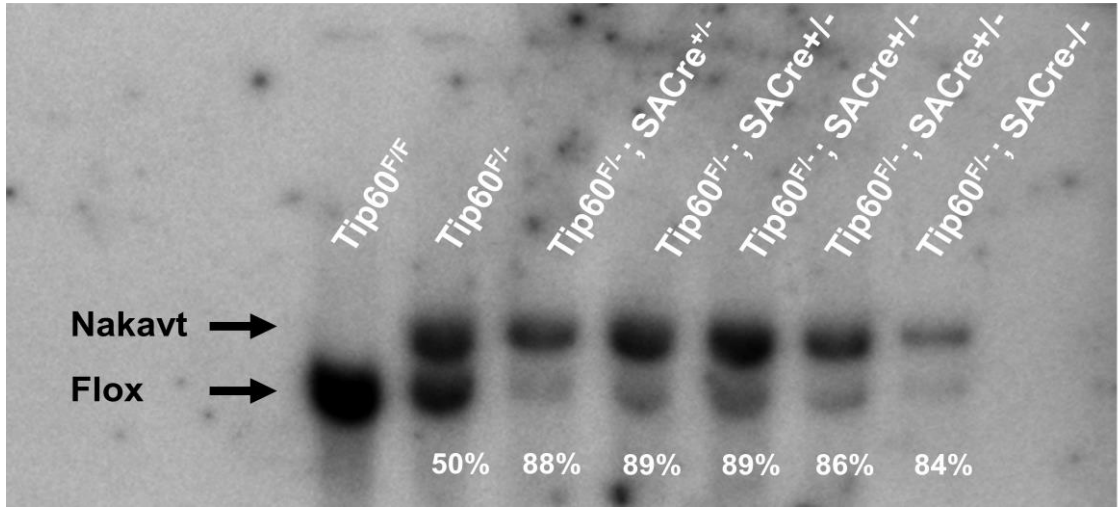
Tip60 genini spesifik olarak karaciğerde silinmesi ve dokuların Aschoff tip2 protokolüne göre farklı ZT zaman birimlerinde toplanması basamaklarının tamamı Prof. Dr. Gregor Eichele'nin laboratuvarında (Max-Planck Institute for biophysical Chemistry,

Department of Genes and Behavior Göttingen/ALMANYA) Dr. Harun Budak tarafından yapılmıştır.

Tip60 geni üzerinde silinmesi hedeflenen kısımlardan ekzon1'in önüne ve ekzon 9'un arkasına LoxP (locus of X over P1) dizilimi yerleştirildi. Böylece Cre rekombinazlar kullanılarak hedeflediğimiz ekzon 1-ekzon 9'luk bölgelerde silme yapma imkanımız olacaktır.

Tip60 genini sadece karaciğer dokusuna spesifik olarak silmek için Tip60^{F/-};SA^{+/Cre} genotipinde olan fareler kullanıldı. Karaciğerde kuvvetli ve spesifik olarak eksprese olan SA (serum albumin) geninin promotorunun kontrolü altında eksprese olan Cre rekombinaz Tamoxifen tarafından indüklenmektedir (tamoxifen-inducible Cre recombinase).

Tip60^{F/-};SA^{+/Cre} genotipindeki fareler, tamoxifen enjekte edilen ve kontrol grubu olarak 2'ye ayrıldı. Mısır yağı içerisinde çözünerek hazırlanan tamoxifen, 10gr vücut ağırlığına 1mg olacak şekilde 5 gün boyunca intraperitoneal olarak farelere enjekte edildi. Tip60^{F/-} genotipindeki kontrol grubuna ise aynı miktarda ve sürede mısır yağı enjekte edildi. 5 günlük enjeksiyon sonrası 5 gün beklendi. Tüm bu işlemler 12 saat ışık 12 saat karanlık (IK:12:12) döngüsü altında yapıldı. Tamoxifen SACre rekombinazı indüklediğinden enjeksiyon sonrası SACre rekombinazın Tip60 genini spesifik olarak sildiği düşünülmektedir. Silinmenin ne etkinlikte gerçekleştiği Southern Blot analizi ile Dr. Harun Budak tarafından gösterildi (Şekil 3.1). Fareler kontrol ve mutant olarak 2 gruba ayrıldı. Her bir fare grubundan 4 saat aralıklarla 6 farklı zaman birimi için doku toplandı ve her bir zaman birimi için 2 farklı fare kullanıldı (Toplam 24 fare).



Şekil 3.1. Tamoxifenin indüklediği SACre rekombinazın Tip60 genini karaciğer spesifik olarak silme etkinliğinin southern blot ile gösterilmesi

12 fare kontrol grubu ve 12 fare mutant grubu, toplam 24 fareden toplanan dokuların her biri için southern blot analizi yapıldı ve Tip60 geninin mutant farelerde silinme etkinliğinin %80-%90 arasında olduğu gösterildi. Elde edilen southern blot sonuçlarında nakavt ve flox bandların yoğunlukları (density) ImageJ programı kullanılarak ölçüldü.

Dinlenme ve aktif dönem olmak üzere memeli canlılarda ikiye ayrılan 24 saatlik sirkadian döngü güneş ışığına göre ayarlanır. Göz retinasından giren ışık, retinohipotalamik yol ile hipotalamusun ventral kısmında yer alan ve sirkadian sistemi düzenleyen bir üst saat olan SCN (Suprakiazmatik nükleus)'e ulaşır. Daha sonra bu sinyaller günlük dinlenme ve aktif döngüyü ayarlamaktadır. (Albrecht and Foster 2002; Jud *et al.* 2005).

Dış ortamdan tamamen izole edilmiş ve ışık girişinin bilgisayar programı ile sağlandığı kabinlerde muhafaza edilen farelere, doğal ortamdaki değişimler ile aynı olacak şekilde ışık verildiği zaman içsel biyolojik saatteki biyolojik parametrelerin doğal ortam ile aynı olarak değiştiği belirlenmiştir. Bu senkronizasyon mekanizması için kullanılan zaman birimi ise zeitgeber zaman dilimi olarak ifade edilir. 24 saatten oluşan 12 saat ışık-12 saat karanlık (light-dark cycle LD: 24 saat) periyodlara ayrılan zeitgeber zamanda karanlık periyodu skotofaz ve aydınlık periyodu ise fotofaz ile isimlendirilir. Zeitgeber

zaman tanımlanmasında gün 24 zeitgeber zaman diliminden oluşur. Işığın aktif hale geldiği yani fotofazın başladığı zaman dilimi ZT0 ve ışığın olmadığı skotofaz periyodunun başladığı zaman birimi ise ZT12 olarak ifade edilir (Albrecht and Foster 2002; Jud *et al.* 2005).

Sirkadian deneylere başlanır iken farelerden alınacak dokular için zeitgeber zaman birimini kullanılacak ise fareler ışık haricindeki tüm çevresel şartlardan izole edilmiş kabinlere konulur. Aydınlik periyodun başladığı zaman ZT0: 6:00 ve karanlığın başladığı periyot ise ZT12: 18:00 olacak şekilde ayarlanır (Albrecht and Foster 2002; Jud *et al.* 2005).

Çizelge 3.2. Zeitgeber zaman biriminin hesaplanması

Işık	Aydınlık			Karanlık		
Gerçek Zaman	06:00	10:00	14:00	18:00	22:00	02:00
Zeitgeber Zaman Birimi (ZT)	ZT0	ZT4	ZT8	ZT12	ZT16	ZT20

2 grup fareden (12 adet kontrol grubu ve 12 adet karaciğere spesifik Tip60 kontrollü nakavt, toplam 24 fare) karaciğer dokularının Zeitgeber zaman dilimi kullanılarak alınmış örnekleri ile çalışılmıştır. Bu iki grup fare karaciğer dokularından ZT0, ZT4, ZT8, ZT12, ZT16 ve ZT20 olmak üzere 6 farklı zaman diliminde alınmış örnekler ile çalışma yürütülmüştür.

3.5. RNA İzolasyonu

cDNA kütüphanesi oluşturmak için, amacımıza uygun olacak şekilde fare karaciğer dokusundan 24 saatin farklı zaman dilimlerinde alınmış doku örnekleri Max-Planck Enstitüsünden temin edildikten sonra kullanılacak zamana kadar -80°C’de muhafaza edildi. Belirtilen kimyasallar kullanılarak RNA izolasyonu aşağıdaki basamaklar da anlatıldığı gibi yapıldı.

Hazırlanmış olan dokulardan yaklaşık 50mg alınıp, 2ml'lik bir ependorf tüpüne konuldu ve sırası ile şu işlemler yapıldı.

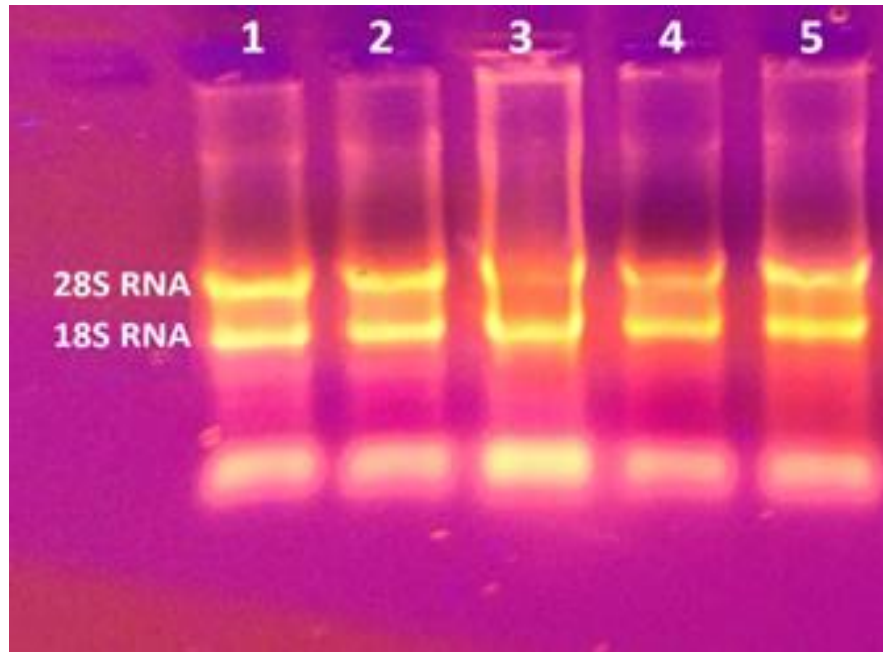
1. 1ml QIAzol Lyzis Reagent eklendi
2. Doku homojenizatör yardımıyla iyice parçalandı.
3. 15-25°C'de (oda şartlarında) düz bir zeminde 5dk bekletildi.
4. Üzerine 200µl kloroform eklendi ve birkaç saniye vortekslendi.
5. Düz bir zeminde 2-3dk bekletildi.
6. 12000xg de 15dk süreyle +4°C de santrifüj edildi.
7. Üst faz dikkatli bir şekilde 2ml'lik steril ependorf tüpüne alındı (aktarılan hacim 500µl olmalıdır)
8. Tüpler santrifüjden alındıktan sonra (Qiacube) RNA İzolasyon Robotuna konuldu ve deneysel aşamanın bundan sonraki kısmı cihaz tarafından gerçekleştirildi.
9. Tüpler cihazdan alındıktan sonra RNA izole edildi.
10. İzole edilen RNA'ların konsantrasyonu ve saflığı Nanodrop Spektrofotometre'de köre (RNase free water) karşı okundu.
11. RNA'lar cDNA izolasyonu yapılana kadar -80°C de saklandı.

3.6. RNA'nın Agaroz Jel Elektroforezinde Kontrolü

Elektroforez yöntemi, hem agaroz jeller için hem de poliakrilamid jeller için kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntem ile DNA ve RNA'nın negatif yükünden yararlanılarak, DNA veya RNA örneklerinin elektrik alanda yürümesini sağlayacak tampon çözeltiler ile negatif yüklü kutuptan pozitif yüklü kutba doğru yürümesi sağlanmaktadır. Bu sayede DNA veya RNA'nın moleküler büyüklüklerine göre ayrımı yapılır. DNA dizilerinin

ultraviyole ışık altında görüntülenmesi için U.V. ile ışıma veren etidyum bromür kullanılır.

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



Şekil 3.2. RNA'nın jel görüntüsü

3.6.1. Jelde yürütülecek RNA örneğinin hazırlanışı

1µl izole ettiğimiz RNA'nın üzerine 3.5µl ddH₂O, 0.5µl 20xMOPS solüsyonu ve 5µl formamid sırasıyla ilave edilerek 65°C'de 15dk inkübe edildi.

3.6.2. Jelin hazırlanışı

1.88ml 20xMOPS solüsyonuna 0.3gr agaroz, 28.5ml ddH₂O sırasıyla konulup kaynatıldı. 37°C'ye kadar soğuyunca 6.68µl formamid eklendi. Hemen ardından 5.5µl etidium bromür eklenip jel donmaya bırakıldı.

3.6.3. Elektroforez işlemi

Yüklemeye hazır hale getirilen RNA örnekleri 6X yükleme boyasıyla karıştırıldı. Bu karışımdan alınan 7µl jelde oluşturulan kuyulara ayrı ayrı yüklendi. Yükleme bittikten sonra 60V'ta 30dk elektrik akımı uygulanıp, daha sonra jel UV altında gözlemlenerek kalitatif analiz yapıldı.

3.7. cDNA Kütüphanesinin Hazırlanması

DNA'dan kopyalanan mRNA'lar izole edildikten sonra tek zincirli yapıdan çift zincirli yapıya dönüştürülmektedir ki bunlar komplementer DNA'lar (cDNA) olarak adlandırılırlar. Elde edilen bu yapıların bir organizmada hemen hemen bütün gen yapısını ihtiva edebilecek bir kütüphaneye dönüştürülmesi işlemine ise cDNA kütüphanesinin oluşturulması denilmektedir. Elde edilen bu kütüphanenin çeşitli markırlarla taranması sonucu istenen bir gen spesifik olarak elde edilebilmektedir. cDNA kütüphanesi birçok metotla sentezlenebilmektedir.

3.7.1. Gerekli kimyasallar

Oligo dT₂₀ (50µM)

1. Random hexamers (50ng/µl)
2. ddH₂O

3. 10x RT Buffer
4. 25mM MgCl₂
5. 0.1M DTT
6. dNTP Mix
7. SuperScriptTM III RT (200units/ μ l)
8. RNaseOUTTM (40U/ μ l)

3.7.2. Yöntem

1. Steril bir mikrosantrifüj tüpüne;
 - 50 ng/ μ l Rastgele (Random) primer
 - 10pg-5 μ g total RNA veya 10pg-500ng mRNA
 - 1 μ l 10mM dNTP Mix konuldu ve
 - 10 μ l'ye ddH₂O ile tamamlandı.
2. Karışım 65°C'de 5 dakika ısıtıldı ve buz üzerinde en az 1 dakika inkübe edildi.
3. Karışım kısa süreli santrifüjlendi ve üzerine aşağıdaki kimyasallar eklendi;

• 10X RT Buffer	2 μ l
• 25 mM MgCl ₂	4 μ l
• 0.1 M DTT	1 μ l
• RNaseOUT TM Recombinant RNase	1 μ l
• SuperScript TM III RT	1 μ l

4. Karışıma hafif bir şekilde pipetaj yapıldı. Random primer kullanıldığı için, karışım önce 25°C’de 10dk. inkübe edildi.
5. Sonra karışım 50°C’de 50dk inkübe edildi.
6. Karışım 85°C’de 5dk ısıtıldı ve buz üzerine toplandı.
7. Kısa bir santrifüjlemenin ardından 1µl RNase H eklendi ve 37°C’de 5dk. inkübe edildi.
8. Reaksiyon sonlandırıldı ve pcr için kullanılabilecek kadar -20°C’de saklandı.

3.8. Hamp Geni İçin Primer ve Prob Temini

Çalışmada kullandığımız fare Hamp geni için gerekli primer ve prob temini Roche (<http://www.roche.com/index.htm>) firmasından sağlanarak çalışıldı.

3.9. Real-Time PCR Uygulaması

- Kantitatif gen ekspresyonunun belirlenmesi maksadıyla Real-Time PCR analizi yapıldı. Bu maksatla farklı zaman dilimlerinde alınan fare gruplarından elde edilen doku örneklerinden izole edilmiş olan cDNA’lar kullanıldı.
- Floresan işaretli TaqMan probu kullanılarak genin ekspresyon miktarları ölçüldü. Genlerin ekspresyon dereceleri Real-Time PCR’da ilgili bölgenin çoğaltılması esnasındaki kantitatif olarak oluşan ürüne TaqMan probun bağlanması ve belirli dalga boyunda ışıma yaparak absorbans vermesi esasına dayanır. Böylece oluşan ürünün miktarı kantitatif olarak ölçülür.

- TaqMan® Probe kullanılarak gerçekleştirilen Real-Time PCR protokolü; 2dk 50°C, 10dk 95°C ve 45 döngü olmak üzere 95°C’de 15sn ve 60°C’de 1dk şeklinde uygulandı.
- Karışım aşağıdaki gibi hazırlandı.

Çizelge 3.3. Multipleks Real-Time PCR karışımı (25µl için)

Bileşenler	Final Konsantrasyonu	Miktar (µL)
TaqMan® Probe Master Mix	1X	12,5
Probe+Primer hedef gen	0,04pmol	1
Probe AKTİN	0,4pmol	0,15
Forward Primer AKTİN	0,8pmol	0,25
Reverse Primer AKTİN	0,8pmol	0,25
cDNA (0,5ng)	0,02ng/µl	2,5
ddH₂O (Steril)	-	8,35

- Hamp geninin dokularda mRNA ekspresyon dereceleri belirlenmeye çalışıldı.

Sonuçların değerlendirilmesi ve istatistikî analizler:

Özellikle primer etkinlik oranı Real-Time PCR uygulamalarında en önemli hususlardan biridir. Bu nedenle analiz yapılan tüm örneklerde primer etkinliğinin %100 (ise primer etkinlik oranı 2’dir) veya %100’e yakın olması göz önünde bulunduruldu. Sonuçların değerlendirilmesinde, aşağıdaki formül kullanıldı.

$$\text{Oran (Referans/Hedef)} = 2^{C_T(\text{Referans}) - C_T(\text{Hedef})}$$

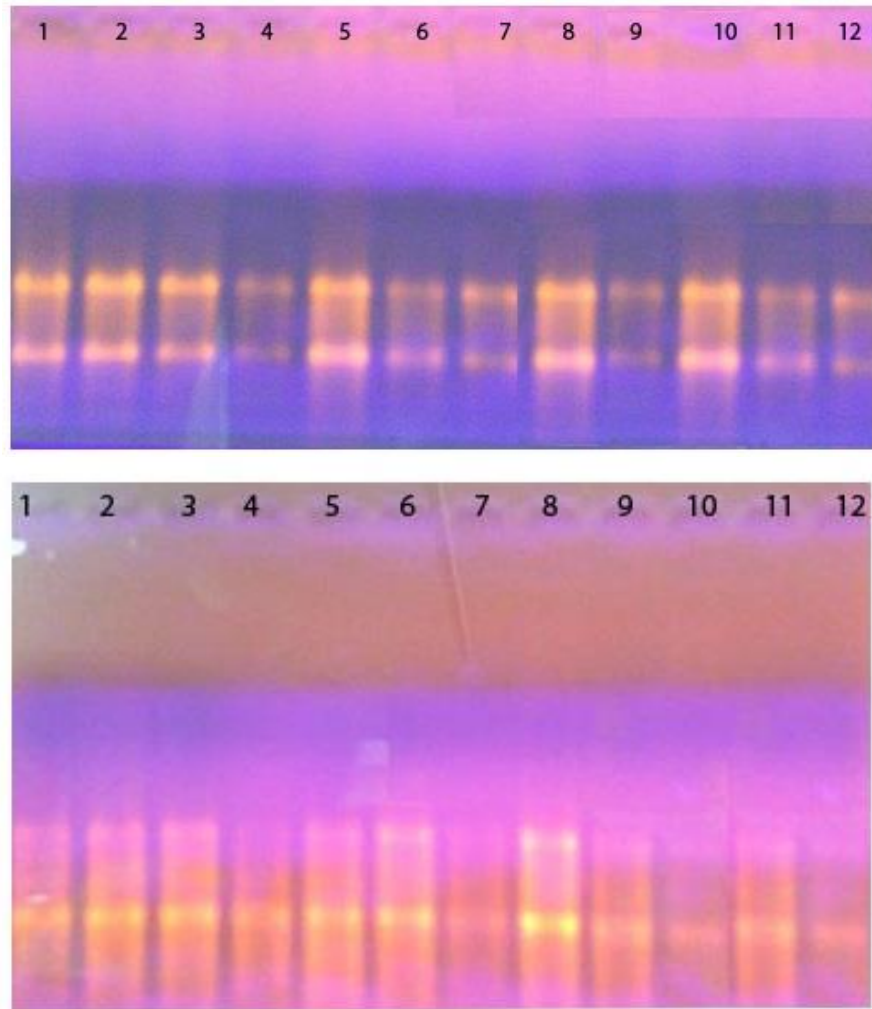
Burada; Oran: ekspresyon seviyesi, Hedef: hedef genin etkinlik oranı, Referans: referans genin etkinlik oranı, C_T , hedef (kontrol–uygulama), C_T , referans (kontrol–uygulama) göstermektedir.

GraphPad Prism 5 (GraphPad, La Jolla, CA) Software 7.0 programı kullanılarak veriler değerlendirildi.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. RNA İzolasyonunun Jel Elektroforez İle Kontrolü

Kontrol grubu ve karaciğere spesifik Tip60 kontrollü nakavt (mutant) fare karaciğer örneklerinden izole edilen RNA'ların kontrolü jel elektroforezi ile yapılmış ve aşağıdaki gibi gösterilmiştir.



Şekil 4.1. Örneklerden izole edilen RNA'nın jel elektroforez görüntüsü

4.2. Real-Time PCR Sonuçları

Çalışmamızda hepsidin hormonunu kodlayan Hamp geninin Tip60 geni ile ilişkisini belirlemek için karaciğere spesifik Tip60 kontrollü nakavt ve kontrol grubu fare karaciğer dokularında gen ekspresyon analizi Real-Time PCR yöntemiyle yapılmıştır.

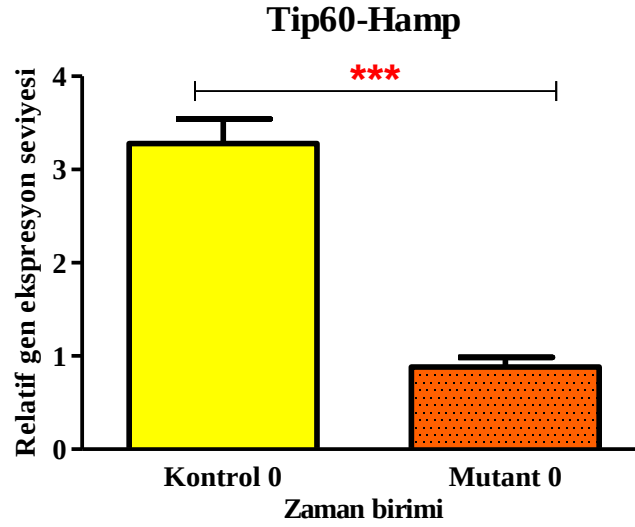
Sonuçların istatistiksel analizi GraphPad Prism 5 (GraphPad, La Jolla, CA) Software 7.0 programı kullanılarak yapılmış ve grafiğe dökülmüştür. Kırmızı yıldız olarak ifade edilen değerler istatistiksel analiz sonucu elde edilen p (önem) değerlerini ifade etmektedir. Önemlilik derecesine göre yıldız sayısı 1 ile 3 arasında doğru orantılı olarak değişmektedir. $p>0,05$ =ns önemsiz (not significant), $p<0,05$ =* önemli (significant), $p<0,01$ =** çok önemli (very significant), $p<0,001$ =*** yüksek derecede önemli (highly significant)

Çizelge 4.1. Karaciğere spesifik Tip60 kontrollü nakavt ve kontrol grubu fare karaciğer dokularında Hamp gen ekspresyon seviyelerinin istatistiksel sonuçlarının gösterimi

Hamp Geni				
Zaman Birimi	Kontrol Mean±SEM	Mutant Mean±SEM	P değeri ve özeti	n
ZT0	3.277 ± 0.2643	0.8826 ± 0.1011	P<0.0001 (***)	2
ZT4	6.811 ± 0.4169	2.142 ± 0.03823	P<0.0001 (***)	2
ZT8	3.614 ± 0.04403	1.960 ± 0.06838	P<0.0001 (***)	2
ZT12	7.934 ± 0.3072	6.353 ± 0.4160	P<0.05 (*)	2
ZT16	21.92 ± 1.595	14.85 ± 0.6043	P<0.05 (*)	2
ZT20	5.568 ± 0.5893	1.284 ± 0.06798	P<0.0001 (***)	2

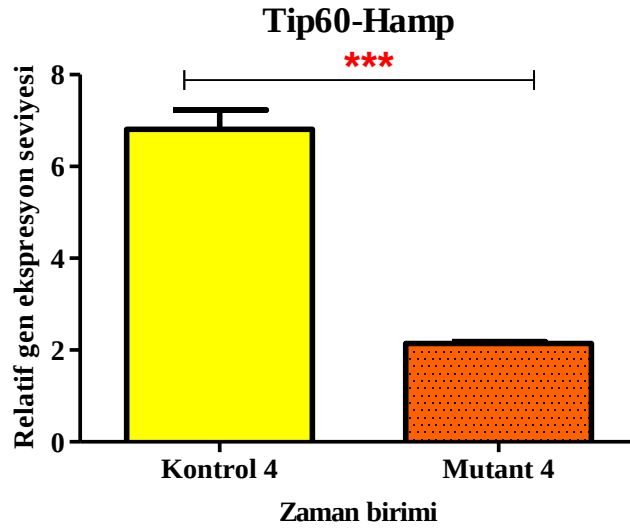
* Bütün datalar Mean±SEM olarak gösterildi. İstatistiksel olarak önemli farklılıklar belirtildi. (n:birey sayısı) ($p>0,05$ =ns (not significant), $p<0,05$ =*, $p<0,01$ =**, $p<0,001$ =***)

Karaciğere spesifik Tip60 kontrollü nakavt ve kontrol grubu fare karaciğer dokularında ZT0 zaman dilimi için yapılan Real-Time PCR sonuçlarına göre; Hamp gen ekspresyon seviyesi kontrol ve mutant örnekler arasında yüksek derecede önemli ($p<0,001$) bulunmuştur. İstatistiki sonucu ifade eden grafik aşağıda gösterilmiştir.



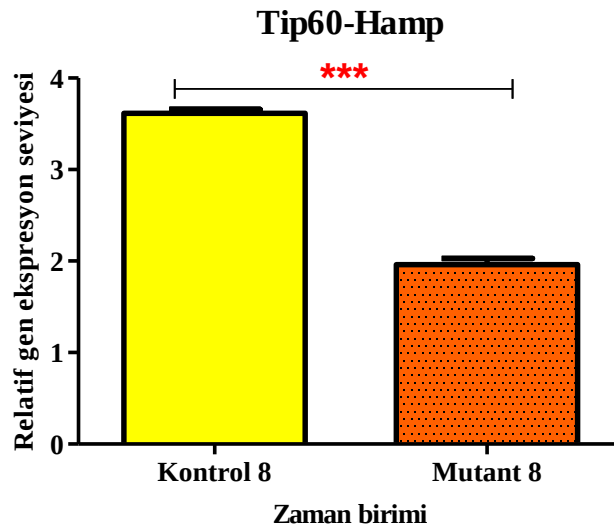
Şekil 4.2. ZT0 zaman diliminde alınan kontrol ve mutant fare karaciğer dokusunda Hamp gen ekspresyon seviyesinin gösterilmesi ($p>0,05=ns$, $p<0,05=*$, $p<0,01=**$, $p<0,001=***$)

Karaciğere spesifik Tip60 kontrollü nakavt ve kontrol grubu fare karaciğer dokularında ZT4 zaman dilimi için yapılan Real-Time PCR sonuçlarına göre; Hamp gen ekspresyon seviyesi kontrol ve mutant örnekler arasında yüksek derecede önemli ($p<0,001$) bulunmuştur. İstatistiki sonucu ifade eden grafik aşağıda gösterilmiştir.



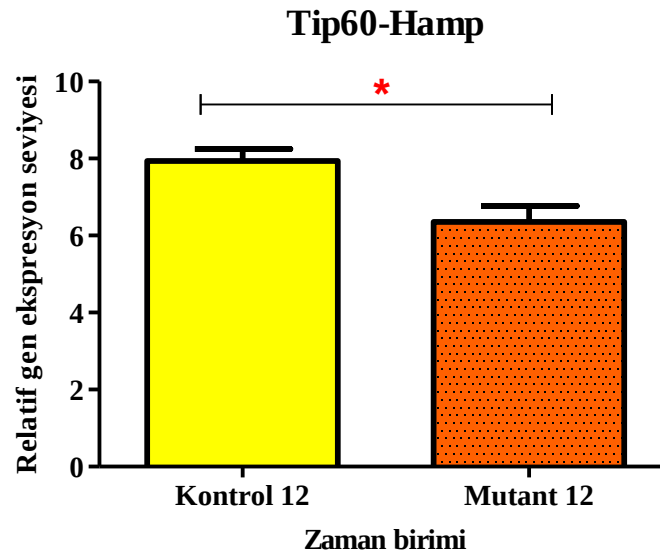
Şekil 4.3. ZT4 zaman diliminde alınan kontrol ve mutant fare karaciğer dokusunda Hamp gen ekspresyon seviyesinin gösterilmesi ($p > 0,05 = \text{ns}$, $p < 0,05 = *$, $p < 0,01 = **$, $p < 0,001 = ***$)

Karaciğere spesifik Tip60 kontrollü nakavt ve kontrol grubu fare karaciğer dokularında ZT8 zaman dilimi için yapılan Real-Time PCR sonuçlarına göre; Hamp gen ekspresyon seviyesi kontrol ve mutant örnekler arasında yüksek derecede önemli ($p < 0,001$) bulunmuştur. İstatistiki sonucu ifade eden grafik aşağıda gösterilmiştir.



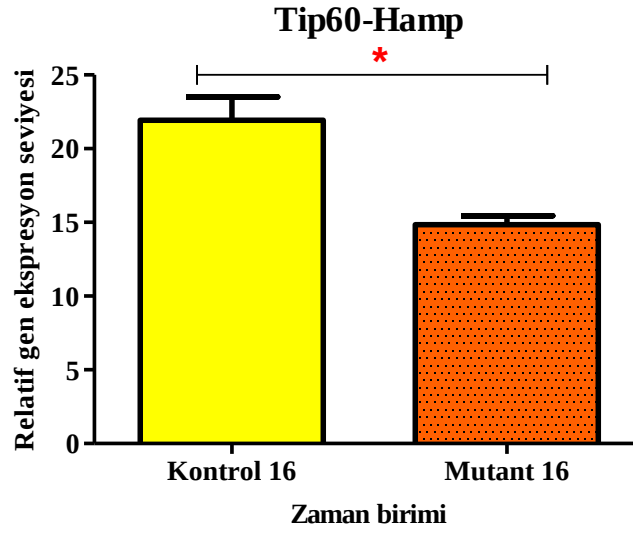
Şekil 4.4. ZT8 zaman diliminde alınan kontrol ve mutant fare karaciğer dokusunda Hamp gen ekspresyon seviyesinin gösterilmesi ($p > 0,05 = \text{ns}$, $p < 0,05 = *$, $p < 0,01 = **$, $p < 0,001 = ***$)

Karaciğere spesifik Tip60 kontrollü nakavt ve kontrol grubu fare karaciğer dokularında ZT12 zaman dilimi için yapılan Real-Time PCR sonuçlarına göre; Hamp gen ekspresyon seviyesi kontrol ve mutant örnekler arasında önemli ($p<0,05$) bulunmuştur. İstatistiki sonucu ifade eden grafik aşağıda gösterilmiştir.



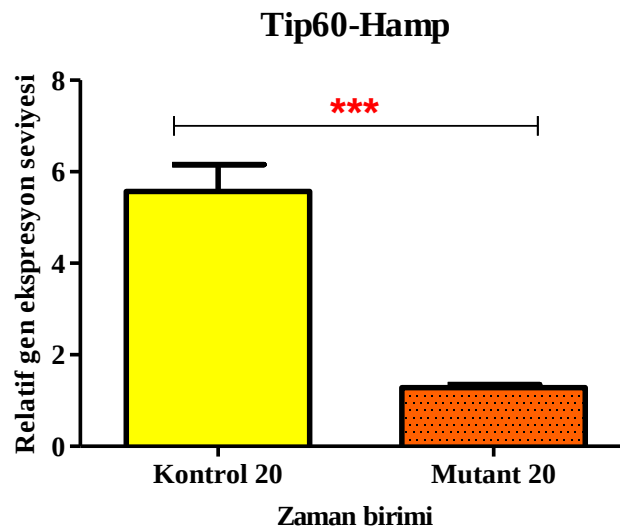
Şekil 4.5. ZT12 zaman diliminde alınan kontrol ve mutant fare karaciğer dokusunda Hamp gen ekspresyon seviyesinin gösterilmesi ($p>0,05=ns$, $p<0,05=*$, $p<0,01=**$, $p<0,001=***$)

Karaciğere spesifik Tip60 kontrollü nakavt ve kontrol grubu fare karaciğer dokularında ZT16 zaman dilimi için yapılan Real-Time PCR sonuçlarına göre; Hamp gen ekspresyon seviyesi kontrol ve mutant örnekler arasında önemli ($p<0,05$) bulunmuştur. İstatistiki sonucu ifade eden grafik aşağıda gösterilmiştir.



Şekil 4.6. ZT16 zaman diliminde alınan kontrol ve mutant fare karaciğer dokusunda Hamp gen ekspresyon seviyesinin gösterilmesi ($p > 0,05 = ns$, $p < 0,05 = *$, $p < 0,01 = **$, $p < 0,001 = ***$)

Karaciğere spesifik Tip60 kontrollü nakavt ve kontrol grubu fare karaciğer dokularında ZT20 zaman dilimi için yapılan Real-Time PCR sonuçlarına göre; Hamp gen ekspresyon seviyesi kontrol ve mutant örnekler arasında yüksek derecede önemli ($p < 0,001$) bulunmuştur. İstatistiki sonucu ifade eden grafik aşağıda gösterilmiştir.



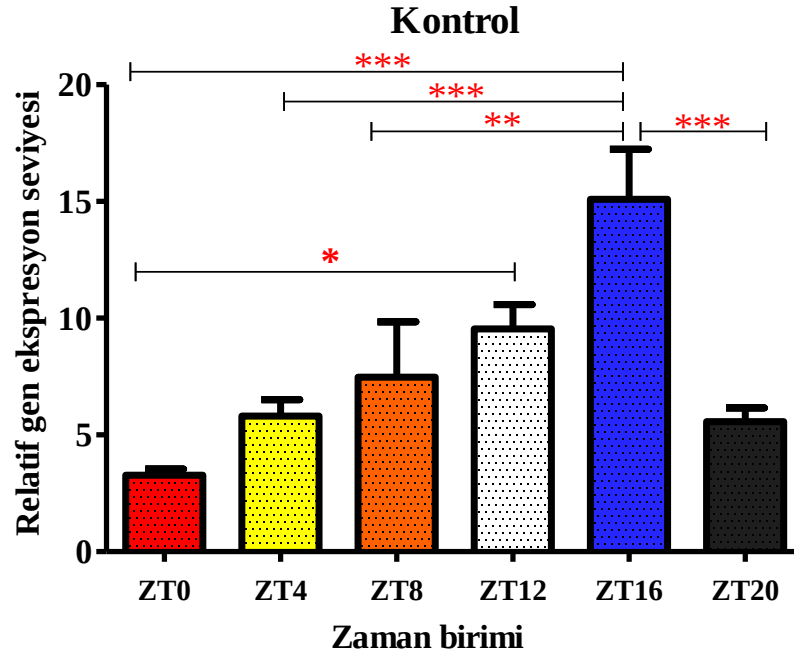
Şekil 4.7. ZT20 zaman diliminde alınan kontrol ve mutant fare karaciğer dokusunda Hamp gen ekspresyon seviyesinin gösterilmesi ($p > 0,05 = ns$, $p < 0,05 = *$, $p < 0,01 = **$, $p < 0,001 = ***$)

Gün içerisinde değişen zaman birimleri dikkate alınarak kontrol grubu fare karaciğerinde Hamp gen ekspresyon seviyesinin sirkadian değişimi gösterildi. Elde edilen sonuçlar Tukey testi ile değerlendirildi. Bu test sonuçları ve grafik olarak gösterimi aşağıda verilmiştir.

Çizelge 4.1. Tukey çoklu karşılaştırmalı test sonuçları

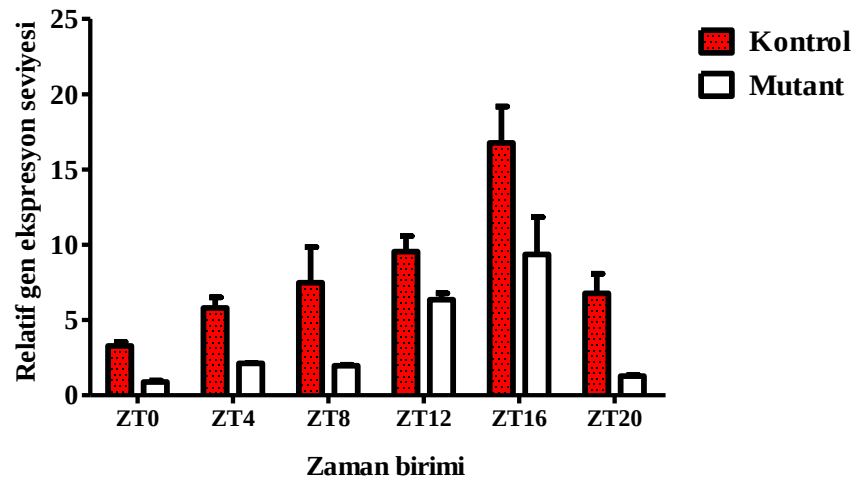
Tukey çoklu karşılaştırma testi	Önem derecesi (P değeri)	P değeri özet	n
ZT0 vs ZT4	$p>0,05$	ns	2
ZT0 vs ZT8	$p>0,05$	ns	2
ZT0 vs ZT12	$p<0,05$	*	2
ZT0 vs ZT16	$p<0,001$	***	2
ZT0 vs ZT20	$p>0,05$	ns	2
ZT4 vs ZT8	$p>0,05$	ns	2
ZT4 vs ZT12	$p>0,05$	ns	2
ZT4 vs ZT16	$p<0,001$	***	2
ZT4 vs ZT20	$p>0,05$	ns	2
ZT8 vs ZT12	$p>0,05$	ns	2
ZT8 vs ZT16	$p<0,01$	**	2
ZT8 vs ZT20	$p>0,05$	ns	2
ZT12 vs ZT16	$p>0,05$	ns	2
ZT12 vs ZT20	$p>0,05$	ns	2
ZT16 vs ZT20	$p<0,001$	***	2

Tukey karşılaştırmalı test sonuçlarına göre zaman dilimleri arasında karşılaştırmalı olarak anlamlı bulunan sonuçlar grafik olarak aşağıda görselleştirilmiştir. Önemsiz bulunanlar grafikte ayrıca belirtilmemiştir.



Şekil 4.8. Gün içerisinde değişen zaman dilimlerinde kontrol grubu arasında anlamlı bulunan Hamp gen ekspresyon seviyesinin değişiminin gösterilmesi ($p > 0,05 = \text{ns}$, $p < 0,05 = *$, $p < 0,01 = **$, $p < 0,001 = ***$)

Ayrıca sonuçlar GraphPad Prism programı kullanılarak yapılan Two-Way ANOVA testi ile de değerlendirilmiştir. Bütün kontrol ve mutant örneklerde görülen Hamp geni ekspresyon sonuçları aşağıda gösterilmiştir.



Şekil 4.9. Kontrol ve mutant örneklerin gün içerisinde değişen zaman birimlerinde Hamp ekspresyon seviyelerinin gösterilmesi

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

İlk olarak 1996 yılında HIV (Human immunodeficiency virus)-1 Tat interaktif protein olarak karakterize edilen, Tat-interaktif protein (TIP60), metabolizmada transkripsiyon düzenleyicisi olan, DNA tamir basamaklarında görev alan, hücre döngüsü, apoptos mekanizması ve hücresel yanıt üretilmesi gibi birçok nükleer aktiviteye sahip olan nükleer bir proteindir (McAllister et al. 2002; Doyon and Côté 2006). TIP60 proteini, nükleer fonksiyonun yanı sıra gen ekspresyonlarını da düzenlemektedir (Sapountzi *et al.* 2006).

TIP60 keşfedildikten hemen sonra onun histon asetiltransferaz (HAT) aktivitesine sahip olduğu ve rekombinant TIP60'ın H2A, H3 ve H4 çekirdek histonlarını asetillediği belirtilmiştir (Ikura *et al.* 2000). Hücresel TIP60, histonların yanısıra transkripsiyon faktörlerini de asetilleyebilmektedir (Gaughan *et al.* 2002; Halkidou *et al.* 2004).

TIP60 proteini hücresel işlevlere bağlı olarak uygun bağlanma partnerleri ile geçici kompleksler oluşturur. Hücresel TIP60 molekülü, 18 alt birimden oluşan sabit çekirdek multiprotein kompleksi halinde bulunarak birçok transkripsiyonel işlevleri ve TIP60 fonksiyonuyla ilişkili DNA tamir görevini yerine getirir (Ikura *et al.* 2000).

TIP60 bazı durumlarda internalize olmuş membran reseptörleri ile ilişkili olarak sitoplazmada lokalize bulunur ve böylece kinaz pathwaylerini ya da gen ekspresyonunu düzenler. TIP60'ın fonksiyonel işlevleri interlökin-9 (IL-9) sinyallerini, sitokin proliferasyonunu, büyüme düzenleyicilerini ve apoptos inhibisyonunu kapsar. TIP60 sitoplazmada STAT 3 transkripsiyon faktörü ile etkileşim içindedir (Sliva *et al.* 1999; Xiao *et al.* 2003). Transkripsiyonun baskılanmasında IL-9'un uyarılmasıyla çekirdekte STAT3-TIP60 kompleksinin harekete geçmesi önemli bir basamaktır (Lee *et al.* 2001).

TIP60'ın sitoplazmada bulunduğu bilinmesine rağmen çekirdek-stoplazma arasındaki hareket mekanizmaları bilinmemekte ancak TIP60 translokasyonunun şimdilik bilinmeyen spesifik bağlanmalar ile gerçekleştiği, ayrıca sitokinler ve hormonlar gibi

çeşitli hücre içi ve hücrelerarası uyarıcılarla düzenlendiği düşünülmektedir (Halkidou *et al.* 2003; Sliva *et al.* 1999).

TIP60 genellikle deasetilazlar gibi bazı kompleksleri harekete geçirerek, gen baskılanmasında görev alır. ‘cAMP response element binding protein’ (CREB) ve STAT3 gibi transkripsiyon faktörlerinin baskılanması TIP60 aracılığıyla olmaktadır (Gavaravarapu and Kamine 2000; Xiao *et al.* 2003). CREB, hormonlar ve protein kinaz A (PKA) ile fosforile olan büyüme faktörleri aracılığıyla uyarılan bir transkripsiyonel aktivatördür. TIP60’ın CREB’i baskılaması, doğrudan CREB’e bağlanarak ve PKA ile CREB’in uyarılmasını baskılayarak gerçekleşmektedir (Gavaravarapu and Kamine 2000). STAT3 aktivitesi ise TIP60/HDAC7 kompleksi ile ayarlanmaktadır (Xiao *et al.* 2003).

Bu güne kadar TIP60 proteinin birçok metabolik fonksiyonu olduğu gösterilmesine rağmen demir metabolizmasını düzenleyen hepsidin ile bağlantısı hakkında hiçbir çalışma yapılmamıştır. Tip60 geninin hepsidin ve dolayısıyla demir metabolizması üzerine olabilecek etkilerini göstermek amacı ile yaptığımız bu tez çalışmasında, karaciğere spesifik Tip60 kontrollü nakavt ve kontrol grubu fare karaciğer dokularında farklı zaman birimlerinde Hamp geninin ekspresyon seviyeleri kantitatif olarak karşılaştırılmış ve Tip60 geni silinmiş karaciğerlerde, hepsidin ekspresyonunun yüksek derecede anlamlı olarak azaldığı gösterilmiştir. TIP60 proteininin, çekirdekte yer alan Hamp geninin promotör bölgesini uyararak veya baskılayarak hepsidin sentezini düzenleyen etkili mekanizmalar üzerine, doğrudan veya dolaylı etkisinin yapılacak daha kapsamlı araştırmalarla gösterilebileceği düşünülmektedir.

APP mRNA'sının 5' untranslated region (UTR) bölgesi ‘Iron responsive element’ (IRE) fonksiyonuna sahiptir (Rogers *et al.* 2002). Bu sayede APP translasyonu, sitoplazmik serbest demir seviyesinden sorumludur ve ayrıca doğal cis-trans demir regülatör sistemde ferritin ve TfR’ne demir regülatör proteinlerin (IRPs) bağlanmasını yönetmektedir (Klausner *et al.* 1993). Hücrel demir seviyesinin yükseldiği durumlarda APP’nin ve demirin kendisine bağlanarak depolandığı protein olan ferritin

translasyonu artarken (Rogers *et al.* 2002), hücelere demir alımından sorumlu TfR RNA'sı düşmektedir (Duce *et al.* 2010).

Demiri hücre yüzeyinden plazmaya çıkaran seruloplazmine (CP) benzer şekilde, APP transmembranlarda eksprese olur ve saklanmış formları vardır. APP'nin CP benzeri bir ferooksidaz olduğu ve dolayısıyla nöronal demir eksportunda görev aldığı gösterilmiştir (Duce *et al.* 2010). APP'nin ferooksidaz aktivitesi ferroportin-CP ilişkisine benzer şekilde demir taşınmasına yardım eder (De Domenico *et al.* 2007).

Bu tez kapsamında yaptığımız çalışma ile Tip60 nakavt fare karaciğerlerinde Hamp gen ekspresyonunun önemli derecede azalması, farelerde gelişen gen silme deneyleri sırasında demir miktarının ve depolarının düştüğünü göstermektedir. Literatür çalışmalarına paralel olarak, hepsidin düşen demir miktarıyla paralel olarak azalması, hücre sitoplazmalarında demir birikiminin olduğuna işaret etmektedir. APP'nin çekirdekdeki transkripsiyonunun, Tip60'ın aktivasyonu ile ilişkili olduğunun Kinoshita ve arkadaşları (2002) tarafından gösterilmesi, hücre stoplazmalarında demir birikiminin bir sebebi olarak, Tip60'ın silinmesiyle, hücre membranlarında yerleşik bulunan ve demirin hücre içerisinden plazmaya salınmasından sorumlu ferooksidaz protein olan APP'nin aktivitesinin azalmasının neden olduğunu düşündürmektedir.

Hepsidin, intestinal demir transfer proteini olan ferroportine bağlanarak ve onu degrade ederek demir absorpsiyonunu azaltır. Şu anda plazmaya çıkan ve burada dolaşan hepsidin hormonunun bazal düzenlenmesi hakkında çok az bilgi mevcuttur. Bununla beraber eritrosit yapımının plazmada dolaşan hepsidin konsantrasyonunu azalttığı bilinmesine rağmen büyüme hormonları gibi diğer eritropoez uyarıcıların hepsidin konsantrasyonunu nasıl değiştirdiği ile ilgili bilgiler sınırlıdır. Bu kapsamda Troutt ve arkadaşları (2012) tarafından yapılan bir çalışmada, Elisa yöntemi ile 25 sağlıklı gönüllü insan kullanılarak, hepsidin miktarları gün boyunca çeşitli zamanlarda ve 3 gün aç kalınan dönemde takiben yeniden beslenme gerçekleştikten sonraki dönemde ölçülmüştür. Ayrıca sağlıklı gönüllülere büyüme hormonu verilerekte ölçüm yapılmıştır. Sonuç olarak, sağlıklı gönüllü bireylerde hepsidin konsantrasyonunun,

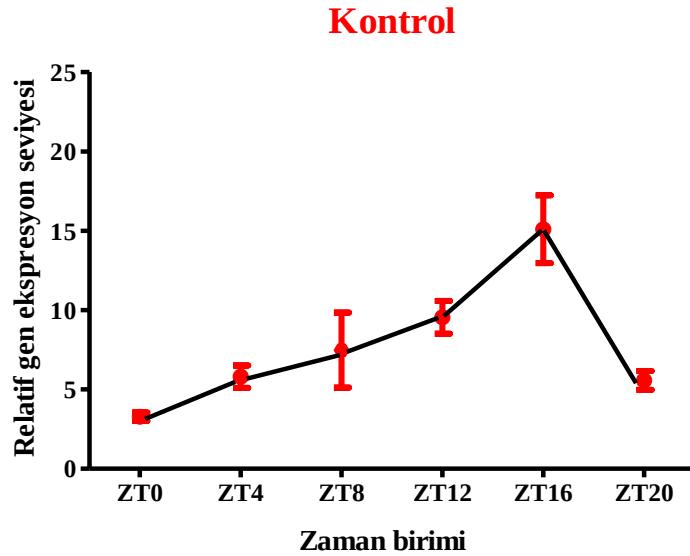
sabahın ilk saatlerinde en düşük seviyede olduğu, gün içinde sabit bir şekilde arttığı ve akşam saatlerinde azaldığı bir günlük değişimin olduğu gözlenmiştir. Sürekli aç kalan bireylerde hepsidin konsantrasyonu anlamlı olarak artmış, yeniden beslenmenin bu durumu tersine çevirdiği gözlenmiştir. Ayrıca büyüme hormonu verilen bireylerde ise önemli derecede azalma görülmüştür. Bu çalışma ile insanlarda hepsidin miktarının açlık (eritrosit yapımının durmasına bağlı olarak), tokluk ve büyüme hormonu gibi faktörlere bağlı olarak günlük değişimler gösterdiği kaydedilmiştir. Ayrıca hepsidin konsantrasyonunun dinamik olduğu ve hızlı değişimler gösterdiği gözlenmiştir.

Demir düzenleyici hormon hepsidin, demir düzensizliklerinin tanısında kullanılabilecek, gelecek vaat eden bir biyomarkırdır. Hepsidin konsantrasyonu, düzenli beslenen bireylerde gün içerisinde artış göstermektedir. Bu artışın doğal bir ritimle mi yoksa diğer faktörlerle mi belirlendiği bilinmemektedir. Bu amaçla Schaap ve arkadaşları (2013), gün içerisinde değişen hepsidin konsantrasyonu üzerine günlük demirin etkisini çalışmışlar ve gün içerisinde değişen hepsidin miktarlarına, günlük demirden ziyade günlük ritimlerin aracılık ettiğini belirtmişlerdir. Ayrıca Peeling ve arkadaşları (2009), yüksek yoğunluktaki egzersizlerin, hepsidin seviyesindeki önemli artışlardan sorumlu olduğunu kaydetmişlerdir.

Bu çalışmada diğer bir parametre olarak 24 saatlik günlük zaman değişiminin, hepsidin hormonunun karaciğerdeki üretimi üzerine etkisi çalışılmıştır. Tip60 geninin sirkadian sistem üzerindeki etkisi, yapılan çalışmalarla gösterilmiş (Budak 2009) ve bizim çalışmamızda da zeitgeber zaman birimlerine göre alınmış doku örnekleri kullanılmıştır.

Aydınlık fazın başladığı zaman dilimine denk gelen ZT0'dan karanlık fazın başladığı ZT12'ye ve devamla ZT20'ye doğru giden sirkadian döngüde, kontrol grubu farelerde Hamp ekspresyonu Şekil 4.8'de gösterilmiştir. Burada kontrol grubu örneklerde Hamp ekspresyonunun, aydınlık fazın başlangıcı olan ZT0 zaman diliminde en düşük seviyede olduğu ve belli bir noktaya kadar artarak daha sonra azaldığı gösterilmiştir. Ayrıca hepsidin ekspresyonunun gün içinde bazı zaman dilimindeki değişiminin karşılaştırılması yapılmıştır. Buna göre hepsidin ekspresyon seviyelerinin;

- Aydınlık fazın başladığı ZT0 ile karanlık fazın başladığı ZT12 zaman dilimleri arasında, ($p<0,05$) önemlilik gösterdiği,
- Hepsidin ekspresyonunun minimum olduğu ZT0 zaman dilimi ile maksimum düzeye ulaştığı ZT16 zaman dilimi arasında ($p<0,001$) yüksek derecede önemlilik gösterdiği,
- Aydınlık fazın devamı olan ZT4 ile karanlık fazın dördüncü saatine denk gelen ZT16 arasında ($p<0,001$) yüksek derecede önemli bulunduğu,
- ZT8 ile ZT16 arasında ($p<0,01$) çok önemli olduğu ve
- ZT16 ile ZT20 arasında ise ani bir düşüşle, ($p<0,001$) yüksek derecede önemli olduğu bulunmuştur.
- Diğer zaman dilimleri arasında anlamlı bir farkın olmadığı gösterilmiştir.
- Ayrıca ZT16 zaman diliminde maksimum seviyeye ulaştığı belirlenmiştir. (Bkz. Şekil 5.1)



Şekil 5.1. Kontrol grubunda Hamp ekspresyonunun gün içindeki değişimi

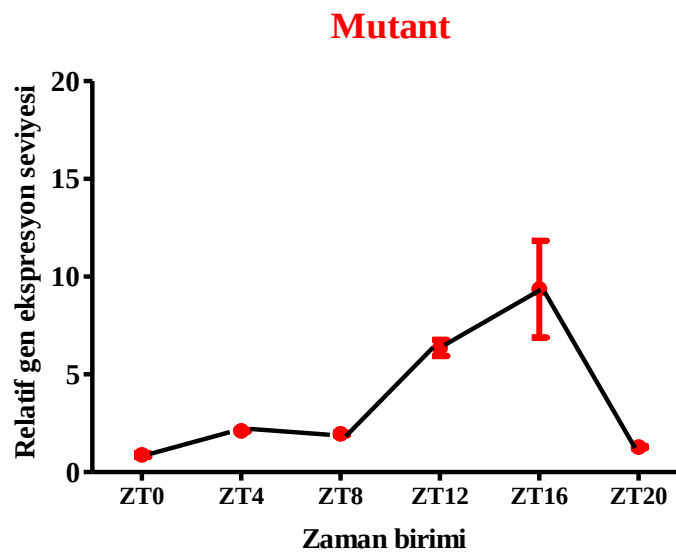
Bu verilere ek olarak Şekil 4.9’da görüldüğü gibi, kontrol ve mutant örneklerin gün içerisinde değişen zaman birimlerinde, Hamp geni ekspresyon seviyeleri üzerine etkisi, istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Hamp geni ekspresyon seviyesi üzerine kontrol ve mutant örneklerin, bütün ZT zaman birimlerinde aynı etkiye sahip olmadığı ($p>0,05$)

bununla beraber kontrol ve mutant örneklerin sonuçlar üzerine yüksek derecede önemli etkisi olduğu ($p<0,001$) bulunmuştur. Ayrıca sonuçlar üzerine günlük zaman dilimlerinin etkisi de yüksek derecede önemli ($p<0,001$) bulunmuştur (Bkz. Çizelge 5.1).

Çizelge 5.1. Hamp gen ekspresyon seviyesi üzerine etki eden faktörler

Hamp geni ekspresyon seviyesi		
Two-Way ANOVA	p değeri	p değeri özet
Etkileşim	0,3989 ($P>0.05$)	ns
Kontrol-Mutant	$P<0.0001$	***
ZT Zaman Birimi	$P<0.0001$	***

Kontrol örneklerde olduğu gibi mutant örneklerde de düşen Hamp ekspresyonunun, ZT16 zaman diliminde maksimum seviyede olduğu ve karanlık fazın devamında düşüşe geçtiği gösterilmiştir. (Bkz.Şekil 5.2)



Şekil 5.2. Mutant grubunda Hamp ekspresyonunun gün içindeki değişimi

5.1. Öneriler

Tip60 ile hepsidin hormonu arasında bizim bulduğumuz ilişkiden yola çıkılarak, TIP60 proteini ile demir metabolizmasının düzenlenmesi arasında bir ilişkinin olduğu önerilmektedir. Ayrıca bu bilgiler ışığında, Tip60 ile demir metabolizması arasındaki ilişkinin, demir transportunda görev aldığı bilinen ve aynı zamanda Alzheimer gibi nörodejeneratif hastalıklarda birikimi gözlenen APP proteiniyle doğrudan ya da dolaylı etkileşiminin yapılacak daha kapsamlı çalışmalarla gösterilmesinin, Alzheimer gibi demir bağımlı düzensizliklerin metabolik yollarının daha iyi anlaşılmasını sağlayacağı önerilmektedir.

Sonuç olarak; bu tez kapsamında aşağıdaki bulgular elde edilmiştir;

1. Karaciğere spesifik Tip60 kontrollü nakavt farelerde, hepsidin hormonunu eksprese eden Hamp geninin ekspresyonunun azaldığı gösterildi.
2. Hepsidin hormonu ekspresyonunun gün içinde değişen zaman dilimlerinde ışığa bağımlı değişimler gösterdiği belirlendi.
3. Hepsidin hormonu ekspresyonunun hem kontrol grubu hemde karaciğere spesifik Tip60 kontrollü nakavt farelerde, gün içinde karanlık fazın başlamasından sonraki dördüncü saatte maksimum düzeye ulaştığı ve aydınlık fazın devamında artışa geçtiği gösterildi.
4. Tip60 geni ile demir metabolizması arasında ilişki olabileceği önerildi.

KAYNAKLAR

- Abboud, S. and Haile D.J., 2000. A novel mammalian iron-regulated protein involved in intracellular iron metabolism. *Journal Of Chemical Biology*, 275, 19906–19912.
- Akhtar, A., Zink D. and Becker P. B., 2000. Chromodomains are 748 protein–RNA interaction modules. *Nature*, 407, 405–409.
- Albrecht, U. and Foster, R.G., 2002. Placing ocular mutants into a functional context:a chronobiological approach. *Methods*, 28, 465–477.
- Alves da Costa, C., Paitel E., Mattson M.P., Amson R. and Telerman A. *et al.*, 2002. Wild-type and mutated presenilins 2 trigger p53-dependent apoptosis and downregulate presenilin 1 expression in HEK293 human cells and in murine neurons. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America*, 99, 4043–4048.
- Alves da Costa, C, Sunyach C, Pardossi-Piquard R, Sevalle J, Vincent B, et al., 2006. Presenilin-dependent gamma-secretase-mediated control of p53-associated cell death in Alzheimer’s disease. *The Journal Of Neuroscience: The Official Journal Of The Society For Neuroscience*, 26, 6377–6385.
- Amit, S Pithadia1 and Mi Hee Lim., 2012. Metal-associated amyloid-b species in Alzheimer’s disease. *Current Opinion in Chemical Biology*, 16:67–73.
- Anderson, GJ, Darshan D, Wilkins SJ, Frazer DM., 2007. Regulation of systemic iron homeostasis: how the body responds to changes in iron demand. *Biometals*, 20:665-74.
- Anderson, GJ, Vulpe CD., 2002. Regulation of intestinal iron transport. In: Templeton DM, editor. *Molecular and Cellular Iron Transport*. New York: Marcel Dekker; pp 559–596.
- Andrews, NC., 2008. Forging a field: the golden age of iron biology. *Blood*, 112: 219–230.
- Andrews, NJ., 1999. Disorders of iron metabolism. *The New England Journal Of Medicine*, 341.
- Ashley, N. Steere, Shaina L. Byrne, N. Dennis Chasteen, and Anne B. Mason.,2011. Kinetics of iron release from transferrin bound to the transferrin receptor at endosomal pH. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1820(3): 326–333.
- Babitt, JL, Huang FW, Wrighting DM, Xia Y, Sidis Y, Samad TA, Campagna JA, Chung RT, Schneyer AL, Woolf CJ, Andrews NC, Lin HY., 2006. Bone morphogenetic protein signaling by hemojuvelin regulates hepcidin expression. *Nature Genetics*, 38: 531–539.
- Baek, SH, Ohgi KA, Rose DW, Koo EH, Glass CK, et al., 2002. Exchange of NCoR corepressor and Tip60 coactivator complexes links gene expression by NFkappaB and beta-amyloid precursor protein. *Cell* 110: 55–67.
- Başol, G, Barutçuoğlu B, Bozdemir AE., 2007. Demir Homeostazının Yeni Düzenleyicisi Hepsidin. *Türk Klinik Biyokimya Dergisi*. 5(3): 117-125.
- Budak, H., 2009. Memeli Sirkadian Sisteminde Tip60 Geninin Karakterizasyonu. Doktora, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.

- Buijs, R. M., and Kalsbeek, A., 2001. Hypothalamic integration of central and peripheral clocks. *Nature Reviews. Neuroscience*, 2, 521-526.
- Bunney, W.E., Bunney, B.G., 2000. Molecular clock genes in man and lower animals: possible implications for circadian abnormalities in depression. *Neuropsychopharmacology*, 22(4), 335-45.
- Canan, S., 2001., <http://www.sinancanan.net/bilimsel/ritim.htm> (20.06.2013).
- Cao, X, Sudhof TC., 2001. A transcriptionally [correction of transcriptively] active complex of APP with Fe65 and histone acetyltransferase Tip60. *Science* 293: 115–120.
- Cao, X., & Sudhof, TC., 2004. Dissection of amyloid-beta precursor protein-dependent transcriptional transactivation. *Journal Of Chemical Biology*, 279, 24601–24611.
- Chinnery, P.F., Crompton, D.E., Birchall, D., Jackson, M.J., Coulthard, A., Lombes, A., Quinn, N., Wills, A., Fletcher, N., Mottershead, J.P., et al., 2007. Clinical features and natural history of neuroferritinopathy caused by the FTL1 460InsA mutation. *Brain*, 130, 110–119.
- Conrad, ME, Umbreit JN, Moore EG., 1991. A role for mucin in the absorption of inorganic iron and other metal cations. A study in rats. *Gastroenterology*, Jan;100(1):129-36.
- Conrad, ME, Umbreit JN., 2000. Iron absorption and transport-an update. *American Journal Of Hematology*, Aug;64(4):287-98.
- Cooperman, SS, Meyron-Holtz EG, Olivierre-Wilson H, Ghosh MC, McConnell JP, Rouault TA., 2005. Microcytic anemia, erythropoietic protoporphyria and neurodegeneration in mice with targeted deletion of iron regulatory protein 2. *Blood* 106: 1084–1091.
- De Domenico, I, Ward DM, Nemeth E, Vaughn MB, Musci G, Ganz T, Kaplan J., 2005. The molecular basis of ferroportin-linked hemochromatosis. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America*, 102: 8955–8960.
- De Domenico, I., Ward, D.M., di Patti, M.C., Jeong, S.Y., David, S., Musci, G., and Kaplan, J., 2007. Ferroxidase activity is required for the stability of cell surface ferroportin in cells expressing GPI-ceruloplasmin. *The EMBO Journal*, 26, 2823–2831.
- DeToma, AS, Salamekh S, Ramamoorthy A, Lim MH., 2012. Misfolded proteins in Alzheimer's disease and type II diabetes. *Chemical Society Reviews*, 41:608-621.
- Donovan, A, Lima CA, Pinkus JL, Pinkus GS, Zon LI, Robine S, Andrews NC., 2005. The iron exporter ferroportin/Slc40a1 is essential for iron homeostasis. *Cell Metabolism* 1: 191–200.
- Doyon, Y., Côté, J., 2004. The highly conserved and multifunctional NuA4 HAT complex. *Current Opinion in Genetics & Development*, 14, 147–154.
- Duce, JA, Tsatsanis A, Cater MA, James SA, Robb E, Wikhe K, Leong SL, Perez K, Johanssen T, Greenough MA, Cho HH, Galatis D, Moir RD, Masters CL, McLean C, Tanzi RE, Cappai R, Barnham KJ, Ciccotosto GD, Rogers JT, Bush AI., 2010. Iron-export ferroxidase activity of β -amyloid precursor protein is inhibited by zinc in Alzheimer's disease. *Cell*, 17;142(6):857-67.
- Dunlap, J.C., 1999. Molecular bases for circadian clocks. *Cell*, 9, :271-290.

- Eisenstein, RS., 2000. Iron regulatory proteins and the molecular control of mammalian iron metabolism. *Annual Review Of Nutrition*, 20: 627–62.
- Eldebiran, A., Toros, H. ve Şen, O., 2003. Biyolojik ritim, III. Atmosfer Bilimleri Sempozyumu, 19-21 Mart, İTÜ, İstanbul. ISBN.975-561-236-X.
- Fleming, RE, Bacon BR., 2005. Orchestration of Iron Homeostasis. *New England Journal of Medicine*, 352(17):1741-4. 25.
- Galy, B, Ferring D, Minana B, Bell O, Janser HG, Muckenthaler M, Schümann K, Hentze MW., 2005. Altered body iron distribution and microcytosis in mice deficient in iron regulatory protein 2 (IRP2). *Blood*, 106: 2580–2589.
- Ganz, T., 2003. Hepcidin, a key regulator of iron metabolism and mediator of anemia of inflammation. *Blood*, 102:783-788.
- Ganz, T., 2004. Hepcidin in iron metabolism. *Current Opinion In Hematology*, 11: 251-254.
- Ganz, T., 2005. Hepcidin-a regulator of intestinal iron absorption and iron recycling by macrophages. *Best Practice & Research Clinical Haematology*, 18 (2):171-82.
- Ganz, T., 2006. Nemeth E. Iron imports. IV. Hepcidin and regulation of body iron metabolism. *American Journal Of Physiology. Gastrointestinal And Liver Physiology*, 290: 199-203.
- Ganz, T., 2007. Molecular control of iron transport. *Journal Of The American Society Of Nephrology : JASN*, 18: 394–400.
- Gaughan, L., Brady, M.E., Cook, S., Neal, D.E., Robson, C.N., 2001. Tip60 is a coactivator specific for class I nuclear hormone receptors. *The Journal Of Biological Chemistry*, 276, 46841–46848.
- Gaughan, L., Logan, I. R., Cook, S., Neal, D. E., & Robson, C. N., 2002. TIP60 and histone deacetylase 1 regulate androgen receptor activity through changes to the acetylation status of the receptor. *The Journal Of Biological Chemistry*, 277, 25904–25913.
- Gavaravarapu, S., & Kamine, J., 2000. TIP60 inhibits activation of CREB protein by protein kinase A. *Biochem. Biophys. Res. Com-mun.*, 269, 758–766.
- Goldman, B. D., 2001. Mammalian photoperiodic system: formal properties and neuroendocrine mechanisms of photoperiodic time measurement. *Journal Of Biological Rhythms*, 16, 283-301.
- Goswami, T, Andrews NC., 2006. Hereditary hemochromatosis protein, HFE, interaction with transferrin receptor 2 suggests a molecular mechanism for mammalian iron sensing. *The Journal Of Biological Chemistry*, 281: 28494–28498.
- Graff, J, Mansuy IM., 2009. Epigenetic dysregulation in cognitive disorders. *The European Journal Of Neuroscience*, 30: 1–8.
- Halkidou, K., Gnanapragasam, V. J., Mehta, P. B., Logan, I. R., Brady, M. E., Cook, S., et al., 2003. Expression of TIP60, an androgen receptor coactivator, and its role in prostate cancer development. *Oncogene*, 22, 2466–2477.
- Halkidou, K., Logan, I. R., Cook, S., Neal, D. E., & Robson, C.N., 2004. Putative involvement of the histone acetyltransferase TIP60 in ribosomal gene transcription. *Nucleic Acids Research*, 32,1654–1665.
- Hardy, JA, Higgins GA., 1992. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science*, 256:184-185.

- Harris, ZL, Durley AP, Man TK, Gitlin JD., 1999. Targeted gene disruption reveals an essential role for ceruloplasmin in cellular iron efflux. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America*, Sep 14;96(19):10812-7.
- Harris, Z.L., Takahashi, Y., Miyajima, H., Serizawa, M., MacGillivray, R.T., and Gitlin, J.D., 1995. Aceruloplasminemia: molecular characterization of this disorder of iron metabolism. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America*, 92, 2539–2543.
- Hlubek, F., Lohberg, C., Meiler, J., Jung, A., Kirchner, T., & Brabletz, T., 2001. TIP60 is a cell-type-specific transcriptional regulator. *Journal Of Biochemistry (Tokyo)*, 129, 635–641.
- Ikura, T., Ogryzko, V.V., Grigoriev, M., Groisman, R., Wang, J., Horikoshi, M., Scully R., Qin J. and Nakatani Y., 2000. Involvement of the TIP60 Histone Acetylase Complex in DNA Repair and Apoptosis. *Cell*, 102, 463–473.
- Jakob-Roetne, R, Jacobsen H., 2009. Alzheimer's disease: from pathology to therapeutic approaches. *Angewandte Chemie (International ed. in English)*, 48:3030-3059.
- Johannesson, T, Kristinsson J, Torsdottir G, Snaedal J., 2012. Ceruloplasmin (Cp) and iron in connection with Parkinson's disease (PD) and Alzheimer's disease (AD). *Laeknabladid*, 98(10):531-7.
- Jordan, JB, Poppe L, Haniu M, Arvedson T, Syed R, Li V, Kohno H, Kim H, Schnier PD, Harvey TS, Miranda LP, Cheetham J, Sasu BJ., 2009. Heparin revisited, disulfide connectivity, dynamics, and structure. *The Journal Of Biological Chemistry*, 284(36):24155-67.
- Jud, C., Schmutz, I., Hampp, G., Oster, H., Albrecht, U., 2005. A guideline for analyzing circadian wheel-running behavior in rodents under different lighting conditions. *Biological procedures online* 7(1), 101-116.
- Kamine, J, Elangovan B, Subramanian T, Coleman D, Chinnadurai G., 1996. Identification of a cellular protein that specifically interacts with the essential cysteine region of the HIV-1 Tat transactivator. *Virology* 216: 357–366.
- Keha, E. E., Küfrevioğlu, Ö.İ., 2004. *Biyokimya, Aktif Yayınevi, Erzurum*.
- Kemna, EH, Tjalsma H, Willems HL, Swinkels DW., 2008. Heparin: from discovery to differential diagnosis. *Haematologica*, 93(1):90-7.
- Kennaway, D.J., 2005. The role of circadian rhythmicity in reproduction. *Human Reproduction Update*, 11, 91–101.
- Kim, H. S., Kim, E. M., Kim, N. J., Chang, K. A., Choi, Y., Ahn, K. W., et al., 2004. Inhibition of histone deacetylation enhances the neurotoxicity induced by the C-terminal fragments of amyloid precursor protein. *Journal Of Neuroscience Research*, 75, 117–124.
- Kinoshita, A, Whelan CM, Berezovska O, Hyman BT., 2002. The gamma secretase-generated carboxyl-terminal domain of the amyloid precursor protein induces apoptosis via Tip60 in H4 cells. *The Journal Of Biological Chemistry*, 277: 28530–28536.
- Kinoshita, A., Shah, T., Tangredi, M.M., Strickland, D. K., & Hyman, B. T., 2003. The intracellular domain of the low density lipoprotein receptor-related protein modulates transactivation mediated by amyloid precursor protein and Fe65. *The Journal Of Biological Chemistry*, 278, 41182–41188.

- Klausner, R.D., Rouault, T.A., and Harford, J.B., 1993. Regulating the fate of mRNA: The control of cellular iron metabolism. *Cell* 72, 19–28.
- Klomp, L.W., Farhangrazi, Z.S., Dugan, L.L., and Gitlin, J.D., 1996. Ceruloplasmin gene expression in the murine central nervous system. *The Journal Of Clinical Investigation*, 98, 207–215.
- Klug, W.S., Cummings R.M., ve grupları., 2003. Genetik Kavramalar (Çeviri: C. Öner) Palme yayıncılık.
- Krause, A, Neitz S, Magert HJ et al., 2000. LEAP-1; a novel highly disulfide-bonded human peptide, exhibits antimicrobial activity. *FEBS Letters*, 480, 147-50.
- Lee, P., Peng H., Gelbart T., Wang L. and Beutler E., 2005. Regulation of hepcidin transcription by interleukin–1 and interleukin–6. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America*, 102, 1906–1910.
- Lee, H. J., Chun, M., & Kandror, K. V., 2001. TIP60 and HDAC7 interact with the endothelin receptor a and may be involved in downstream signaling. *The Journal Of Biological Chemistry*, 276, 16597–16600.
- Legube, G., & Trouche, D., 2003. Identification of a larger form of the histone acetyl transferase TIP60. *Gene*, 310, 161–168.
- Li, Q., & Sudhof, T. C., 2004. Cleavage of amyloid-beta precursor protein and amyloid-beta precursor-like protein byBACE1. *The Journal Of Biological Chemistry*, 279, 10542–10550.
- Lin, L, Goldberg YP, Ganz T., 2005. Competitive regulation of hepcidin mRNA by soluble and cell-associated hemojuvelin. *Blood* 106: 2884–2889.
- Lorbeck, M, Pirooznia K, Sarthi J, Zhu X, Elefant F., 2011. Microarray analysis uncovers a role for Tip60 in nervous system function and general metabolism. *PLoS One* 6: e18412.
- Mackenzie, B, Garrick MD., 2005. Iron imports. II. Iron uptake at the apical membrane in the intestine. *American Journal Of Physiology. Gastrointestinal And Liver Physiology*, 289: 981–986.
- Mantovan, M.C., Martinuzzi, A., Squarzanti, F., Bolla, A., Silvestri, I., Liessi, G., Macchi, C., Ruzza, G., Trevisan, C.P., and Angelini, C., 2006. Exploring mental status in Friedreich’s ataxia: a combined neuropsychological, behavioral and neuroimaging study. *European Journal Of Neurology*, 13, 827–835.
- Meyron-Holtz, EG, Ghosh MC, Iwai K, LaVaute T, Brazzolotto X, Berger UV, Land W, Ollivierre-Wilson H, Grinberg A, Love P, Rouault TA., 2004. Genetic ablations of iron regulatory proteins 1 and 2 reveal why iron regulatory protein 2 dominates iron homeostasis. *The EMBO Journal*, 23: 386–395.
- Michelle, L. Wallander,bc Elizabeth A., 2006. Leibold,abc and Richard S. Eisensteind. Molecular control of vertebrate iron homeostasis by iron regulatory proteins. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1763(7): 668–689.
- Moore, R. Y., and Eichler, V. B., 1972. Loss of a circadian adrenal corticosterone rhythm following suprachiasmatic lesions in the rat. *Brain research*, 42, 201-6.
- Morgan, EH, Baker E., 1986. Iron uptake and metabolism by hepatocytes. *Federation Proceedings*, Nov;45(12):2810-6.
- Muller, T, Concannon CG, Ward MW, Walsh CM, Tirniceriu AL, et al., 2007. Modulation of gene expression and cytoskeletal dynamics by the amyloid precursor protein intracellular domain (AICD). *Molecular Biology Of The Cell*, 18: 201–210.

- Nemeth, E, Ganz T., 2006. Regulation of iron metabolism by hepcidin. *Annual Review Of Nutrition*, 26:323–42.
- Nemeth, E, Preza GC, Jung CL, Kaplan J, Waring AJ, Ganz T., 2006. The N-terminus of hepcidin is essential for its interaction with ferroportin: Structure-function study. *Blood* 107: 328–333.
- Nemeth, E, Rivera S, Gabayan V, Keller C, Taudorf S, Pedersen BK, Ganz T., 2004. IL-6 mediates hypoferremia of inflammation by inducing the synthesis of the iron regulatory hormone hepcidin. *The Journal Of Clinical Investigation*, 113: 1271–1276.
- Nemeth, E, Valore EV, Territo M, Schiller G, Lichtenstein A, Ganz T., 2003. Hepcidin, a putative mediator of anemia of inflammation, is a type II acute-phase protein. *Blood*, 101: 2461–2463.
- Nemeth, E., 2008. Iron regulation and erythropoiesis. *Current Opinion In Hematology*, 15: 169–175
- Nevo, E., Guttman, R., Haber, M., and Erez, E., 1982. Activity patterns of evolving mole rats. *J Mammal* 63, 453–463.
- Nordentoft, I., & Jorgensen, P., 2003. The acetyltransferase 60 kDa trans-acting regulatory protein of HIV type 1-interacting protein (TIP60) interacts with the translocation E26 transforming specific leukaemia gene (TEL) and functions as a transcriptional co-repressor. *The Biochemical Journal*, 374, 165–173.
- Oster, H, Maronde E, Albercht U., 2002. The circadian clock as a molecular calendar. *Chronobiology international* May;19(3):507-16.
- Panda, S., Antoch, M. P., Miller, B. H., Su, A. I., Schook, A. B., Straume, M., Schultz, P. G., Kay, S. A., Takahashi, J. S., and Hogenesch, J. B. (2002). Coordinated transcription of key pathways in the mouse by the circadian clock. *Cell*, 109, 307-20.
- Papanikolaou, G, Pantopoulos K., 2005. Iron metabolism and toxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 202, 199– 211.
- Park, CH, Valore EV, Waring AJ, Ganz T., 2001. Hepcidin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver. *The Journal Of Biological Chemistry*, 276: 7806–7810.
- Patel, B.N., Dunn, R.J., Jeong, S.Y., Zhu, Q., Julien, J.P., and David, S., 2002. Ceruloplasmin regulates iron levels in the CNS and prevents free radical injury. *The Journal Of Neuroscience: The Official Journal Of The Society For Neuroscience*, 22, 6578–6586.
- Peeling, P, Dawson B, Goodman C, Landers G, Wiegerinck ET, Swinkels DW, Trinder D., 2009. Effects of exercise on hepcidin response and iron metabolism during recovery. *International Journal Of Sport Nutrition And Exercise Metabolism*, 19(6):583-97.
- Pigeon, C, Ilyin G, Courselaud B, Leroyer P, Turlin B, Brissot P, Loreal O., 2001. A new mouse liver-specific gene, encoding a protein homologous to human antimicrobial peptide hepcidin, is overexpressed during iron overload. *The Journal Of Biological Chemistry*, 276: 7811–7819.
- Pirooznia, SK, Sarthi J, Johnson AA, Toth MS, Chiu K, Koduri S, Elefant F., 2012. Tip60 HAT activity mediates APP induced lethality and apoptotic cell death in the CNS of a Drosophila Alzheimer's disease model. *PLoS One*. 7(7):e41776.

- Pittendrigh, C. S., 1993. Temporal organization: reflections of a Darwinian clockwatcher. *Annual Review Of Physiology*, 55, 16-54.
- Polevoda, B., & Sherman, F., 2002. The diversity of acetylated proteins. *Genome Biology*, 3 [reviews].
- Rajagopal, A, Rao AU, Amigo J, Tian M, Upadhyay SK, Hall C, Uhm S, Mathew MK, Fleming MD, Paw BH, Krause M, Hamza I., 2008. Haem homeostasis is regulated by the conserved and concerted functions of HRG-1 proteins. *Nature*. Jun 19;453(7198):1127-31.
- Ralph, M.R., Foster, R.G., Davis, F.C., and Menaker, M. (1990). Transplanted suprachiasmatic nucleus determines circadian period. *Science*, 247, 975–978.
- Ran, Q., & Pereira-Smith, O. M., 2000. Identification of an alternatively spliced form of the Tat interactive protein (TIP60), TIP60(beta). *Gene*, 258, 141–146.
- Raphael, Margueron, Patrick Trojer ve Danny Reinberg., 2005. The key to development: interpreting the histone code. *Current Opinion in Genetics & Development*, 15:163–176.
- Rauk, A., 2009. The chemistry of Alzheimer's disease. *Chemical Society Reviews*, 38:2698-2715.
- Rensing, L., Meyer-Grahe, U., and Ruoff, P., 2001. Biological timing and the clock metaphor: oscillatory and hourglass mechanisms. *Chronobiology International*, 18, 329-69.
- Rivera S, Nemeth E, Gabayan V, Lopez MA, Farshidi D, Ganz T., 2005. Synthetic hepcidin causes rapid dose-dependent hypoferremia and is concentrated in ferroportin-containing organs. *Blood* 106: 2196–2199.
- Robb, A., 2004. Wessling-Resnick M. Regulation of transferrin receptor 2 protein levels by transferrin. *Blood* 104: 4294–4299.
- Rogers, J.T., Randall, J.D., Cahill, C.M., Eder, P.S., Huang, X., Gunshin, H., Leiter, L., McPhee, J., Sarang, S.S., Utsuki, T., et al., 2002. An iron-responsive element type II in the 50-untranslated region of the Alzheimer's amyloid precursor protein transcript. *The Journal Of Biological Chemistry*, 277, 45518–45528.
- Rossi, E., 2005. Hepcidin-the iron regulatory hormone. *The Clinical Biochemist. Reviews*, 26(3):47-9.
- Rouaux C, Jokic N, Mbebi C, Boutillier S, Loeffler JP, et al., 2003. Critical loss of CBP/p300 histone acetylase activity by caspase-6 during neurodegeneration. *EMBO Journal*, 22: 6537–6549.
- Roy, CN, Enns CA., 2000. Iron homeostasis: new tales from the crypt. *Blood* 96: 4020–4027.
- Sapountzi, V., Logan, I.R., Robson, C.N., 2006. Cellular functions of TIP60. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 38(9), 1496-509.
- Sarathi, J, Elefant F., 2011. dTip60 HAT activity controls synaptic bouton expansion at the Drosophila neuromuscular junction. *PLoS One* 6: e26202.
- Schaap, CC, Hendriks JC, Kortman GA, Klaver SM, Kroot JJ, Laarakkers CM, Wiegerinck ET, Tjalsma H, Janssen MC, Swinkels DW., 2013. Diurnal rhythm rather than dietary iron mediates daily hepcidin variations. *Clinical Chemistry*, 59(3):527-35.
- Schimanski, LM, Drakesmith H, Merryweather-Clarke AT, Viprakasit V, Edwards JP, Sweetland E, Bastin JM, Cowley D, Chinthammitr Y, Robson KJ, Townsend

- AR., 2005. In vitro functional analysis of human ferroportin (FPN) and hemochromatosis-associated FPN mutations. *Blood* 105: 4096–4102.
- Schwartz, W. J., de la Iglesia, H. O., Zlomanczuk, P., and Illnerova, H., 2001. Encoding le quattro stagioni within the mammalian brain: photoperiodic orchestration through the suprachiasmatic nucleus. *Journal Of Biological Rhythms*, 6, 302–11.
- Scott, LE, Orvig C., 2009. Medicinal inorganic chemistry approaches to passivation and removal of aberrant metal ions in disease. *Chemical Reviews*, 109:4885–4910.
- Sensi, S., Pace-Palitti, V., Guagnaro, M.T., 1993. Chronobiology in endocrinology. *Annali dell'Istituto superiore di sanità*, 23:613–631.
- Shayeghi, M, Latunde-Dada GO, Oakhill JS, Laftah AH, Takeuchi K, Halliday N, Khan Y, Warley A, McCann FE, Hider RC, Frazer DM, Anderson GJ, Vulpe CD, Simpson RJ, McKie AT., 2005. Identification of an intestinal heme transporter. *Cell* 122: 789–801.
- Sliva, D., Zhu, Y. X., Tsai, S., Kamine, J., & Yang, Y. C., 1999. TIP60 interacts with human interleukin-9 receptor alpha-chain. *Biochemical And Biophysical Research Communications*, 263, 149–155.
- Slomnicki, LP, Lesniak W., 2008. A putative role of the Amyloid Precursor Protein Intracellular Domain (AICD) in transcription. *Acta Neurobiologiae Experimentalis*, 68: 219–228.
- Stephan, F. K. and Zucker, I., 1972. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America*, 69, 1583–1596.
- Sterner, D.E., Berger, S.L., 2000. Acetylation of histones and transcription related factors. *Microbiology And Molecular Biology Reviews* : Mmbr, 64, 435–459.
- Storch, K., Lipan, O., Leykin, I., Viswanathan, N., Davis, F., Wong, W., and Weitz, C., 2002. Extensive and divergent circadian gene expression in liver and heart, *Nature* 417, 78–83.
- Strahl, B. D., & Allis, C. D., 2000. The language of covalent histone 965 modifications. *Nature*, 403, 41–45.
- Sumioka, A., Nagaishi, S., Yoshida, T., Lin, A., Miura, M., & Suzuki, T., 2005. Role of 14-3-3gamma in FE65-dependent gene transactivation mediated by the amyloid beta-protein precursor cytoplasmic fragment. *The Journal Of Biological Chemistry*, 280, 42364–42374.
- Tang, Y, Luo J, Zhang W, Gu W., 2006. Tip60-dependent acetylation of p53 modulates the decision between cell-cycle arrest and apoptosis. *Molecular Cell*, 24: 827–839.
- Telese, F., Bruni, P., Donizetti, A., Gianni, D., D'Ambrosio, C., Scaloni, A., et al., 2005. Transcription regulation by the adaptor protein Fe65 and the nucleosome assembly factor SET. *European Molecular Biology Organization Reports*, 6, 77–82.
- Trinchese, F, Fa M, Liu S, Zhang H, Hidalgo A, et al., 2008. Inhibition of calpains improves memory and synaptic transmission in a mouse model of Alzheimer disease. *The Journal Of Clinical Investigation*, 118: 2796–2807.
- Troutt, JS, Rudling M, Persson L, Ståhle L, Angelin B, Butterfield AM, Schade AE, Cao G, Konrad RJ., 2012. Circulating human hepcidin-25 concentrations display a diurnal rhythm, increase with prolonged fasting, and are reduced by growth hormone administration. *Clinical Chemistry*, 58(8):1225–32.
- Turner, B.M., 2002. Cellularmemory and the histone code. *Cell*, 111, 285–291.

- Utle, R. T., & Cote, J., 2003. The MYST family of histoneacetyltransferases. *Current Topics In Microbiology And Immunology*, 274, 203–236.
- Van den Pol, A. N., Finkbeiner, S. M., and Cornell-Bell, A. H., 1992. Calcium excitability and oscillations in suprachiasmatic nucleus neurons and glia in vitro. *The Journal Of Neuroscience: The Official Journal Of The Society For Neuroscience*, 12, 2648-64.
- Wang, RH, Li C, Xu X, Zheng Y, Xiao C, Zervas P, Cooperman S, Eckhaus M, Rouault T, Mishra L, Deng CX., 2005. A role of SMAD4 in iron metabolism through the positive regulation of hepcidin expression. *Cell Metabolism*, 2: 399–409.
- Wolozin, B, Iwasaki K, Vito P, Ganjei JK, Lacana E, et al., 1996. Participation of presenilin 2 in apoptosis: enhanced basal activity conferred by an Alzheimer mutation. *Science* 274: 1710–1713.
- Xiao, YT, Xiang LX, Shao JZ., 2007. Bone morphogenetic protein. *Biochemical And Biophysical Research Communications*, 362: 550–553.
- Xiao, H., Chung, J., Kao, H. Y., & Yang, Y. C., 2003. TIP60 is a co-repressor for STAT3. *The Journal Of Biological Chemistry*, 278, 11197–11204.
- Yang, Z., Cool, B., Martin, G., & Hu, Q., 2006. A dominant role for FE65 (APBB1) in nuclear signaling. *The Journal Of Biological Chemistry*, 17;281(7):4207-14.
- Zhang, Y, Li MM, Zeng F, Yao C, Wang KP., 2012. Study to establish the role of JAK2 and SMAD1/5/8 pathways in the inhibition of hepcidin by polysaccharides from *Angelica sinensis*. *Journal of Ethnopharmacology*, 21;144(2):433-40.

ÖZGEÇMİŞ

1989 yılında Bayburt Demirözü ilçesinde doğdu. İlk ve orta öğrenimini Bayburt'ta, lise eğitimini ise Gümüşhane'de tamamladı. 2005 yılında girdiği Atatürk Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden 2009 yılında mezun oldu. 2011 yılında Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine başladı. Aynı yıl Araştırma Görevlisi olarak Bingöl Üniversitesi'nde başladığı görevine halen devam etmektedir.