

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**DEJENERASYON SÜRECİNDEKİ KAS DOKUSUNDA
HOUSEKEEPING GENLERİN
EKSPRESYON DÜZEYİNİN İNCELENMESİ**

Ayşe YÜZBAŞIOĞLU

Danışman Öğretim Üyesi

Prof.Dr. M.Nejat AKAR

**ANKARA
2008**


Prof. Dr. M. Nejat Akar danışmanlığında, Ayşe Yüzbaşıoğlu tarafından hazırlanan bu çalışma 07/05/2008 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü Temel Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman : **Prof. Dr. M. Nejat Akar**
Eş Danışman : **Prof. Dr. Meral Özgüç**


Başkan : Prof. Dr. Meral Özgüç
Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi

İmza : 

Üye : Prof. Dr. Alp Can
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi

İmza : 

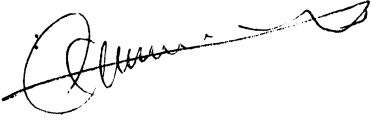
Üye : Prof. Dr. Serap Emre
Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi

İmza : 

Üye : Doç. Dr. Mustafa Tekin
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi

İmza : 

Üye : Doç. Dr. Y. Çetin Kocaefe
Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi

İmza : 

Yukarıdaki sonucu onaylarım



Prof. Dr. Alp CAN

Enstitü Müdürü

Dejenerasyon Sürecindeki Kas Dokusunda *Housekeeping* Genlerin Ekspresyon Düzeyinin İncelenmesi

ÖZET

RT-PCR ve kantitatif PCR uygulamaları, hücre ve dokuların çevresel uyaranlara verdikleri mRNA düzeyindeki cevabın incelenmesi için başvurulan yöntemlerdir. RT-PCR uygulamalarında ilgilenilen genin ekspresyon düzeyinin incelenebilmesi için dokuda ekspresyonu değişmeyen bir diğer genin ürünü olan mRNA ile standardize edilmesi gereklidir (normalizasyon). Bu amaçla çeşitli doku ve hücre tiplerinde kullanılan ve ekspresyonu minimal farklılık gösteren *housekeeping* genler kullanılmaktadır. Kısa ölçekli ve doku mimarisi değişiklikleri sergilemeyen deneylerde *housekeeping* genlerden uygun olanı seçilerek normalizasyon aşamalarında kullanılabilir. Ancak, kronik kas dejenerasyonu gibi, dokunun köklü değişiklikler sergilediği ve yeniden yapılanmaya gittiği durumlarda, bu genlerin ekspresyon düzeylerinin güvenilir ölçüde sabit olup olmadığı bilinmemektedir. Bu nedenle kas dokusu kronik dejenerasyon modeli gibi yaygın doku değişikliklerinin bulunduğu durumlarda güvenilir bir normalizasyon geni ihtiyacı vardır. Bu çalışmanın amacı, doku mimarisi değişikliklerinin sergilendiği iki farklı kronik kas dejenerasyonu modelinde, dejenerasyon sürecinde, hangi *housekeeping* genlerin ekspresyon düzeylerinin en az değişim gösterdiğinin incelenmesidir. Bu amaçla kronik kas dejenerasyonu modeli olarak “denervasyon” ve “tenotomi” modelleri kullanılmıştır. Her iki modelde de kontralateral kas dokusu kontrol doku olarak kullanılmıştır. Çalışmada β -aktin, TBP, GAPDH ve HPRT ekspresyonları incelenmiştir. Çalışmanın sağlaması için izlenen ekspresyon miktarının kas atrofisi ile ilişkilendirilebilmesi amacıyla kas dokusunun yapısal proteinlerinden biri olan miyozin ağır zincir ekspresyonu analizi de yapılmıştır.

2008, 54 sayfa

Anahtar Kelimeler: RT-PCR, normalizasyon, *housekeeping* gen, kas dejenerasyonu

Assessment of the Ekspresion of Housekeeping Genes in Degenerating Muscle

ABSTRACT

RT-PCR and quantitative PCR applications are widely used for the assessment of transcriptional response that cells and tissues develop for external stimuli. For samples that have been collected over a time period or under various physiological conditions, RT-PCR technique is employed to observe any gene of interest. A housekeeping gene whose expression is believed to be stable is used to normalize the expression of the gene of interest. A large battery of genes are being used for the normalization of gene expression in short-term studies where tissue architectural changes are not observed. But under extreme conditions such as the chronic muscle degeneration, the tissue architecture is deteriorated and the cell population exhibit important variations. Thus the gene of choice for normalization has to be carefully assessed under such conditions. The aim of this study is to assess and compare the expression variations of various housekeeping genes on the course of two diverse models of muscle degeneration where large tissue architectural changes are observed. Denervation and tenotomy are the models that are chosen for the study where experimental interventions have been made on the right extremity of rats and the contralateral-side muscles have been utilized as control. The expression of β -actin, TBP, GAPDH and HPRT have been investigated. In order to assess the amount of tissue deterioration, a structural gene of muscle contractile apparatus, the myosin heavy chain is also analyzed.

2008, 54 pages

Key Words: RT-PCR, normalization, housekeeping gene, muscle degeneration

TEŞEKKÜR

Tez çalışmasını gerçekleştirme fırsatı vererek akademik hayata ilk adımımı atmamı sağlayan danışmanım Prof.Dr.M.Nejat Akar'a, araştırmayı, bilimsel çalışmayı öğrenirken her yönüyle desteğini esirgemeyen yol gösterici değerli hocam Prof.Dr.Meral Özgüç'e, çalışmalarım süresince bilimsel katkıları için Doç.Dr.Y.Çetin Kocaefe'ye, hayvan deneyleri çalışmalarını için Dr.İlyas Onbaşlar, Dr.Deniz Üren, biyolog Rana Soylu'ya, laboratuvarında birlikte çalıştığım tüm arkadaşlarıma, bu süreçte gösterdikleri anlayış ve fedakarlıklardan dolayı aileme, sevgili eşim ve canım oğluma sonsuz teşekkür ederim.

Bu tez çalışması "Genombilim Teknolojileri Altyapısının Güçlendirilmesi-GENTEPE" isimli, TÜBİTAK SBAG-FP6-2 (105S364) numaralı proje tarafından desteklenmiştir.

Ayşe YÜZBAŞIOĞLU
Ankara, Mayıs 2008

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
SİMGELER DİZİNİ	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ	vii
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER	4
2.1. Kas Dejenerasyonu	4
2.2. Kas Dejenerasyonu ve Doku Mimarisi Değişiklikleri	5
2.3. Kas Dejenerasyon Modelleri	6
2.3.1. Tenotomi	6
2.3.2. Denervasyon	6
2.4. House keeping Genler	7
2.4.1. β -Aktin	7
2.4.2. TATA-Bağlanma Proteini	7
2.4.3. Gliseraldehid-3-fosfat dehidrojenaz	8
2.4.4. Hipoksantin-guanin fosforibozil transferaz	9
2.5. <i>Real Time</i> PCR	9
2.5.1. <i>Housekeeping</i> Genlerin Kantitatif RT-PCR Çalışmalarındaki Önemi	14
3. MATERYAL VE YÖNTEM	15
3.1. Materyal	15
3.2. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Malzeme ve Solüsyonlar	16
3.2.1. RNA İzolasyonu	16
3.2.2. Agaroz-formaldehid Jel Elektforezi (RNA Elektforezi)	16
3.2.3. cDNA Sentezi	16
3.2.4. <i>Real Time</i> PCR	17
3.2.5. Agaroz Jel Elektforezi	17
3.3. Yöntemler	18
3.3.1. Doku Eldesi	18
3.3.2. Histolojik İnceleme	18
3.3.3. RNA İzolasyonu	18
3.3.4. RNA'ların Kalite Kontrolü	19
3.3.5. cDNA Sentezi	19
3.3.6. <i>Real Time</i> PCR	20
3.3.7. Verilerin Analizi	22
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	23
4.1. <i>Housekeeping</i> Genlerin Ekspresyon Bulgularının Değerlendirilmesi	23
4.1.1. β -Aktin Gen Ekspresyonu Bulguları	24
4.1.1.1. β -Aktin Ekspresyonunun Korelasyon Analizi Bulguları	26
4.1.2. TBP Gen Ekspresyonu Bulguları	27
4.1.2.1. TBP Ekspresyonunun Korelasyon Analizi Bulguları	29
4.1.3. GAPDH Gen Ekspresyonu Bulguları	30
4.1.3.1. GAPDH Ekspresyonunun Korelasyon Analizi Bulguları	32
4.1.4. HPRT Gen Ekspresyonu Bulguları	33
4.1.4.1. HPRT Ekspresyonunun Korelasyon Analizi Bulguları	35
4.2. Myozin Ağır Zincir (MHC) Gen Ekspresyonu Bulguları	36
5. TARTIŞMA/SONUÇ	38
KAYNAKLAR	45
EKLER	51
EK1. MHC Geni RT-PCR Sonuçları	51
ÖZGEÇMİŞ	52

SİMGELER DİZİNİ

bç	Baz çifti
Ct	<i>Threshold cycle</i>
dk	Dakika
DMD	<i>Duchenne muscular dystrophy</i>
GAPDH	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>
GAS	<i>Gastrocnemius</i>
GMP	<i>Guanosine monophosphate</i>
g	Gram
H&E	<i>Hematoxylin and eosin</i>
HPRT	<i>Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase</i>
HRM	<i>High resolution melting curve</i>
IMP	<i>Inosine monophosphate</i>
kg	Kilogram
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
mg	Miligram
MHC	Myozin Ağır Zincir
mM	Milimolar
rpm	<i>Rotations per minute</i>
RT-PCR	<i>Reverse Transcriptase -Polymerase Chain Reaction</i>
SOL	<i>Soleus</i>
TBP	<i>TATA binding protein</i>
Tm	<i>Melting temperature</i>

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Gliseraldehid-3-fosfat dehidrojenaz enzimi aracılığı ile gliseraldehit-3-fosfattan 1,3-bisfosfogliserat oluşumu	8
Şekil 2.2. HPRT enzimi aracılığı ile hipoksantin ve guaninden IMP ve GMP oluşumu	9
Şekil 2.3. SYBR Green tekniği	10
Şekil 2.4. Erime eğrisi analizi	11
Şekil 2.5. PCR amplifikasyon eğrisi ve standart eğri	13
Şekil 4.1. β -aktin geni RT-PCR sonuçları	25
Şekil 4.2. Tenotomi ve Denervasyon modellerinde β -Aktin ekspresyonunun sağ/sol oranı korelasyon grafikleri.....	27
Şekil 4.3. TBP geni RT-PCR sonuçları	28
Şekil 4.4. Tenotomi ve Denervasyon modellerinde TBP ekspresyonunun sağ/sol oranı korelasyon grafikleri.....	30
Şekil 4.5. GAPDH geni RT-PCR sonuçları	31
Şekil 4.6. Tenotomi modelinde GAPDH ekspresyonunun sağ/sol oranı korelasyon grafiği	33
Şekil 4.7. HPRT geni RT-PCR sonuçları	34
Şekil 4.8. Tenotomi ve Denervasyon modellerinde HPRT ekspresyonunun sağ/sol oranı korelasyon grafikleri.....	36
Şekil 4.9. Tenotomi modelinde dejenerasyon sürecinde MHC ekspresyonu grafiği.....	37
Şekil 4.10. Denervasyon modelinde dejenerasyon sürecinde MHC ekspresyonu grafiği.....	37
Şekil 5.1. Tenotomi modelinde dejenerasyon histolojisi.....	38
Şekil 5.2. Denervasyon modelinde dejenerasyon histolojisi	38
Şekil 5.3. Tenotomi örnekleri RNA elektroforezi; %1.5 Agaroz – formaldehid jel.....	43
Şekil 5.4. Denervasyon örnekleri RNA elektroforezi; %1.5 Agaroz - formaldehid jel..	43

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan primerlerin dizileri, Tm dereceleri ve uzunlukları....	22
Çizelge 4.1. Tenotomi ve Denervasyon modellerinde β -Aktin geni ekspresyon analizi sonuçları	26
Çizelge 4.2. β -Aktin ekspresyonu korelasyon analizi sonuçları.....	27
Çizelge 4.3. Tenotomi ve Denervasyon modellerinde TBP geni ekspresyon analizi sonuçları.....	29
Çizelge 4.4. TBP ekspresyonu korelasyon analizi sonuçları	30
Çizelge 4.5. Tenotomi modelinde GAPDH geni ekspresyon analizi sonuçları.....	32
Çizelge 4.6. GAPDH ekspresyonunun korelasyon analizi sonuçları.....	33
Çizelge 4.7. Tenotomi ve Denervasyon modellerinde HPRT geni ekspresyon analizi sonuçları.....	35
Çizelge 4.8. HPRT ekspresyonu korelasyon analizi sonuçları	36
Çizelge 5.1. 4 <i>housekeeping</i> genin korelasyon analizi sonuçları.....	42

1. GİRİŞ

Gen ekspresyonu, DNA’da mevcut olan genetik bilginin mRNA ve protein düzeyinde ifade edilmesidir. Bir başka tanım ile gen dizilerinin, fonksiyonel protein yapılarına dönüşmesi sürecidir. Bu durum genlerin açık (işlevsel) olup olmadıkları olarak da tanımlanabilir. Hücrelerde genetik bilgi akışı DNA → RNA → Protein şeklindedir. Farklı fizyolojik veya patolojik durumlarda hücrenin genetik bilgi akışı değişir. Hücrenin genetik bilgi akışının incelenebilmesi, doku veya organizmada değişen durum karşısında hangi yolların çalışmaya başladığı ve hangi yolların kapandığı konusunda bilgi verir.

Günümüzde protein yapısındaki modifikasyonlar ve protein – protein etkileşimlerinin incelenmesi amacıyla protein çalışmaları kullanılırken, hücre ve dokularda fizyolojik veya patolojik bir etkinin cevabının incelenebilmesi amacıyla mRNA ekspresyon çalışmalarına başvurulmaktadır. Bilinen kantitatif protein ekspresyon analizlerinin başında “western blot” tekniği gelmektedir. Western blot, dokudan izole edilen proteinlerin antijen – antikor tanıma özgülüğü tekniğine dayalı olarak tanımlanması prensibi ile çalışmaktadır. Organ, doku ve hücrelerin mRNA düzeyinde incelenebilmesi, özgül olarak gen düzeyinde kantitatif analiz fırsatı vermektedir. mRNA ekspresyon analizleri “Northern blot, RT-PCR ve mikroarray” tekniği ile gerçekleştirilebilmektedir. Northern blot tekniği, mRNA’ların bir membrana transferi sonrası, radyoaktif işaretli proplar ile hibridizasyonu esasına dayanmaktadır. RT-PCR (Revers transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu) tekniğinde mRNA üzerinden revers transkriptaz enzimi ile cDNA sentezlenir ve gene özgül primerler ile PCR (Polimeraz zincir reaksiyonu) gerçekleştirilir. Bu teknik ile gen ekspresyonu semi-kantitatif veya kantitatif olarak analiz edilebilir.

Semi-kantitatif RT-PCR tekniği ile farklı fizyolojik veya patolojik durumlarda, hücre veya doku seviyesinde bir genin ekspresyonunun olup olmadığı belirlenebilir, ayrıca izlenen ekspresyon değişikliğinin bir diğer örnek veya örnek grubu ile karşılaştırması yapılabilir. İncelenen gen veya hedef dizinin kopya sayısının bilinmesinin gerektiği hallerde kantitatif RT-PCR yöntemi kullanılmaktadır. Kantitatif RT-PCR analizleri, özellikle *Real Time* PCR cihazları kullanılarak gen ekspresyon miktarının sayısal olarak belirlenebildiği çalışmalardır. Mikroarray ekspresyon analizi, hibridizasyon teknolojisinin yüksek ölçekli uygulama imkanı bulabildiği alanlarından biridir. Bir organizma genomunda yer alan

bütün genlerin eş zamanlı olarak kantitatif ekspresyon analizlerinin yapılabilmesini sağlamaktadır.

RT-PCR ve kantitatif PCR uygulamaları, hücre ve dokuların çevresel uyaranlara verdikleri mRNA düzeyindeki cevabın incelenmesi için başvurulan yöntemlerdir. İki farklı örnek arasında PCR tekniği ile miktar karşılaştırması yaparken, deneysel ve örneklerin doğasından gelen farklılıklar olabilir. RT-PCR uygulamalarında ilgilenilen genin ekspresyon düzeyinin incelenmesi için, farklı fizyolojik veya patolojik şartlarda ekspresyonu değişmeyen bir başka gen ürünü mRNA ile normalize edilmesi gereklidir (normalizasyon). Normalizasyon amacıyla, çeşitli doku ve hücre tiplerinde ekspresyon düzeyi en az değişim gösteren *housekeeping* genler kullanılmaktadır. Bu amaçla en yaygın kullanılan genlerden birisi gliseraldehid-3-fosfat dehidrojenaz (GAPDH)'dır. GAPDH, son yıllara kadar gen ekspresyonu çalışmalarında en çok kullanılan *housekeeping* genlerden biridir. Ancak, yakın zamanlarda yapılan çalışmalarda GAPDH ekspresyonunun da değişiklik gösterebildiği ve bu çalışmalarda normalizasyon amacıyla kullanılmayacağı ifade edilmiştir (Ohl *et al.* 2005, Jung *et al.* 2007). Kanserde, doku veya hücrelerde metabolik olarak ve hücre biyolojisinde meydana gelen değişiklikler, *housekeeping* genlerin ekspresyon düzeylerinin de değişimine neden olabilir. Bundan dolayı yapısal ve mimari değişiklikler sergileyen durumlarda, ekspresyon çalışmaları için önce güvenilir bir normalizasyon geninin belirlenmesi gereklidir.

Çeşitli kas hastalıkları sonucu oluşan kronik kas dejenerasyonu, atrofi, fibrozis ve daha sonraki dönemlerde oluşan yağ hücreleri infiltrasyonu ile yaygın doku mimarisi değişikliklerinin gözleendiği bir süreçtir. Bu nedenle dejenerasyon sürecindeki kas dokusunda, normalizasyon aşamasında kullanılacak *housekeeping* genlerin ekspresyon düzeylerinin güvenilir ölçüde sabit olup olmadığı bilinmemektedir ve literatürde kas dokusunda ekspresyon çalışmaları için güvenilir referans genin belirlenmesi amacıyla yapılmış bir çalışma bulunmamaktadır. Öncelikle, DMD gibi genetik kökenli kas hastalıklarının modellerini oluşturmak ve dejenerasyon sürecindeki gen ekspresyon profillerini incelemek amacıyla sıçanlarda farklı kronik dejenerasyon modelleri ile çalışılmaktadır. İnsanda gözlenen kronik kas dejenerasyonunu önemli ölçüde yansıtan iki deneysel model, tenotomi ve denervasyondur. Bu tez çalışmasının amacı, doku mimarisi değişikliklerinin sergilendiği iki farklı kronik kas dejenerasyonu modelinde, dejenerasyon

sürecinde, ekspresyon düzeyi en az değişim gösteren *housekeeping* genlerinin belirlenmesidir.

Çalışmada β -Aktin, TBP, GAPDH ve HPRT olmak üzere 4 *housekeeping* genin ekspresyon düzeyleri incelenmiştir. İzlenen ekspresyon miktarının kas atrofisi ile ilişkilendirilebilmesi için kas dokusunun yapısal proteinlerinden biri olan MHC (myozin ağır zincir) ekspresyon analizi de yapılmıştır.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1. Kas Dejenerasyonu

Erişkin iskelet kasının hücresel ünitesi kas lifidir. Kas lifleri, gelişim döneminde kas öncülü hücrelerin füzyonu ile oluşmuş, yüzlerce çekirdeğe sahip ileri derecede özelleşmiş yapılardır. Liflerin yapısal ve fonksiyonel devamlılığı, sinir iletimi ile aldıkları elektriksel sinyaller ve *preload* olarak adlandırılan, tendonlar aracılığıyla kemiklere bağlanmaları ile oluşan mekanik gerilim ile sağlanmaktadır. Bu yapının tamiri ve sürekliliği ise lifleri saran bazal lamina altında yer alan kas öncülü satellit hücreler tarafından sağlanır.

Dejeneratif kas ve sinir hastalıkları veya kullanılmamaya bağlı atrofi sırasında kaslarda progresif bir dejenerasyon görülmektedir. Hasar tamiri amacıyla öncül hücrelerden yeni kas lifleri oluşturmaya yönelik bir rejenerasyon çabası başlar. Bu yeni yapılanma, kaybedilenlerin yerini dolduramadığı zaman dejenerasyon-rejenerasyon dengesi fonksiyonel kayıp yönünde artar. Bozulan doku mimarisi içinde adipogenez ve fibrozis yönünde bir artış da söz konusu olmakla birlikte, kasın fonksiyonel bütünlüğünü koruması mümkün olmamaktadır.

Dünyada en sık görülen kalıtsal kas hastalığı “Distrofin” proteinini kodlayan gende oluşan mutasyonlarla ortaya çıkan Duchenne Kas Distrofisi’dir (DMD). DMD’de kas dokusunda devam eden hasarın tamiri yaşamın erken yıllarında mümkündür (1-3 yaş). Ancak, tamirde rol oynayan kas öncülü hücrelerdeki çoğalma ve farklılaşma kapasitesinde azalmaya bağlı rejenerasyon eksikliği daha sonraki yaşlarda yıkılan kas dokusunun tamirine yetmemekte ve dejenerasyon süreci başlamaktadır (Blau *et al.* 1983, Oexle *et al.* 2001). DMD’de ilerleyici bir dejenerasyon oluşmakta, zaman içinde kas fonksiyonlarını tamamen kaybeden hastalarda sakatlık ve ölümle sonuçlanmaktadır. Bu dejenerasyonun temel göstergeleri, kas dokusu kaybı (fibrozis), bağ dokusu artışı ve yağ hücreleri infiltrasyonudur (Hall-Craggs *et al.* 1975, Whalen *et al.* 1990, Blaveri *et al.* 1999).

2.2. Kas Dejenerasyonu ve Doku Mimarisi Değişiklikleri

Genetik kökenli kas distrofileri ve dejeneratif kas hastalıkları, kronik kas dejenerasyonu tablosu ile sonlanmaktadır. Kas dokusunun yapısal ve işlevsel bütünlüğünü sağlayan faktörler sinir inervasyonu ve mekanik yüküdür (*preload*). İnervasyonun sonlanması kas dokusunda hızlı bir yıkıma neden olur. *Preload*'un kaldırılması da kas liflerinde atrofi ve fonksiyonel kayıpla sonuçlanır. Dejeneratif kas ve sinir hastalıkları veya immobilizasyona bağlı atrofi sırasında progresif kas dejenerasyonu ile birlikte kas öncülü hücrelerden yeni kas lifleri oluşturmaya yönelik bir cevap da başlamaktadır. İskelet kası atrofisi kas lifi çapının ve/veya kas lifi sayısının azalması ile kas dokusunun kontraktıl elemanlarının kaybıdır. Kas uzun süre kullanılmadığı zaman, beslenme yetersizliği, kan akım bozukluğu veya sinir uyarı iletiminin kesildiği durumlarda, kontraktıl proteinlerin ve miyofibrillerin yıkılma hızı, yenilenme hızından daha fazladır. Dolayısıyla kas atrofisi meydana gelir. Kas dokusunda atrofi ile sonuçlanan inaktivite, mekanik yükün, diğer bir deyişle *preload*'un ortadan kalktığı uzamış yatak istirahati, yaşlanma ve sedanter yaşam, uzay uçuşları sırasında karşılaşılan yerçekimsiz ortam gibi bir patolojiye bağlı olmayan durumlarda da görülür. Bu durumlarda *preload*'un kalkması, kas hücresi boyutunda küçülme yanında bağ dokusunda artışa yol açar ve kaslarda yapı ve fonksiyon bozukluklarına neden olur. (Berg *et al.* 1991, Ohira *et al.* 2002, Jackman *et al.* 2004)

Kas atrofisini deneysel olarak taklit eden farklı hayvan modelleri geliştirilmiştir: uzay uçuşu, immobilizasyon, spinal kord kesisi, denervasyon, arka ekstremitte veya kuyruk asısı (Anzil *et al.* 1991, Jiang *et al.* 1992, Hornberger *et al.* 2001). Bu modeller, atrofünün fizyopatolojisinin anlaşılmasında ve dejenerasyonda kısa süreli moleküler değişimlerin gözlenmesinde yardımcı olmuştur.

Meyer ve arkadaşları tarafından ortopedide tedavi komplikasyonlarını inceleyen ve koyunlarda yapılan bir çalışmada oluşturulan tendon kesisi sonucunda kas uzunluğunda %50 azalma, interstisial yağ ve fibröz dokuda artış görülmüş ve bunlar kasın fizyolojik özelliklerinde kayba neden olmuştur (Meyer *et al.* 2004). Bu ve benzeri çalışmalarda (Jackman *et al.* 2004), atrofi modelinin histolojik incelemelerinde kas proteinlerinde yıkıma bağlı lif çaplarında azalma, bağ dokusu artışı, ileri dönemde adipogenez ve kas hücrelerinin yerini yağ dokusu ve fibrotik dokunun alması gözlenmiştir.

2.3. Kas Dejenerasyon Modelleri

Kas dejenerasyonu ile ilgili çalışmalarda akut kas dejenerasyonu modeli olarak; notexin/kardiotoksin, mekanik hasar veya soğuk/sıcak hasarı (fiziksel ve kimyasal etkenler) ile oluşturulmuş modeller kullanılırken, kronik kas dejenerasyonu modeli olarak immobilizasyon sağlayan arka ekstremitte süspansiyonu, tenotomi veya spinal kord kesisi ve denervasyon gibi modeller hayvanlar üzerinde deneysel olarak kullanılmaktadır (Anzil *et al.* 1991).

2.3.1. Tenotomi

Kronik immobilizasyon, tüm türlerde kas atrofisi ve yağlı dejenerasyona neden olmaktadır. Kemirgenlerde, kronik immobilizasyon yaratmak amacıyla iki farklı yöntem kullanılmaktadır. Bunlardan birincisi arka ekstremitte veya kuyruk ası modelidir (Hanson *et al.* 2005, Roland *et al.* 2005). Bu modelde arka ayakları veya kuyruğundan sürekli olarak asıda kalan bir hayvanın arka ekstremitesinde kullanım kısıtlaması yaratılmaktadır. Kronik immobilizasyon yaratan bir diğer model de tenotomidir (Gerber *et al.* 2004, Meyer *et al.* 2004). Hayvanın bir kasının tendonunun kesisi sonucu oluşturulan bu model uzun dönemde en iyi gözlem şartlarını sağlar.

Tenotomi, kas dokusunda dolaşım ve inervasyonu yerinde bırakarak ön yükün (*preload*) ortadan kaldırılması ile kasılma yeteneğinin sınırlanması prensibine dayanır. Kas dokusunun kendini idamesi için gerekli uyarılardan biri olan ön yükün, ortadan kaldırılması ile birlikte kas atrofisi, fibrozis ve yağlı dejenerasyon gelişir. Buna bağlı olarak doku mimarisi değişiklikleri izlenir.

2.3.2. Denervasyon

Dejenerasyona yol açan başka bir yöntem, sinir iletiminin ortadan kalktığı sinir kesisidir. Bu yöntem spinal kord yaralanmaları gibi hastalıklara model oluşturmak ve DMD gibi yağlı dejenerasyonla sonuçlanan patolojilerde adipogenez gelişimini araştırmak amacıyla kullanılabilir (Bacou *et al.* 1982). Çoğunlukla siyatik sinir kesisi uygulanmaktadır. Denervasyon sonucunda erken dönemde atrofi, kronik dönemde yağlı infiltrasyon

gözlenmektedir. Bu dejenerasyon, farklı türlere, kas tiplerine ve kas dokusunun biyokimyasal özelliklerine göre değişim göstermektedir. Bu değişiklikler kronik dejenerasyon sürecinde doku mimarisi değişiklikleri ve dokunun “yeniden modellenmesi” şeklinde oluşur (Dulor *et al.* 1998, Hanson *et al.* 2005).

2.4. Housekeeping Genler

Bir hücrenin temel işlevsel ve biyokimyasal fonksiyonlarında görev alan, hücrelerin tümünde eksprese olan ve ekspresyon seviyesi dokudan dokuya değişmeyen genlere *housekeeping* genler adı verilir. Bu genler, nükleik asit ve protein sentezi, besinlerin taşınması ve kullanımı, hücresel iskeletin ve organellerin biyosentezi gibi temel hücresel ve metabolik işlevler için gereklidir. *Housekeeping* genler hücrenin işleyişini düzenleyen genler olarak da ifade edilmektedir (Thompson&Thompson 2005). En yaygın olarak bilinen *housekeeping* genler ve temel fonksiyonları aşağıda verilmiştir.

2.4.1. Beta-Aktin

Aktin filamentler, monomer haldeki aktin moleküllerinin sıkıca yan yana dizilerek oluşturdukları bir sarmal yapıdır. Aktin moleküller, ilkel ökaryotlarda bir aktin geni tarafında kodlanırken, yüksek ökaryotlarda bir gen ailesi tarafından kodlanırlar. Bu nedenle birçok izoforma sahiptir. İnsanda 6 farklı aktin izoformu tanımlanmıştır (Vandekerckhove *et al.* 1978). Bunlar izoelektrik noktalarına bağlı olarak α , β ve γ olmak üzere üç sınıfta toplanırlar (Khaitlina *et al.* 2001). Beta-Aktin (β -Aktin), hücre iskeletinde bulunan aktin filamentidir. Hücrenin hareketi, yapısı ve sağlamlığında rol oynamaktadır.

2.4.2. TATA-Bağlanma Proteini

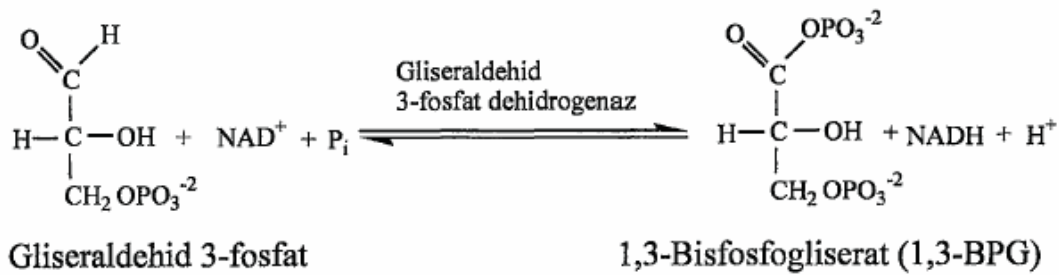
TATA-Bağlanma Proteini (TBP), transkripsiyonun başlamasında anahtar rol oynayan bir *housekeeping* gendir. Ökaryotlardaki transkripsiyon faktörlerinden TFIID'nin bir bölümüdür (Schluesche *et al.* 2007). Transkripsiyon faktörleri olmadan RNA polimeraz II enzimi ökaryotik promotör bölgelerine doğrudan bağlanamaz ve transkripsiyonu başlatamaz. RNA polimeraz II'nin bağlanmasında rol alan genel transkripsiyon faktörleri TFIIA, TFIIB, vs şeklinde adlandırılmışlardır (Öner 2003). Ökaryotlarda promotör bölgedeki TATA kutusu transkripsiyonun başlangıcından (+1) yaklaşık 30 nükleotid çifti

önde (-30) bulunur. RNA Polimeraz II, genel transkripsiyon faktörleriyle birlikte bir başlangıç öncesi kompleks oluşturur. Başlangıç öncesi kompleksi, promotördeki TATA kutusunda oluşur (Mal *et al.* 2007). TATA kutusu, TFIID tarafından tanınır. TFIID çok alt birimli bir kompleks: TBP, TATA kutusuna bağlanan alt birimidir. TBP, DNA'ya bağlanır ve küçük oluktaki bir β tabakasını kullanarak DNA'yı büküp biçimini bozar (proteinler genel olarak DNA'yı büyük oluktaki α sarmallarını kullanarak tanır). TBP ile ilişkili faktörler (TAF): TFIID'nin diğer alt birimleridir. Bazıları promotöre bağlanmaya yardım ederler, diğerleri TBP'nin DNA'ya bağlanma aktivitesini kontrol ederler.

TBP, TATA dizisini büküp yapısını bozar. TBP-DNA kompleksi diğer genel transkripsiyon faktörlerinin (sırasıyla TFIIA, TFIIB, TFIIE, TFIIF, TFIIH) ve RNA polimeraz II'nin promotörde toplanmaları için yer sağlar. Bu şekilde başlangıç öncesi kompleks oluşur.

2.4.3. Gliseraldehit-3-fosfat dehidrojenaz (GAPDH)

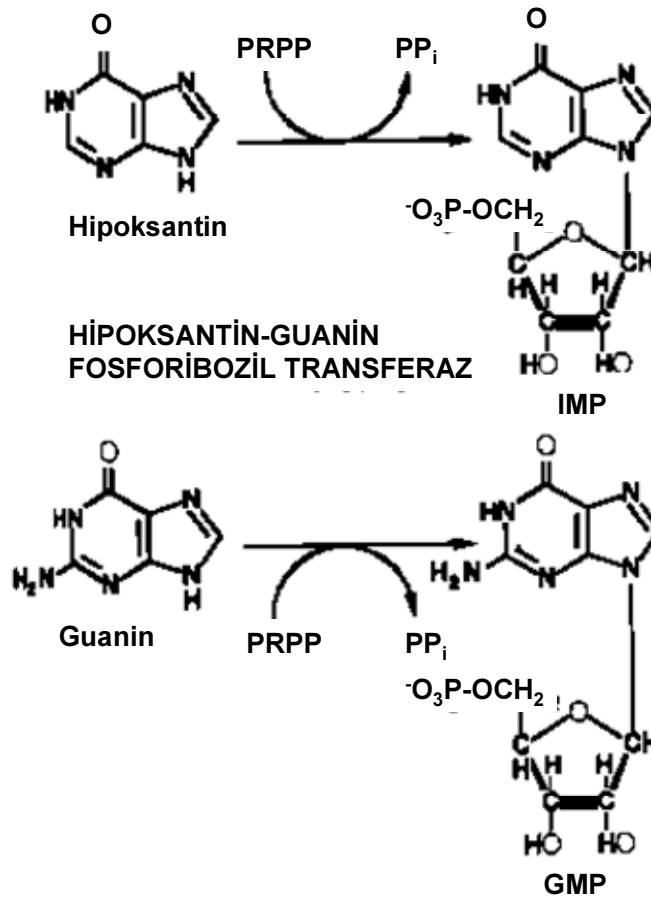
Oksijen kullanmaksızın sitoplazmada gerçekleşen, glukozun pirüvik asite (pirüvata) kadar yıkımına “glikoliz” denir. Gliseraldehit-3-fosfat dehidrojenaz (GAPDH), glikolizin ara basamaklarında gliseraldehit-3-fosfattan iki molekül 1,3-bisfosfogliserat oluşumunu katalizleyen NAD bağımlı bir dehidrojenazdır. Glikolizde açığa çıkan enerji, yaşamsal işlevler için gerekli olan kimyasal enerji şeklinde (ATP) depolanır.



Şekil 2.1. Gliseraldehit-3-fosfat dehidrojenaz enzimi aracılığı ile gliseraldehit-3-fosfattan 1,3-bisfosfogliserat oluşumu

2.4.4. Hipoksantin-guanin fosforibozil transferaz

Hipoksantin-guanin fosforibozil transferaz (HPRT), pürin nükleotidlerinin kurtarılma yolunda görev alan bir *housekeeping* genidir (Stehen *et al.* 1990). Pürin nükleotidleri, *de novo* biyosentez dışında, serbest pürin bazlarından ve serbest pürin nükleozidlerinden sentezlenebilir. Bu sentez “pürin nükleotidlerinin kurtarılma yolu” olarak ifade edilmektedir. HPRT, 5-fosforibozil-1-pirofosfatı (PRPP) riboz-5-fosfat kaynağı olarak kullanıp hipoksantin ve guaninden inozin monofosfat (IMP) ve guanozin monofosfat (GMP) oluşumunu katalizleyen enzimdir.



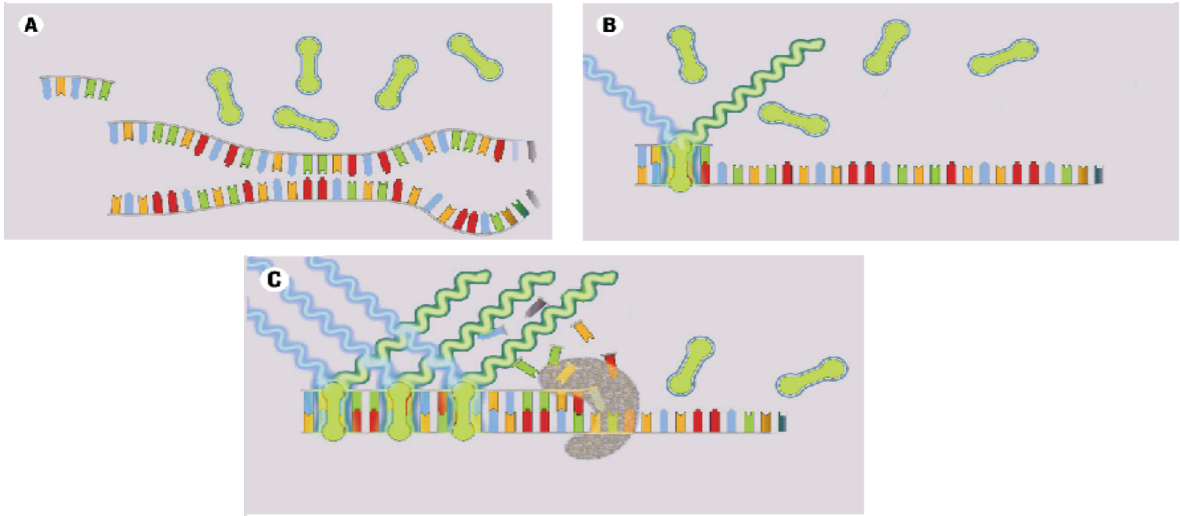
Şekil 2.2. HPRT enzimi aracılığı ile hipoksantin ve guaninden IMP ve GMP oluşumu

2.5. Real Time PCR

Real Time PCR, nükleik asit amplifikasyonunun eş zamanlı olarak gözlenmesini sağlayan bir PCR teknolojisidir. DNA sarmalına bağlanarak floresan ışığa yapan özel boyalarla (SYBR Green, SYTO9 gibi) veya yıkıma bağlı sinyal oluşturan prob diziler aracılığı ile

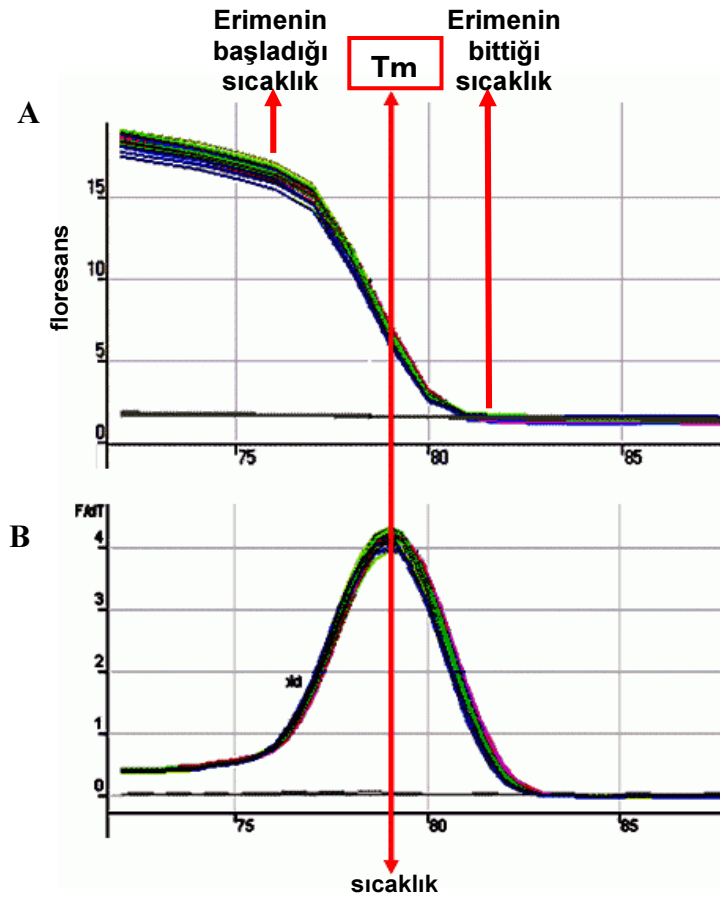
amplifikasyon miktarının tespit edilmesini sağlamaktadır. Her PCR döngüsü sonunda tüp içinde oluşan çift zincirli ürün miktarının ölçülebilmesini ve kantitatif analizlerin yapılmasını sağlar (Bustin *et al.* 2005, Nolan *et al.* 2006).

SYBR Green I, gen ekspresyonu kantitasyonunda sıklıkla kullanılan, çift zincirli DNA'ya bağlanarak floresan özellik kazanan bir boyadır. Bu boyanın çift zincirli PCR ürününe bağlanması ürün miktarı ile orantılı olarak floresans açığa çıkmasını sağlar (Şekil 2.3.). SYBR Green tekniği ile gen ekspresyonu kantitasyonu için uygun primer seçimi en önemli aşamadır. Bu tekniğin başarıyla uygulanabilmesi için PCR primerlerinin sadece özgül cDNA'ya bağlanması, primer-dimer veya özgül olmayan amplifikasyon ürünü oluşturmaması gereklidir. RNA izolasyonu sırasında sıklıkla gözlenen genomik DNA kontaminasyonu da SYBR Green tekniğinin başarısını tehdit eden bir diğer unsurdur. Özgül amplifikasyon ürünü elde etmek için, cDNA amplifikasyon primerlerinin farklı ekzonlardan seçilmesi, amplicon uzunluklarının kısa tutulması (120-250 baz) ve primerlerin bağlandığı ekzonların uzak seçilmesi dikkat edilmesi gereken noktalardır.



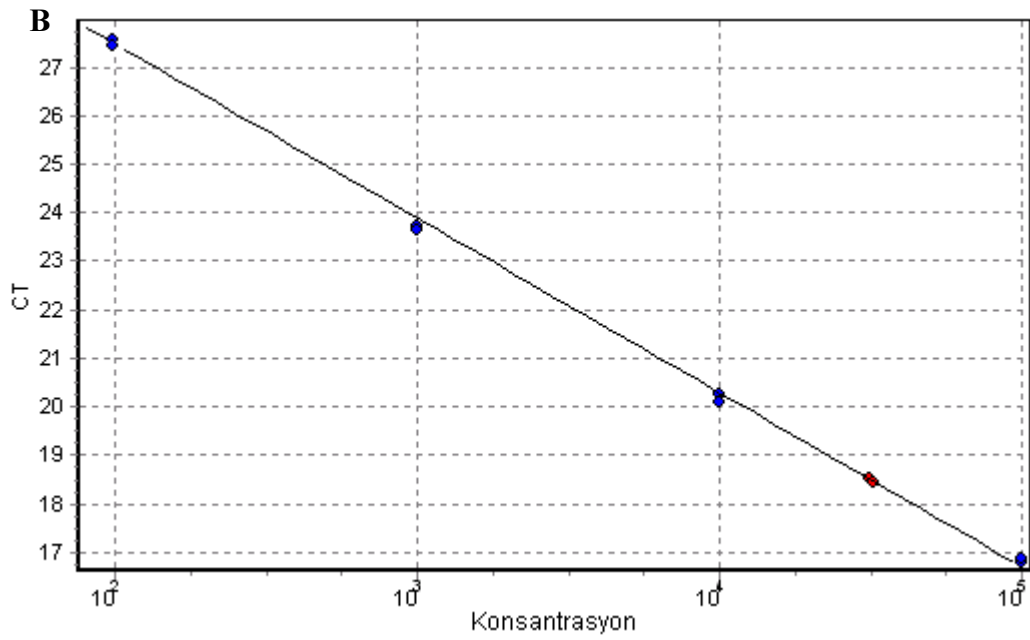
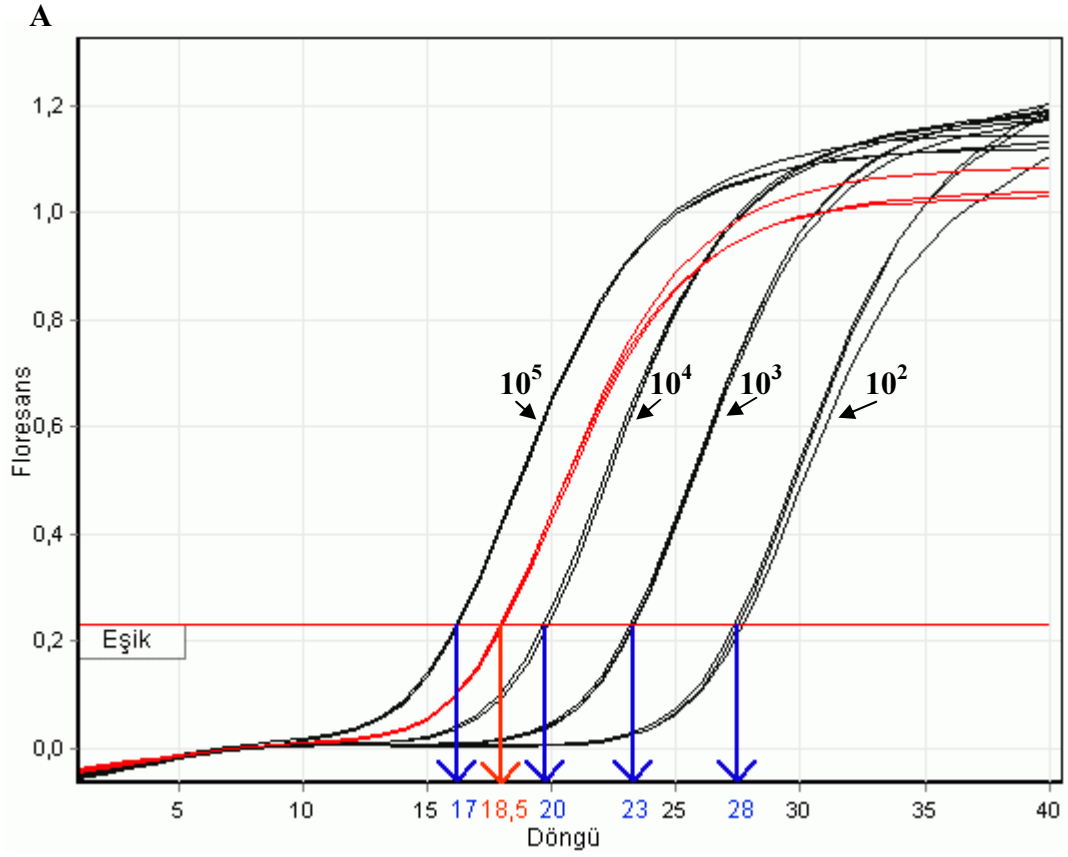
Şekil 2.3. SYBR Green tekniği **A.** Başlangıç aşaması: Reaksiyonun başlangıcında ortamda SYBR Green, primerler ve tek zincirli DNA bulunduğu için floresans sinyal yoktur. **B.** Primerin hedef moleküle bağlanması: Primerin bağlanması ile amplifikasyon sonucu SYBR Green oluşan çift zincirli DNA'ya bağlanır ve az miktarda floresan sinyal açığa çıkar. **C.** Primer uzaması: Amplifikasyon oranına bağlı olarak çift zincirli DNA'nın yapısına daha fazla boyaya katılarak floresans sinyal artar.

SYBR Green I, primer dimerleri ve özgül olmayan PCR ürünleri gibi çift zincirli DNA moleküllerine de bağlanabilir (Bustin and Mueller 2005). Bu nedenle floresans artışı her zaman özgül amplifikasyonu göstermez. Amplifikasyon ürününün özgül olup olmadığı, agaroz jel elektroforezi ile incelenir. Bununla birlikte *Real Time* PCR cihazlarında primer dimer oluşumu ve özgül olmayan amplifikasyon ürünlerinin tespiti için “melting curve” (erime eğrisi) analizi yapılabilmektedir (Şekil 2.4.A). Her çift zincirli DNA kendine özgül bir “*melting temperature, T_m*” (Çift zincirli DNA’nın %50’sinin tek zincirli hale geçmesi için gerekli olan sıcaklık) değerine sahiptir. Amplifikasyondan sonra sıcaklık yavaş yavaş yükseltilerek belirli aralıklar ile floresans miktarı tespit edilir. Çift zincirli DNA denatüre olmaya başlayınca interkale olan boya serbest kaldığı için ölçülen floresans miktarı azalmaya başlar. Bu şekilde elde edilen erime eğrisinden yararlanılarak amplifikasyonun özgüllüğü belirlenebilir. *T_m* değerinin tam olarak saptanabilmesi için erime eğrisinin zamana karşı türevi çizilebilir. Bu türev analiz, sıklıkla başvurulan bir yöntemdir (Şekil 2.4-B).



Şekil 2.4. Erime eğrisi analizi

Eşik döngü değeri (threshold cycle = Ct) Real Time PCR uygulamalarında önemli bir parametredir. Ct değeri, amplifikasyon sırasında tespit edilen floresan ışınım eşik değerinin aşıldığı döngü sayısıdır. Başka bir ifade ile üründeki ilk anlamlı artışın olduğu noktayı belirtir. Farklı PCR reaksiyonlarında yer alan kalıp örneklerin miktarı Ct değerleri karşılaştırılarak öngörülebilir (Wong and Medrano 2005). Florimetrik PCR yöntemi ile yapılan kantitasyon çalışmalarında, kalıp DNA miktarı bilinen standart örneklerle ait Ct değerleri ile incelenen örneğin Ct değeri karşılaştırılarak kantitasyon yapılmaktadır. Bu nedenle, kantitatif PCR analizlerinde standart olarak tanımlanan kontrol örneklerine ihtiyaç vardır. Standart örnek olarak içinde bulunan kalıp DNA miktarı bilinen örneklerle yapılan çalışmalara mutlak kantitasyon adı verilir. Bir örneğin içinde yer alan kalıp miktarının diğer bir örnekle karşılaştırıldığı durumlarda mutlak kantitasyona gerek yoktur. Bu durumda, standart örneğin içinde bulunan kalıp DNA miktarının bilinmesi önemli değildir. İyi ekspresyon sağlayan bir örneğin seri dilüsyonları standart olarak kullanılabilir. Bu çalışmalarda önemli olan standartlar arasındaki kalıp oranının tekrarlanabilir ve ölçülebilir olmasıdır. Bu tip çalışmalara göreceli kantitasyon (*relative quantitation*) adı verilir (Pfaffl 2001). Bir standart örnekten seri dilüsyonlar hazırlanır. Standart dilüsyonlara varsayılan bir konsantrasyon miktarı atfedilir ve genellikle bu miktar “varsayılan birim” (*arbitrary unit*) olarak ifade edilir. Bu standartlar kullanılarak, atfedilen konsantrasyon değerlerine karşılık gelen dilüsyonların Ct değerleri belirlenerek kantitasyon için gerekli olan regresyon eğrisi çizilir. Bu eğri standart eğri olarak da ifade edilmektedir. Kantitasyon aşamasında, örneklerin Ct değerlerinin regresyon eğrisi üzerinde hangi atfedilen değeri temsil ettiklerine bakılarak göreceli bir miktar belirlenir. Bu şekilde kantitatif PCR verilerinin analizinde; mutlak ve göreceli kantitasyon kullanılır. Göreceli kantitasyon için, şekil 2.5 te 3'er kez tekrar edilmiş standart örnek seri dilüsyonlarının (10^5 ile 10^2 arası konsantrasyon değerleri atfedilmiştir) Ct değerleri ile amplifikasyon eğrileri ve bu eğriler kullanılarak çizilen standart eğri bir örnek olarak verilmiştir.



Şekil 2.5. PCR amplifikasyon eğrisi ve standart eğri. **A.** Standart dilüsyon örneklerinin amplifikasyon eğrisi ve Ct değerleri (mavi oklar) gösterilmiştir. Bir adet bilinmeyen örnek ve Ct değeri kırmızıyla gösterilmiştir. **B.** Standart örneklerin Ct değerleri kullanılarak çizilen standart eğri gösterilmiştir. Bilinmeyen örnek kırmızı ile ifade edilmiştir.

2.5.1. *Housekeeping* Genlerin Kantitatif RT-PCR Çalışmalarındaki Önemi

Kantitatif RT-PCR uygulamalarında normalizasyon amacı ile çeşitli koşullarda ekspresyonu değişmediği bilinen (en az etkilenen) bir referans gene ihtiyaç vardır (Bustin 2002). Özellikle farklı bireylerden alınan ya da aynı bireyden farklı dönemlerde alınan örneklerle yapılan çalışmalarda, ilgilenilen genin ekspresyon düzeyinin incelenmesi için dokularda ekspresyonu değişmediği varsayılan bir başka gen ürünü mRNA ile normalizasyon yapılması gereklidir. İlgilenilen genin ekspresyon düzeyi, referans gen olarak kullanılan *housekeeping* genin ekspresyon düzeyine oranlanır. Bu oranlamayla amaçlanan izole edilen RNA miktarı ve sentezlenen cDNA miktarının getirdiği örnekler arası başlangıç farklılıklarını, deneysel hataları normalize etmektir. Bu nedenle farklı doku ve hücre tiplerinde, hedef genlerin ekspresyon düzeyinin kantitatif olarak belirlenmesi amacıyla yapılan çalışmalarda, önce referans olarak kullanılacak *housekeeping* genin doğru seçilmesi gereklidir. Çalışmalarda kullanılacak *housekeeping* genin ekspresyon düzeyi, ne kadar az değişkenlik göstererek sabit kalırsa, hedef genin ekspresyon düzeyinin belirlenmesi için o kadar güvenilir bir referans olacaktır.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Çalışmada, hayvan modeli olarak Sprague-Dawley erişkin erkek sıçan seçilmiştir. Uygulanacak olan cerrahi girişim açısından anatomik olarak kolaylık sağlayacak boyutta olması ve incelenecek olan kaslardan çeşitli analizler için yeteri kadar doku elde edilebilmesi tercih sebebidir. Ayrıca moleküler analiz yöntemlerinin uygulanabilmesi için de uygun bir türdür. Çalışma öncesinde Hacettepe Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulu'ndan 07.07.2005 tarihinde 2005/40-8 karar numarası ile onay alınmıştır. Kullanılan deney hayvanları Hacettepe Üniversitesi Deney Hayvanları Laboratuvarı'ndan sağlanmıştır ve cerrahi girişim sonrasında aynı laboratuvarda barındırılmaya devam edilmiştir.

3.2. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Malzeme ve Solüsyonlar

3.2.1. RNA İzolasyonu

TRIzol (Invitrogen)

Kloroform (Applichem)

İzopropanol (Applichem)

Dietil pirokarbonat (DEPC, Applichem)

Etanol (Riedel)

3.2.2. Agaroz-formaldehid Jel Elektforezi (RNA Elektforezi)

Agaroz (Cambrex) : Moleküler biyoloji kullanımı saflığında

MOPS tamponu : MOPS 0.221 M

Na-Asetat-Trihidrat (Sigma) 0.05 M

Na₂EDTA (Sigma) 0.01 M

Yükleme tamponu : Gliserol (Merck) %50

Na₂EDTA(Merck) 1 mM

BPB boya (Merck) %0.25

Etidyum bromür (Sigma) : 10mg/ ml distile su

Formaldehid (Sigma)

Formamid (Sigma)

3.2.3. cDNA Sentezi

ImProm-II™ tampon : Tris-HCL 250 mM

(5X) (Promega) KCL 250 mM

DTT 50 Mm

ImProm-II™ RT (Promega) : 1 µl/ reaksiyon

MgCl ₂ (Promega)	: 25 mM
Oligo(dT)15 primeri (Promega)	: 0.5 µg/ µl
dNTP karışımı (Promega)	: 10 mM

3.2.4. Real Time PCR

SYBR Green karışımı (Floresan boya) (2X) (Sigma)	: 20 mM Tris-HCL, PH: 8.3, 100 mM KCl, 0.4 mM dATP, 0.4 mM dCTP, 0.4 mM dGTP, 0.4 mM dTTP, Stabilizatör, 0.05 u/ µl Taq DNA polimeraz, Jump Start Taq antibody, SYBR Green I boyası
MgCl ₂ (Sigma)	: 25 mM

3.2.5. Agaroz Jel Elektroforezi

Agaroz (Cambrex)	: Moleküler biyoloji kullanımı saflığında
Tris-asetat tamponu (TAE) (pH: 8.0)	: Tris baz (Merck) 2 M Glasiyel asetik asit (Merck) 1.14 ml Na ₂ EDTA (Merck) 0.5 M
Yükleme tamponu	: Gliserol (Merck) 5.5 ml 1X TAE tamponu (Merck) 4.5 ml Orange G boya (Merck) 0.01gr
Etidyum bromür (Sigma)	: 10 mg/ ml distile su
Moleküler ağırlık belirleyicisi	: 100 bç DNA Ladder (Promega) (1500, 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100 baz çifti)

3.3. Yöntemler

3.3.1. Doku Eldesi

Tenotomi modeli, sıçanların soleus ve gastroknemius kaslarını arka ayak bileğine bağlayan aşil tendonunun serbestlenmesi ile oluşturulmuştur. Denervasyon modeli ise soleus ve gastroknemius kaslarını inerve eden siyatik sinirin diseksiyonu ile oluşturulmuştur. Her iki modelde de sıçanın sağ bacağına girişim uygulanmıştır.

Belirlenen zaman süreçlerini tamamlayan sıçanlar anestezi altındayken tenotomi ve denervasyon yapılan sağ bacak ve kontrol olarak kullanılacak sol bacak soleus ve gastroknemius kasları çıkartıldı. Tenotomi örnekleri ideal RNA izolasyonu yöntemi olan TRIzol içinde doku parçalayıcısı ile hemen homojenize edilerek -80°C'de donduruldu, denervasyon örnekleri ise doku parçaları halinde eppendorf tüpleri içinde, sıvı azota alınarak donduruldu. Tüm örnekler RNA izolasyonu aşamasına kadar -80° C' de saklandı.

3.3.2. Histolojik İnceleme

Donmuş olarak bulunan kas dokuları kriyotomda 10 mikron kalınlığında kesildi ve H&E boyası ile boyandı. Hazırlanan kesitler ışık mikroskopunda inceleme altına alındı. Kesitlerde ilk olarak bakılan değişiklik, kas atrofisinin en belirgin özelliği olan yağlı dejenerasyondur. Bunun yanında rejenerasyon göstergesi olan merkezi çekirdekli kas lifleri, doku mimarisinde bozulma ve interstisiel doku artışı gibi diğer bulgular da tenotomi ve denervasyon uygulanmış kaslar ve kontrol kası arasında karşılaştırıldı.

3.3.3. RNA İzolasyonu

Tenotomi kas örnekleri yukarıda da anlatıldığı gibi, doku parçalayıcısı ile TRIzol içerisinde homojenize edilerek -80°C' de saklandı. Bu örneklerden, -80°C'den çıkartılarak oda sıcaklığına getirildikten sonra standart TRIzol izolasyon protokolü ile RNA izolasyonu yapıldı. Denervasyon örnekleri ise, -80°C'den çıkartıldıktan sonra, çözülmesi beklenmeden TRIzol solüsyonu içine alınarak doku parçalayıcısı ile homojenize edildi ve RNA izolasyonu yapıldı. Aşağıda TRIzol izolasyon protokolü ile RNA izolasyonu aşamaları verilmiştir:

1. Homojenize edilen dokular 5 dk oda sıcaklığında bekletildi.
2. 200 µl kloroform eklendikten sonra vorteks yapıldı ve 2-3 dk oda sıcaklığında bekletildi.
3. 12000 rpm de 15dk 4°C' de santrifüj edildi.
4. Santrifüj sonrası oluşan en üst fazda bulunan RNA toplandı ve 500 µl izopropanol içeren yeni tüpe alındı.
5. RNA ve izopropanol içeren tüp alt üst edilerek karıştırıldı ve 10 dk oda sıcaklığında bekletildi.
6. 12000 rpm de 10 dk 4°C' de santrifüj edildi.
7. Santrifüj sonrası süpernatant dikkatli bir şekilde döküldü. Pelet üzerine 1 ml DEPC içeren %70 etanol eklendi ve vorteks yapıldı.
8. RNA'nın degrade olmasını ve kırılmasını önlemek için düşük hızda (7500 rpm) 10 dk 4°C' de santrifüj edildi.
9. Santrifüj sonrası %70 etanol döküldü ve tüplerin kapakları açık bırakılarak RNA peleti kurutuldu.
10. Pelet miktarına bağlı olarak 20-25 µl RNaz içermeyen su (% 0,1 DEPC'li su) eklendi.
11. 60°C' de 10 dk bekletildi ve analize kadar -20°C' de, analiz sonrası -80°C' de saklandı.

3.3.4. RNA'ların Kalite Kontrolü

İzole edilen RNA'lar kalite ve kantite açısından değerlendirilmek üzere denatüre jel elektroforezi (RNA elektroforezi; %1.5 Agaroz – formaldehid jel) ile incelendi, konsantrasyonları Nanodrop ND-1000 cihazında ölçüldü.

3.3.5. cDNA Sentezi

cDNA sentezi için, ImProm-II™ reverse transkriptaz enzimi (Promega) ve oligo(dT)₁₅ primeri kullanıldı. Kalıp olarak 1µg RNA kullanıldı ve 0.5 µg/ µl oligo(dT)₁₅ primeri ve RNaz içermeyen su ile 5 µl'ye tamamlanarak 70°C'de 5 dk inkübe edildi. İnkübasyon sonrası hızlı bir şekilde buz üzerine alınarak 5 dk bekletildi. Ayrı bir tüpte 15 µl revers transkripsiyon karışımı hazırlandı.

Revers transkripsiyon karışımı:

	Final konsantrasyon	Hacim
RNaz içermeyen su		6.6 µl
Improm-II™ tampon (5X) (Promega)	1X	4 µl
MgCl ₂ (25mM)	3 mM	2.4 µl
dNTP karışımı (10mM)	0.5 mM	1 µl
Improm-II™ Reverse Transkriptaz		1 µl
	Toplam	: 15 µl

Toplam 20 µl olacak şekilde 5 µl RNA + primer karışımı, 15 µl reverse transkripsiyon karışımı ile birleştirilerek reverse transkripsiyon aşağıdaki koşullarda Applied Biosystems-9700 PCR cihazı kullanılarak gerçekleştirildi:

25°C' de	5 dk
42°C' de	60 dk
70°C' de	15 dk

Yukarıdaki reaksiyon sonucunda 20 µl cDNA sentezlendi. cDNA örnekleri daha verimli kullanılmak amacıyla 80 µl'ye sulandırıldı (20 µl cDNA +60 µl distile su = 80 µl).

3.3.6. Real Time PCR

“Denervasyon” ve “tenotomi” modellerinde *housekeeping* gen ekspresyonu, farklı zamanlarda alınan soleus ve gastrocnemius kas örneklerinde, *Corbett Rotor-gene* 6000 *Real Time* PCR cihazında incelendi. Herhangi bir girişim uygulanmayan (sol kas) kontrateral kas dokusu ise kontrol olarak kullanıldı. RT-PCR deneylerinde, primer seçimleri özgül olmayan bağlanmayı engelleyecek şekilde gerçekleştirildi. Çalışma kapsamında GAPDH, β-Aktin, HPRT ve TBP olmak üzere 4 house-keeping gene özgül primerler sentezletildi. cDNA'lar RT-PCR tekniği ve SYBR Green I floresan boyası kullanılarak çoğaltıldı. Bu amplifikasyon sırasında çift zincirli DNA'ya bağlanan SYBR Green I miktarı florimetrik deteksiyon filtresiyle ölçülmektedir. Bu ölçümlerde floresans, DNA ürünü ile orantılı olarak değişmektedir. *Rotor-gene* 6000 cihazı, erime eğrisi analizi

yapabilme özelliği ile primer dimer oluşumu ve özgül olmayan amplifikasyon ürünleri gibi hataları gözlemlemeye de olanak sağlamaktadır.

RT-PCR reaksiyonları hazırlanırken , standart eğrilerin çizilebilmesi amacıyla herhangi bir girişim uygulanmayan (sol kas) kontrlateral kas dokusundan elde edilen cDNA örneğinden 1/10 , 1/100 ve 1/1000 oranlarında seri dilüsyonlar hazırlandı ve ölçümlerin değerlendirilmesi aşamasında analiz programı ile standart eğriler çizildi. Deneylerde tüm cDNA örnekleri ve standart örnekler aynı şartlarda ve aynı grup içerisinde 3'er kez çalışılarak bu üç ölçümün ortalaması analizlerde kullanılmıştır. Bunun amacı, deneysel hataları ve farkları azaltmaktır. Seçilen zaman noktalarında eksprese olan *housekeeping* gen miktarı, cerrahi girişim uygulanmış sağ kas dokuları ile kontrol olarak kullanılan sol kas dokuları arasında korelasyon analizi yapılarak incelendi.

Çalışmanın sağlaması amacıyla “denervasyon” ve “tenotomi” modellerinde izlenen ekspresyon miktarının kas atrofisi ile ilişkilendirilebilmesi için kas dokusunun yapısal proteinlerinden biri olan myozin ağır zincir (MHC) ekspresyonu incelendi. MHC primer seçimi de özgül olmayan bağlanmayı engelleyecek şekilde gerçekleştirildi.

RT-PCR Koşulları:

2X SYBR Green karışımı	5 µl
25mM MgCl ₂	1.2 µl
Forward primer (10pmol/ µl)	0.4 µl
Revers primer (10pmol/ µl)	0.4 µl
cDNA	2 µl
Distile su	1 µl

Toplam: 10 µl

10 µl RT-PCR reaksiyonu *Rotor-gene* 6000 cihazında aşağıdaki koşullarda gerçekleştirildi:

94°C'de 2 dk

94°C'de 2 s

X°C'de 20

} 40 döngü

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan primerlerin dizileri, Tm dereceleri ve uzunlukları

Gen	No *		Oligonükleotid dizisi	E ⁺	Tm	bç
β-Aktin	NM_031144	F	5' -GTGCTATGTTGCCCTAGACTTCG-3'	4	59	175
		R	5' -GATGCCACAGGATTCCATACCC-3'	5	58,3	
TBP	NM_003194	F	5' -TGCACAGGAGCCAAGAGTGAA-3'	5	59,1	132
		R	5' -CACATCACAGCTCCCCACCA-3'	6	59	
GAPDH	NM_017008	F	5' -AGTGCCAGCCTCGTCTCATAG-3'	1-2	58,8	201
		R	5' -TGA CTGTGCCGTTGAACTTGC-3'	3	59,2	
HPRT	NM_12583	F	5' -ATGGACTGATTATGGACAGGACTG-3'	2	57,7	124
		R	5' -TCCAGCAGGTCAGCAAAGAAC-3'	3	58	
MHC	XM_1078018	F	5' -TGGAGCAGACTGAGAGGAG-3'	35	54,4	113
		R	5' -CTTCTTCTTGGTGTGATGAGG-3'	36	54,5	

(* NCBI Gene veritabanı erişim numaraları, E⁺: Primer'in yer aldığı ekzon)

3.3.7. Verilerin Analizi

Bu çalışma süresince yapılan tüm deneyler, ölçümler, incelemeler ve değerlendirmelerde, aynı hayvanın girişim uygulanan kasından alınan verilerle kontrol kası (kontrateral) verileri birbirlerine oranlanmıştır. Bulgular kısmında yapılan tüm değerlendirmeler, girişim uygulanan sağ kas bulgularının kontrol olarak kullanılan sol kas bulgularına oranı göz önüne alınarak yapılmıştır. RT-PCR sonuçları *Rotor-gene 6000 series software version 1.7 (Build 61)* yazılımı ile kantite edilmiş, korelasyon analizi ise *XLSTAT 2008* yazılımı kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. *Housekeeping* Genlerin Ekspresyon Bulgularının Değerlendirilmesi

GAPDH, β -Aktin, HPRT ve TBP olmak üzere 4 *housekeeping* genin ekspresyon düzeyleri aşağıdaki basamaklarda incelenmiştir:

RT-PCR sonrasında amplifikasyon ürünleri, agaroz jel elektroforezinde yürütülerek ve erime eğrisi analizi gerçekleştirilerek incelenmiştir. Bu şekilde standartların ve örneklerin özgül amplifikasyon ürünlerinin gerçekleştiği gösterilmiştir (Şekil 4.1.A,B , Şekil 4.3.A,B Şekil 4.5.A,B , Şekil 4.7.A,B).

Genlerin ekspresyonlarının kantitatif analizi için cerrahi girişim uygulanmayan (sol kas) kontrateral kas örneklerinden erken amplifikasyon veren bir örnek standart olarak seçilmiştir. Standart (ST) örnekten 1/10, 1/100, 1/1000 oranında seri dilüsyonlar hazırlanmıştır. Standart ve dilüsyonların konsantrasyonları aşağıda varsayılan atfedilen birimlerle ifade edilmiştir:

$$ST = 100000, ST^{-1} = 10000, ST^{-2} = 1000, ST^{-3} = 100$$

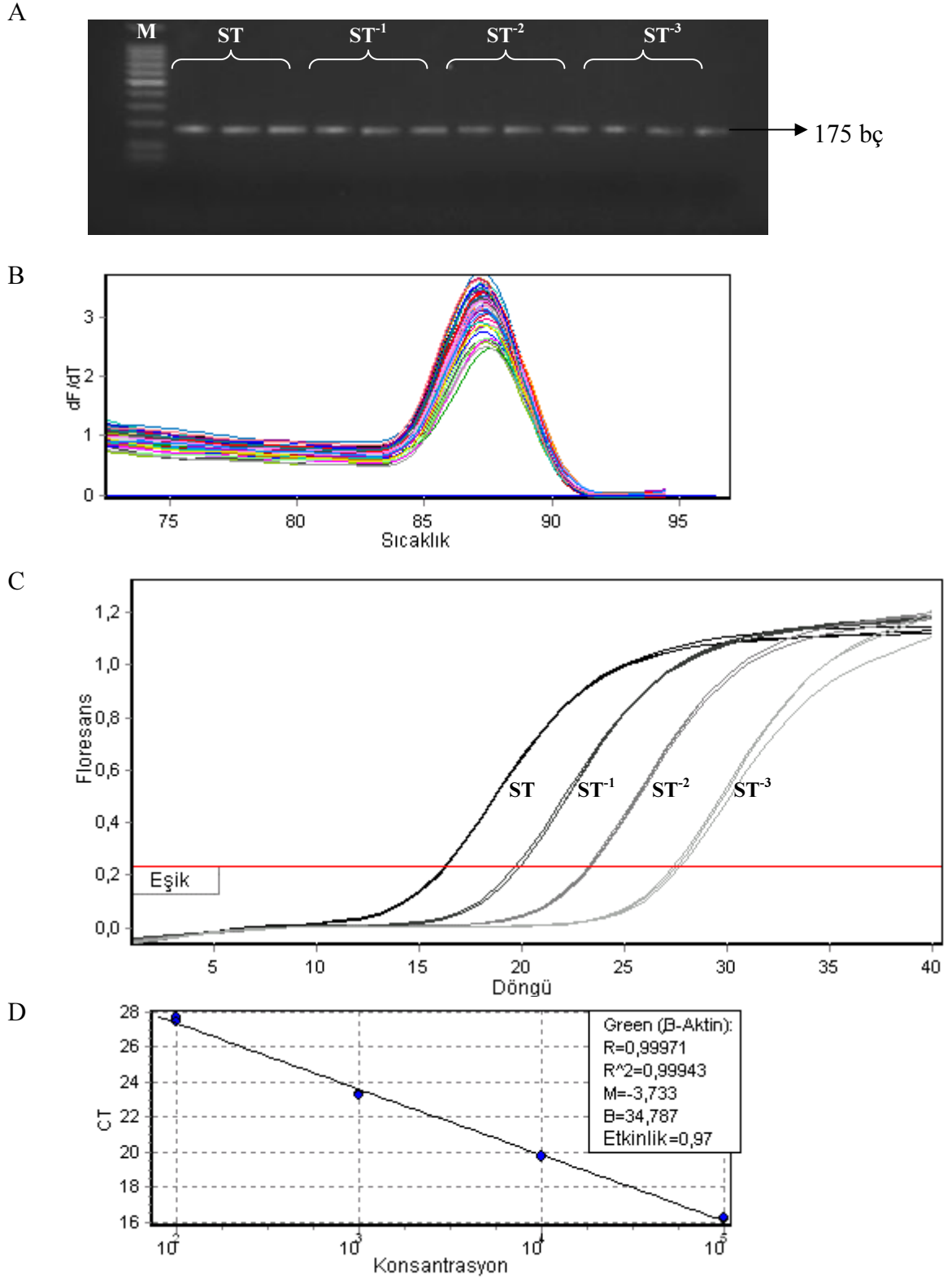
Amplifikasyon sırasında standartların Ct değerleri belirlenmiş ve varsayılan konsantrasyonlarla standart eğriler elde edilmiştir (Şekil 4.1.C,D , Şekil 4.3.C,D , Şekil 4.5.C,D , Şekil 4.7.C,D). Örneklerin Ct değerlerinin standart eğri ile karşılaştırılarak ekspresyon miktarının göreceli olarak belirlenmesi işlemi *Rotor-gene 6000 series software version 1.7 (Build 61)* yazılımı ile gerçekleştirilmiştir.

Dört *housekeeping* gen için, tenotomi ve denervasyon örneklerinde, cerrahi girişim uygulanmış sağ kas dokuları ve kontrol olarak kullanılan sol kas dokularının ekspresyon analizi sonuçları, ayrıca sağ kas sonuçlarının sol kas sonuçlarına oranları Çizelge 4.1, Çizelge 4.3, Çizelge 4.5, Çizelge 4.7'de tablolar şeklinde ifade edilmiştir. Bu analizler, tenotomi örneklerinde gastroknemius (GAS) ve soleus (SOL) kasları için ayrı ayrı gerçekleştirilmiştir. Denervasyon örneklerinde ise sadece gastroknemius kası kullanıldığı için bu kasa ait sonuçlar verilmiştir.

Ekspresyon analizinde elde edilen sağ kas sonuçlarının sol kas sonuçlarına oranları değerlendirildiğinde bazı örnekler *outlier* (istisna) olarak kabul edilmiştir.; *Outlier* örnek, cerrahi girişim sırasında veya RNA izolasyonu, cDNA sentezi, RT-PCR aşaması gibi basamaklarda oluşabilecek deneysel hatalar nedeniyle ekspresyon analizi sonuçlarının ortalamasından en çok sapma gösteren örnekler olarak belirlenmiştir. Tenotomi çalışmasında her gruptan 3 örnek (%17) ve denervasyon çalışmasında her gruptan 4 örnek (%30) *outlier* olarak kabul edilmiş ve değerlendirme dışı bırakılmıştır. Çalışmaya alınan örneklerde sağ kas sonuçlarının sol kas sonuçlarına oranları ile korelasyon grafiği çizilmiştir (Şekil 4.2. , Şekil 4.4. , Şekil 4.6., Şekil 4.8.).

4.1.1. β-Aktin Gen Ekspresyonu Bulguları

β-Aktin ekspresyonunun kantitatif analizinde cerrahi girişim uygulanmayan (sol kas) kontrateral kas dokusundan elde edilen cDNA ile hazırlanan standartların ve örneklerin amplifikasyonunun başarılı bir şekilde gerçekleştiği görüldü. Agaroz jel elektroforezinde 175 bp uzunluğunda beklenen ürün gözlenmiş, bu bulgu erime eğrisi analizinde standartlar ve örneklerin aynı Tm derecesinde tepe noktası vermesi ile doğrulanmıştır.(Şekil 4.1.).



Şekil 4.1. β -aktin geni RT-PCR sonuçları **A)** Standartların agaroz jel elektroforezi sonuçları. **B)** Standartların ve örneklerin erime eğrisi grafiği. **C)** Standart dilüsyonlar için, gerçek zamanlı amplifikasyon eğrileri. **D)** Standart dilüsyonların Ct değerleri ve standartlara atfedilen varsayılan değerler kullanılarak elde edilen standart eğri

4.1.1.1. β -Aktin Ekspresyonunun Korelasyon Analizi Bulguları

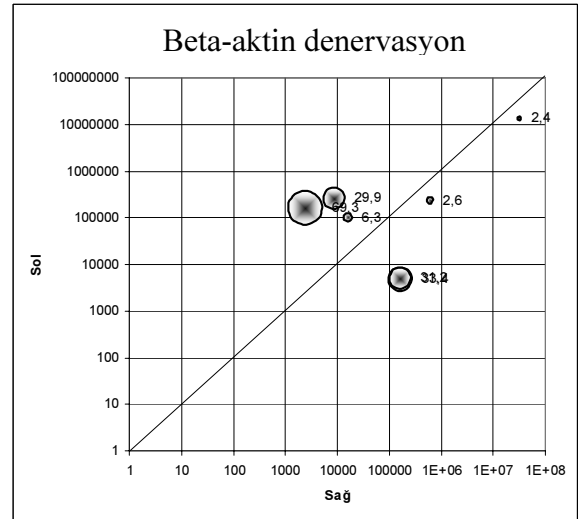
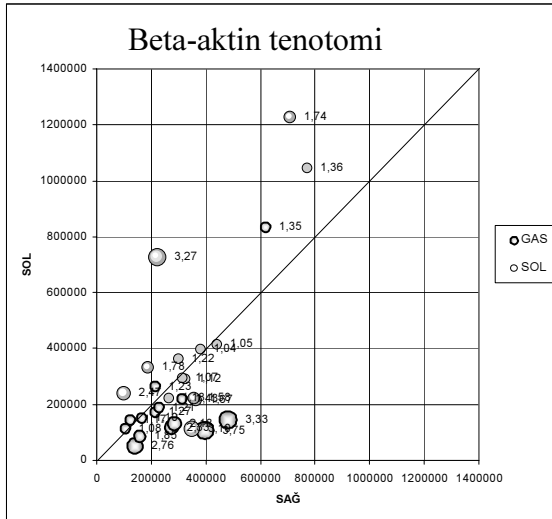
Tenotomi ve denervasyon modellerinde β -Aktin geni ekspresyon düzeyinin stabilitesinin gösterilmesi için, cerrahi girişim uygulanmış örneklerin (sağ kas), kontrol örneklerine (sol kas) oranlanması sonucu elde edilen değerlerle korelasyon analizi gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 4.1. Tenotomi ve Denervasyon modellerinde β -Aktin geni ekspresyon analizi sonuçları

β -Aktin – Tenotomi									
Gastroknemius					Soleus				
hafta	sıçan	sol	sağ	sağ/sol	hafta	sıçan	sol	sağ	sağ/sol
1	1	165001	150637	0,91	1	1 *	737035	172422	0,23
1	2	124031	145205	1,17	1	2 *	580061	148748	0,26
3	1	314459	220570	0,70	3	1	97626	241093	2,47
3	2	157444	85105	0,54	3	2	314808	295173	0,94
3	3 *	24493	202711	8,28	3	3	379766	396484	1,04
4	1 *	19756	210956	10,68	4	1	768920	1047450	1,36
4	2	275187	118256	0,43	4	2	264166	223675	0,85
4	3	140559	50863	0,36	4	3	707249	1227564	1,74
4	4 *	96273	402508	4,18	4	4	347539	112097	0,32
4	5	214727	264243	1,23	4	5	222314	727047	3,27
4	6	105747	113950	1,08	4	6	438613	416407	0,95
6	1	229862	190323	0,83	6	1	298090	365031	1,22
6	2	216132	170753	0,79	6	2	324754	290396	0,89
6	3	283534	130128	0,46	6	3	354406	224598	0,63
16	1	483643	145449	0,30	16	1	187567	334047	1,78
16	2	619829	835133	1,35	16	2	362836	216874	0,60
16	3	397917	106003	0,27	16	3 *	159299	780585	4,90

β -Aktin Denervasyon				
Gastroknemius				
hafta	sıçan	sol	sağ	sağ/sol
2	1 *	7632344	1,666667	2,18369E-07
2	2	8807,143	263258,3	29,89145715
2	3	614602	238026,7	0,387285889
3	1	32752085	13791894	0,421099717
5	1	161060,6	4821,429	0,029935493
5	2	16089,29	100982,2	6,276364533
7	1	159849,2	5115,625	0,032002818
7	2 *	49972364	354,386	7,09164E-06
7	3	2408,333	166835,4	69,27422145
8	1 *	73805,56	117,3913	0,001590548
8	2 *	54784116	162711,9	0,002970055

Çizelge 4.1.'de * ile işaretlenmiş örnekler *outlier* olarak değerlendirildiği için, korelasyon analizinden çıkartılmıştır (**sol**: sol kas dokusu ekspresyon analizi sonuçları, **sağ**: sağ kas dokusu ekspresyon analizi sonuçları, **sağ/sol**: sağ kas sonuçlarının sol kas sonuçlarına oranı).



Şekil 4.2. Tenotomi ve Denervasyon modellerinde β -Aktin ekspresyonunun sağ/sol oranı korelasyon grafikleri (Daire çapları standart deviasyonu göstermektedir). Grafikler XLSTAT 2008 yazılımı ile elde edilmiştir.

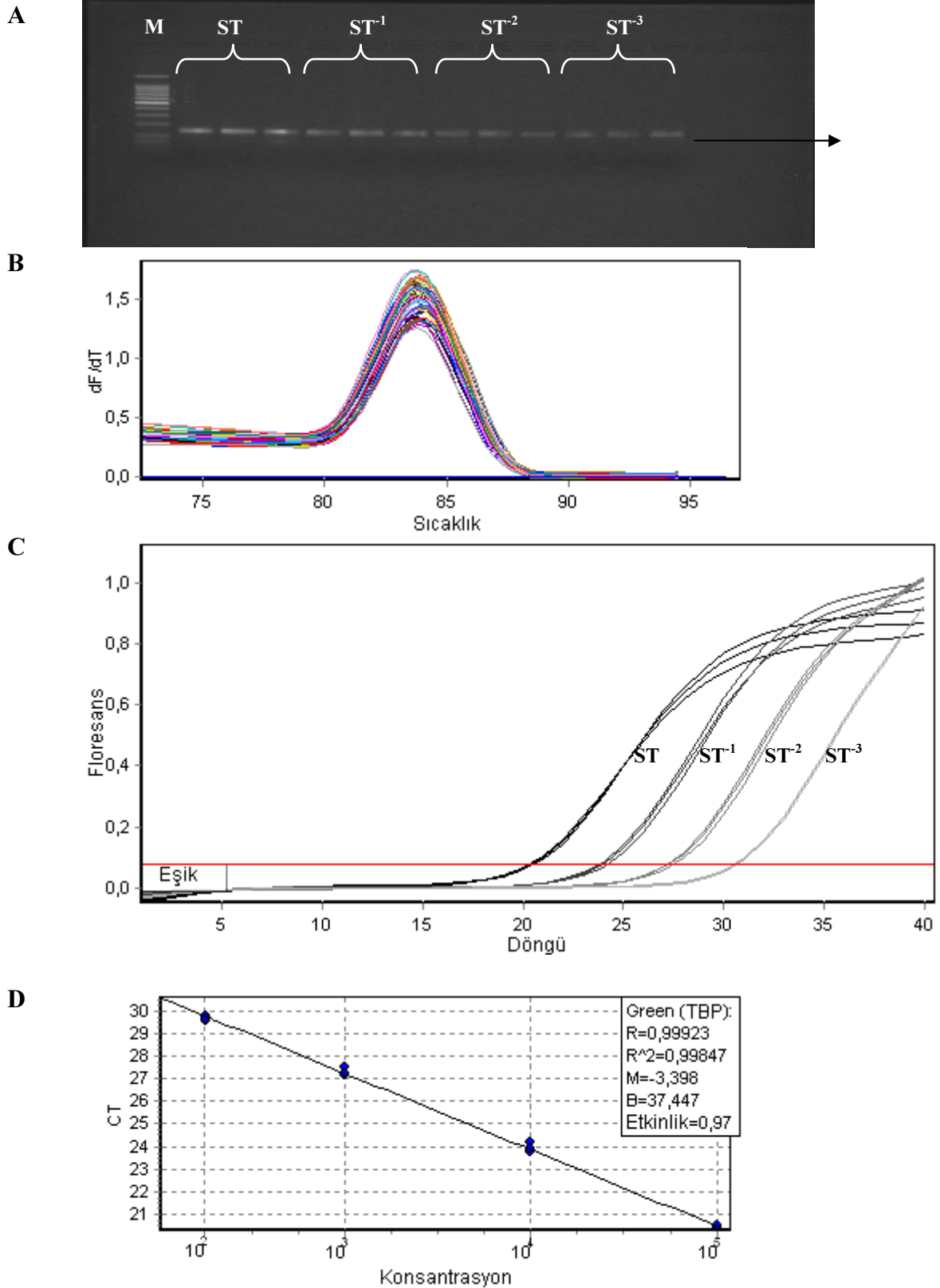
Çizelge 4.2. β -Aktin ekspresyonu korelasyon analizi sonuçları

β -Aktin Tenotomi		β -Aktin Denervasyon
Gastroknemius	0,694	0,999724
Soleus	0,758	
G+S	0,754	

(1: tam korelasyon, -1: ters korelasyon , 0: korelasyon yok şeklinde ifade edilmektedir)

4.1.2. TBP Gen Ekspresyonu Bulguları

TBP ekspresyonunun kantitatif analizinde cerrahi girişim uygulanmayan (sol kas) kontrateral kas dokusundan elde edilen cDNA ile hazırlanan standartların ve örneklerin amplifikasyonunun başarılı bir şekilde gerçekleştiği görüldü. Agaroz jel elektroforezinde 132 bp uzunluğunda beklenen ürün gözlenmiş, bu bulgu erime eğrisi analizinde standartlar ve örneklerin aynı Tm derecesinde tepe noktası vermesi ile doğrulanmıştır.(Şekil 4.3.).



Şekil 4.3. TBP geni RT-PCR sonuçları **A)** Standartların agaroz jel elektroforezi sonuçları. **B)** Standartların ve örneklerin erime eğrisi grafiği. **C)** Standart dilüsyonlar için, gerçek zamanlı amplifikasyon eğrileri. **D)** Standart dilüsyonların Ct değerleri ve standartlara atfedilen varsayılan değerler kullanılarak elde edilen standart eğri.

4.1.2.1. TBP Ekspresyonunun Korelasyon Analizi Bulguları

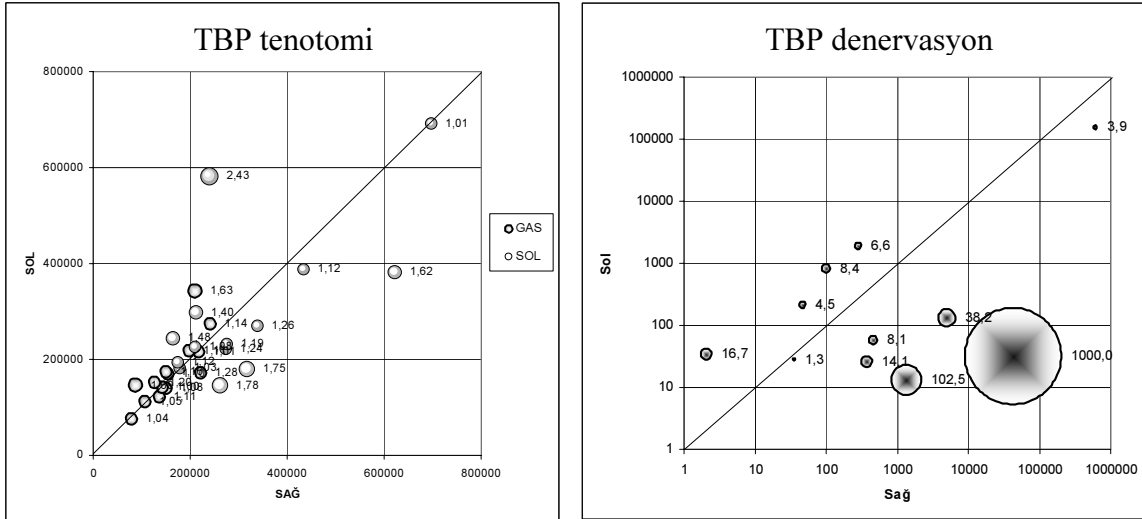
Tenotomi ve denervasyon modellerinde TBP geni ekspresyon düzeyinin stabilitesinin gösterilmesi için, cerrahi girişim uygulanmış örneklerin (sağ kas) , kontrol örneklerine (sol kas) oranlanması sonucu elde edilen değerlerle korelasyon analizi gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 4.3. Tenotomi ve Denervasyon modellerinde TBP geni ekspresyon analizi sonuçları

TBP – Tenotomi									
Gastroknemius					Soleus				
hafta	sıçan	sol	sağ	sağ/sol	hafta	sıçan	sol	sağ	sağ/sol
1	1	107917	112955	1,05	1	1 *	486888	106683	0,22
1	2 *	39805	259925	6,53	1	2	239813	582093	2,43
3	1	142953	142396	1,00	3	1	696702	692473	0,99
3	2	150770	174217	1,16	3	2	620858	382171	0,62
3	3 *	66293	365310	5,51	3	3	434370	388365	0,89
4	1	197517	218944	1,11	4	1 *	471044	42510	0,09
4	2	240792	273911	1,14	4	2	338214	269371	0,80
4	3 *	201812	45935	0,23	4	3 *	145857	511248	3,51
4	4	79003	76122	0,96	4	4	164832	244040	1,48
4	5	154744	169594	1,10	4	5	212417	297304	1,40
4	6	87128	146832	1,69	4	6	178055	182771	1,03
6	1	127165	152999	1,20	6	1	209472	225853	1,08
6	2	218520	215893	0,99	6	2	273869	221531	0,81
6	3	136215	122408	0,90	6	3	316663	180996	0,57
16	1	149683	139222	0,93	16	1	173354	193379	1,12
16	2	209990	341341	1,63	16	2	275464	231631	0,84
16	3	221828	172856	0,78	16	3	261389	146917	0,56

TBP Denervasyon				
Gastroknemius				
hafta	sıçan	sol	sağ	sağ/sol
2	1	43266,67	31,66667	0,000732
2	2	100	835,4167	8,354167
2	3	4966,667	130	0,026174
3	1	610160,9	155827,1	0,255387
3	2	1336,364	13,04348	0,00976
3	3 *	513974,6	81,81818	0,000159
5	1	46,46465	209,5238	4,509317
5	2	35,71429	27,77778	0,777778
7	1	368,254	26,04167	0,070717
7	2 *	484245,8	126,3158	0,000261
7	3	2,083333	34,72222	16,66667
7	4	283,3333	1879,167	6,632353
8	1 *	361052,4	21,05263	5,83E-05
8	2	457,4074	56,52174	0,12357
8	3 *	162950,9	0,847458	5,2E-06

Çizelge 4.3. 'te * ile işaretlenmiş örnekler *outlier* olarak değerlendirildiği için, korelasyon analizinden çıkartılmıştır (sol: sol kas dokusu ekspresyon analizi sonuçları, sağ: sağ kas dokusu ekspresyon analizi sonuçları, sağ/sol: sağ kas sonuçlarının sol kas sonuçlarına oranı).



Şekil 4.4. Tenotomi ve Denervasyon modellerinde TBP ekspresyonunun sağ/sol oranı korelasyon grafikleri (Daire çapları standart deviasyonu göstermektedir) Grafikler XLSTAT 2008 yazılımı ile elde edilmiştir.

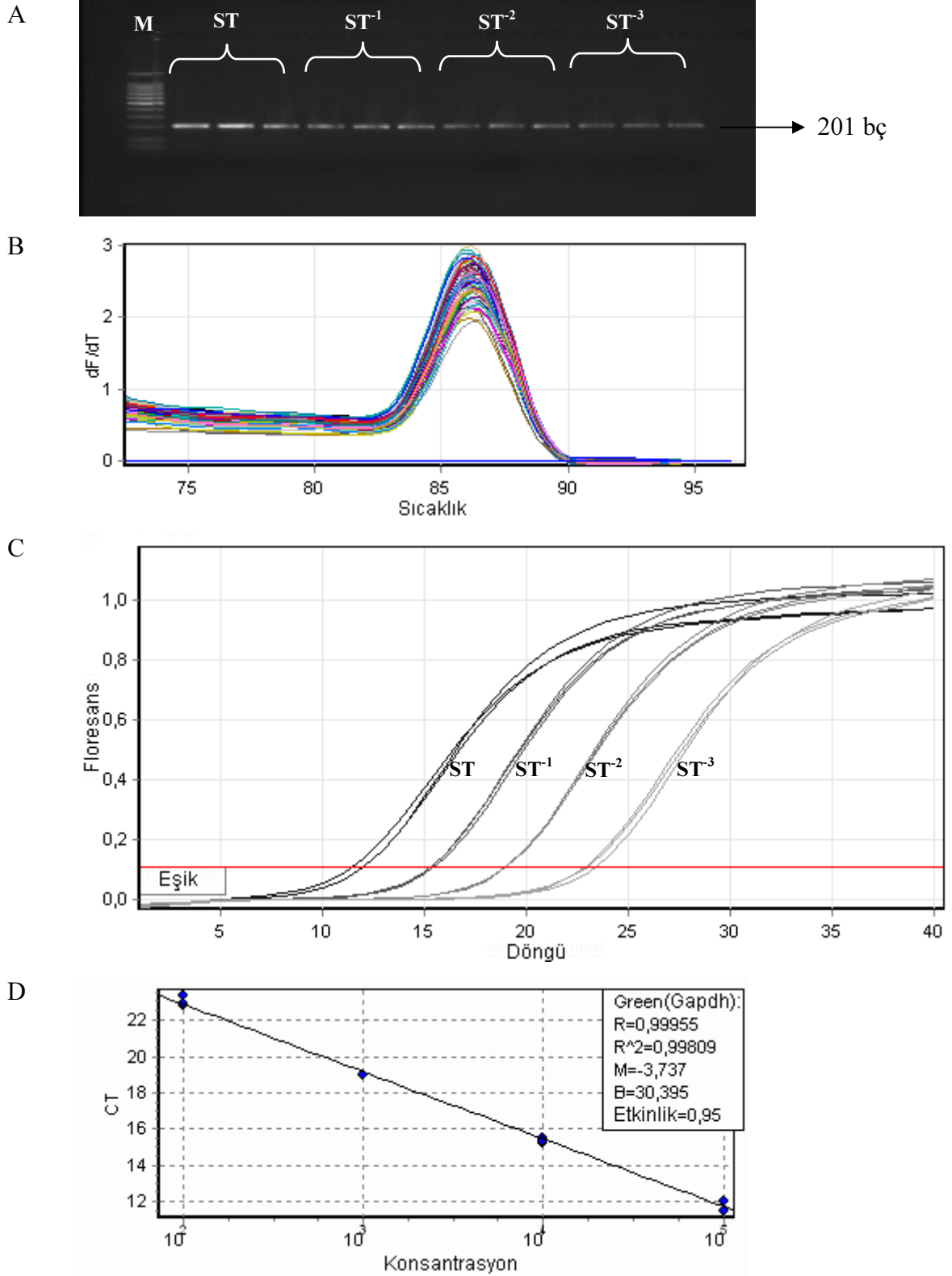
Çizelge 4.4. TBP ekspresyonu korelasyon analizi sonuçları

TBP Tenotomi		TBP Denervasyon
GAS	0,795148	0,99731
SOL	0,662595	
G+S	0,756935	

(1: tam korelasyon, -1: ters korelasyon , 0: korelasyon yok şeklinde ifade edilmektedir)

4.1.3. GAPDH Gen Ekspresyonu Bulguları

GAPDH ekspresyonunun kantitatif analizinde cerrahi girişim uygulanmayan (sol kas) kontrateral kas dokusundan elde edilen cDNA ile hazırlanan standartların ve örneklerin amplifikasyonunun başarılı bir şekilde gerçekleştiği görüldü. Agaroz jel elektroforezinde 201 bç uzunluğunda beklenen ürün gözlenmiş, bu bulgu erime eğrisi analizinde standartlar ve örneklerin aynı Tm derecesinde tepe noktası vermesi ile doğrulanmıştır.(Şekil 4.5.).



Şekil 4.5. GAPDH geni RT-PCR sonuçları **A)** Standartların agaroz jel elektroforezi sonuçları. **B)** Standartların ve örneklerin erime eğrisi grafiği. **C)** Standart dilüsyonlar için, gerçek zamanlı amplifikasyon eğrileri. **D)** Standart dilüsyonların Ct değerleri ve standartlara atfedilen varsayılan değerler kullanılarak elde edilen standart eğri.

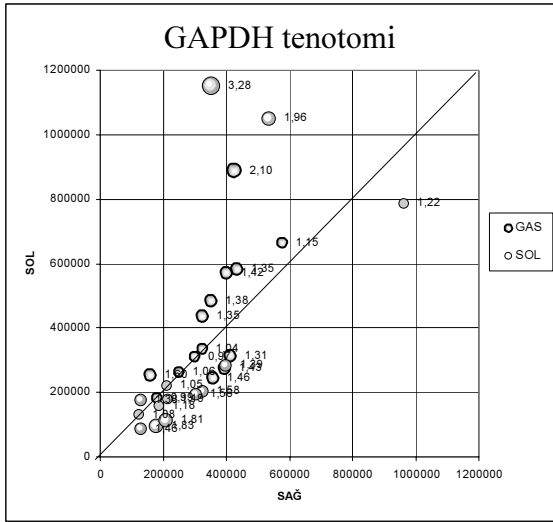
4.1.3.1. GAPDH Ekspresyonunun Korelasyon Analizi Bulguları

Tenotomi modelinde GAPDH geni ekspresyon düzeyinin stabilitesinin gösterilmesi için, cerrahi girişim uygulanmış örneklerin (sağ kas) , kontrol örneklerine (sol kas) oranlanması sonucu elde edilen değerlerle korelasyon analizi gerçekleştirilmiştir. Denervasyon modelinde kantitatif RT-PCR tekniği ile GAPDH geni ekspresyon analizi gerçekleştirilmiş, ancak sağ ve sol örnekler arasındaki çok büyük uyumsuzluk nedeni ile anlamlı bir korelasyon analizi sonucuna ulaşılammıştır.

Çizelge 4.5. Tenotomi modelinde GAPDH geni ekspresyon analizi sonuçları

GAPDH – Tenotomi									
Gastroknemius					Soleus				
hafta	sıçan	sol	sağ	sağ/sol	hafta	sıçan	sol	sağ	sağ/sol
1	1	358107	245295	0,68	1	1 *	175453	26752	0,15
1	2 *	374357	1023098	2,73	1	2	535295	1051339	1,96
3	1	424027	888877	2,10	3	1	351147	1150954	3,28
3	2	179207	181813	1,01	3	2	209748	220924	1,05
3	3	577252	664137	1,15	3	3	322215	204475	0,63
4	1	158625	253560	1,60	4	1 *	189036	14640	0,08
4	2	393193	274889	0,70	4	2	396001	284686	0,72
4	3 *	531405	32259	0,06	4	3 *	94230	355212	3,77
4	4	324050	436944	1,35	4	4	962749	786193	0,82
4	5	322253	334856	1,04	4	5	206823	114467	0,55
4	6	400844	570328	1,42	4	6	213818	179614	0,84
6	1	248976	263520	1,06	6	1	129108	177806	1,38
6	2	350450	484772	1,38	6	2	184980	157276	0,85
6	3	300156	310953	1,04	6	3	122839	132760	1,08
16	1	412122	314317	0,76	16	1	127202	87053	0,68
16	2 *	292385	968624	3,31	16	2	302037	193719	0,64
16	3	434149	584092	1,35	16	3	176432	96417	0,55

Çizelge 4.5.'te * ile işaretlenmiş örnekler *outlier* olarak değerlendirildiği için, korelasyon analizinden çıkartılmıştır (sol: sol kas dokusu ekspresyon analizi sonuçları, sağ: sağ kas dokusu ekspresyon analizi sonuçları, sağ/sol: sağ kas sonuçlarının sol kas sonuçlarına oranı).



Şekil 4.6. Tenotomi modelinde GAPDH ekspresyonunun sağ/sol oranı korelasyon grafiği (Daire çapları standart deviasyonu göstermektedir) Grafikler XLSTAT 2008 yazılımı ile elde edilmiştir.

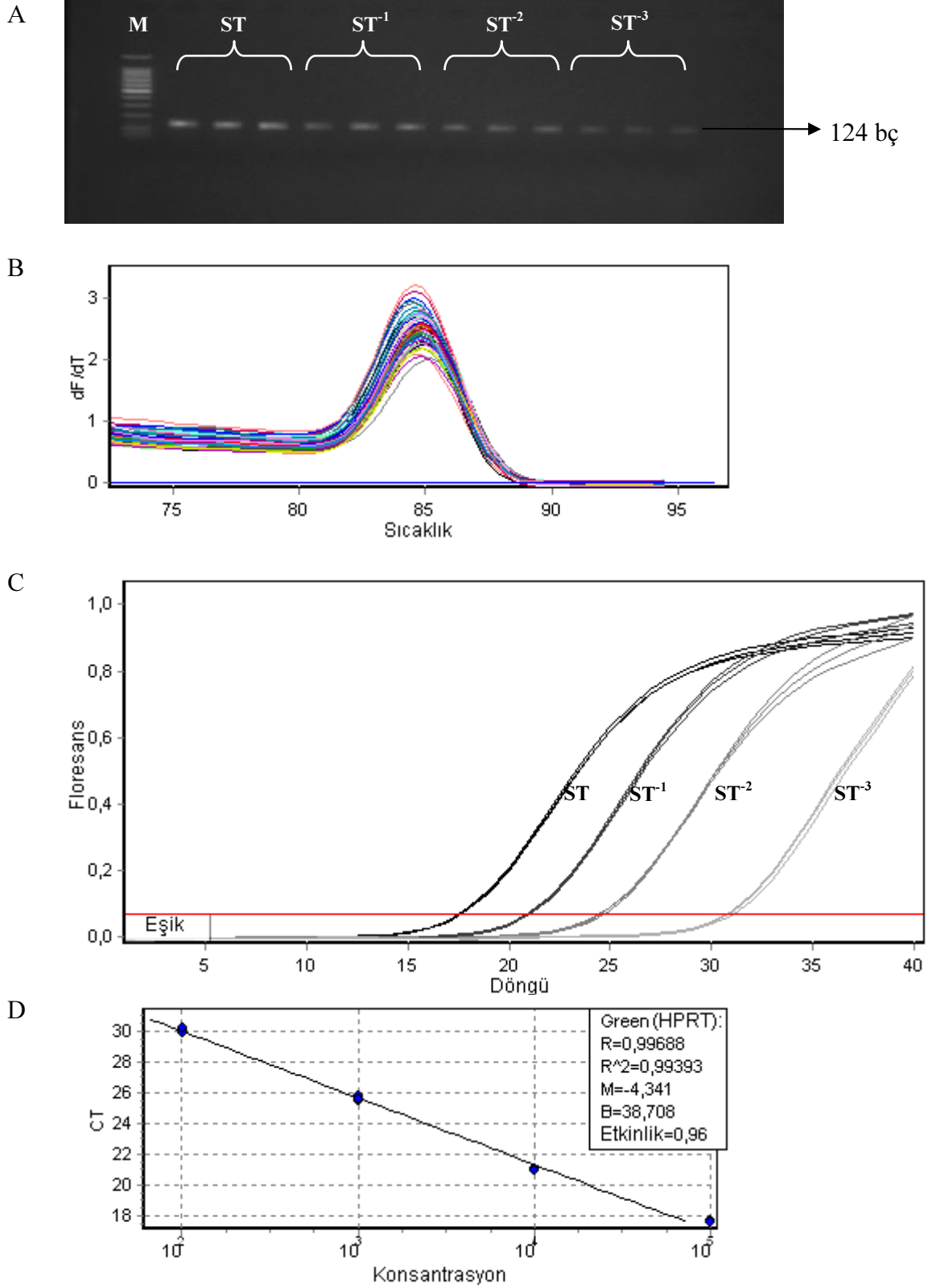
Çizelge 4.6. GAPDH ekspresyonunun korelasyon analizi sonuçları

GAPDH Tenotomi	
GAS	0,682961
SOL	0,662197
G+S	0,671042

(1: tam korelasyon, -1: ters korelasyon , 0: korelasyon yok şeklinde ifade edilmektedir)

4.1.4. HPRT Gen Ekspresyonu Bulguları

HPRT ekspresyonunun kantitatif analizinde cerrahi girişim uygulanmayan (sol kas) kontrateral kas dokusundan elde edilen cDNA ile hazırlanan standartların ve örneklerin amplifikasyonunun başarılı bir şekilde gerçekleştiği görüldü. Agaroz jel elektroforezinde 124 bp uzunluğunda beklenen ürün gözlenmiş, bu bulgu erime eğrisi analizinde standartlar ve örneklerin aynı Tm derecesinde tepe noktası vermesi ile doğrulanmıştır.(Şekil 4.7.).



Şekil 4.7. HPRT geni RT-PCR sonuçları **A)** Standartların agaroz jel elektroforezi sonuçları. **B)** Standartların ve örneklerin erime eğrisi grafiği. **C)** Standart dilüsyonlar için, gerçek zamanlı amplifikasyon eğrileri. **D)** Standart dilüsyonların Ct değerleri ve standartlara atfedilen varsayılan değerler kullanılarak elde edilen standart eğri

4.1.4.1. HPRT Ekspresyonunun Korelasyon Analizi Bulguları

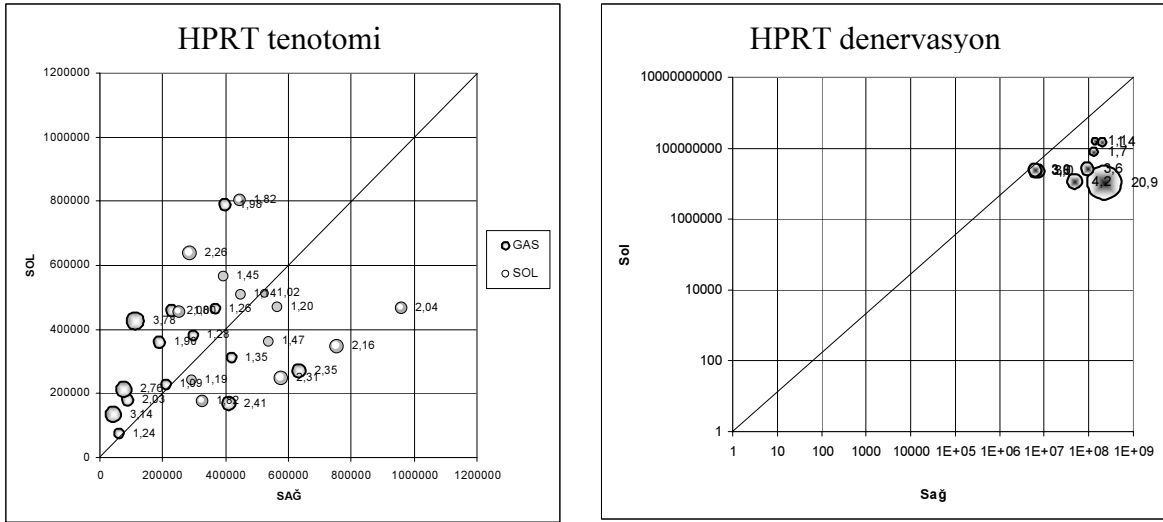
Tenotomi ve denervasyon modellerinde HPRT geni ekspresyon düzeyinin stabilitesinin gösterilmesi için, cerrahi girişim uygulanmış örneklerin (sağ kas) , kontrol örneklerine (sol kas) oranlanması sonucu elde edilen değerlerle korelasyon analizi gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 4.7. Tenotomi ve Denervasyon modellerinde HPRT geni ekspresyon analizi sonuçları

HPRT – Tenotomi									
Gastroknemius					Soleus				
hafta	sıçan	sol	sağ	sağ/sol	hafta	sıçan	sol	sağ	sağ/sol
1	1	88351	179748	2,03	1	1 *	637398	183811	0,29
1	2	43182	135628	3,14	1	2	283524	639439	2,26
3	1 *	613776	116732	0,19	3	1	1782060	1151533	0,65
3	2	59711	74034	1,24	3	2	957394	468289	0,49
3	3 *	41844	471686	11,27	3	3	443060	805333	1,82
4	1	112176	424550	3,78	4	1 *	521968	45083	0,09
4	2	408854	169338	0,41	4	2	290642	244049	0,84
4	3 *	491807	51418	0,10	4	3	752499	347675	0,46
4	4	77264	212975	2,76	4	4	251823	454516	1,80
4	5	298059	381588	1,28	4	5 *	641829	234640	0,37
4	6	229376	457966	2,00	4	6	522298	514006	0,98
6	1	189782	361094	1,90	6	1	447678	510022	1,14
6	2	367543	464398	1,26	6	2	563395	469619	0,83
6	3	210680	228884	1,09	6	3	536739	363963	0,68
16	1	633536	269474	0,43	16	1	323595	177817	0,55
16	2	397306	787997	1,98	16	2	390424	567188	1,45
16	3	420065	310805	0,74	16	3	574959	248456	0,43

HPRT Denervasyon				
Gastroknemius				
hafta	sıçan	sol	sağ	sağ/sol
2	1 *	1,11E+08	595375	0,005361
2	2	48514693	11472856	0,236482
2	3	6112190	23820085	3,897144
3	1	1,98E+08	1,43E+08	0,720474
3	2 *	4861055	3,87E+08	79,60444
3	3	2,22E+08	10635314	0,047843
5	1	1,39E+08	1,55E+08	1,115901
5	2	1,29E+08	76407451	0,593415
7	1	91057538	25263698	0,277448
7	2	6415952	23400115	3,647177
8	1 *	1,14E+08	751950	0,006594
8	2	7324309	22310572	3,046099
8	3 *	55558667	28318,64	0,00051

Çizelge 4.7. 'de * ile işaretlenmiş örnekler *outlier* olarak değerlendirildiği için, korelasyon analizinden çıkartılmıştır. (sol: sol kas dokusu ekspresyon analizi sonuçları, sağ: sağ kas dokusu ekspresyon analizi sonuçları, sağ/sol: sağ kas sonuçlarının sol kas sonuçlarına oranı).



Şekil 4.8. Tenotomi ve Denervasyon modellerinde HPRT ekspresyonunun sağ/sol oranı korelasyon grafikleri (Daire çapları standart deviasyonu göstermektedir) Grafikler XLSTAT 2008 yazılımı ile elde edilmiştir.

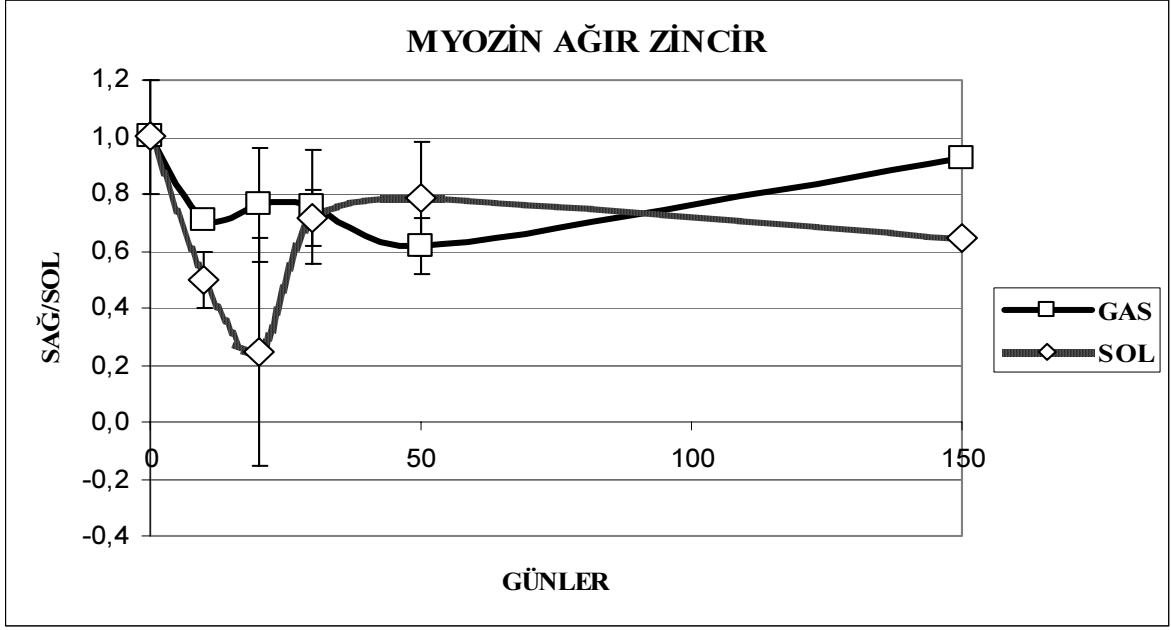
Çizelge 4.8. HPRT ekspresyonu korelasyon analizi sonuçları

	HPRT Tenotomi	HPRT Denervasyon
GAS	0,370058	0,502358
SOL	0,638724	
G+S	0,640154	

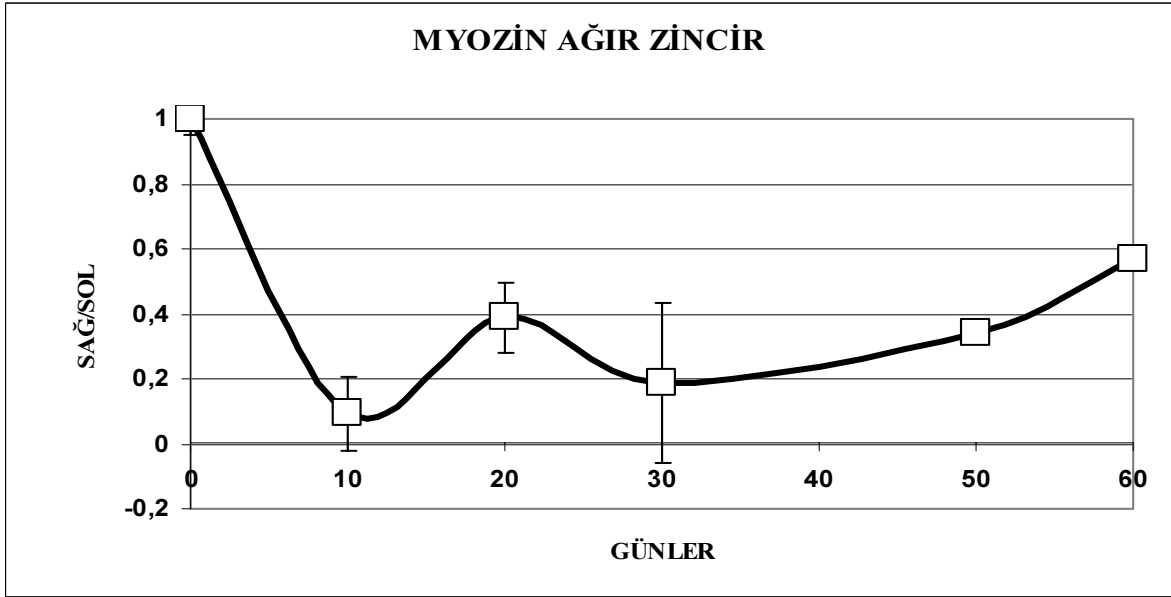
(1: tam korelasyon, -1: ters korelasyon , 0: korelasyon yok şeklinde ifade edilmektedir)

4.2. Myozin Ağır Zincir (MHC) Gen Ekspresyonu Bulguları

Housekeeping genlerin ekspresyon düzeyleri incelendikten sonra, kas dokusunun yapısal proteinlerinden biri olan MHC'nin dejenerasyon sürecinde kas atrofisi ile ilişkilendirilebilmesi için, tenotomi ve denervasyon örneklerindeki ekspresyon düzeyi belirlendi. MHC gen ekspresyonu normalizasyonu için TBP verileri kullanıldı. MHC ekspresyonunun kantitatif analizi için, *housekeeping* gen normalizasyonu sonrasında, girişim uygulanan sağ kastan alınan sonuçlar kontrol olarak kullanılan sol kas sonuçlarına oranlanarak zamana karşı ekspresyon grafiği çizildi.



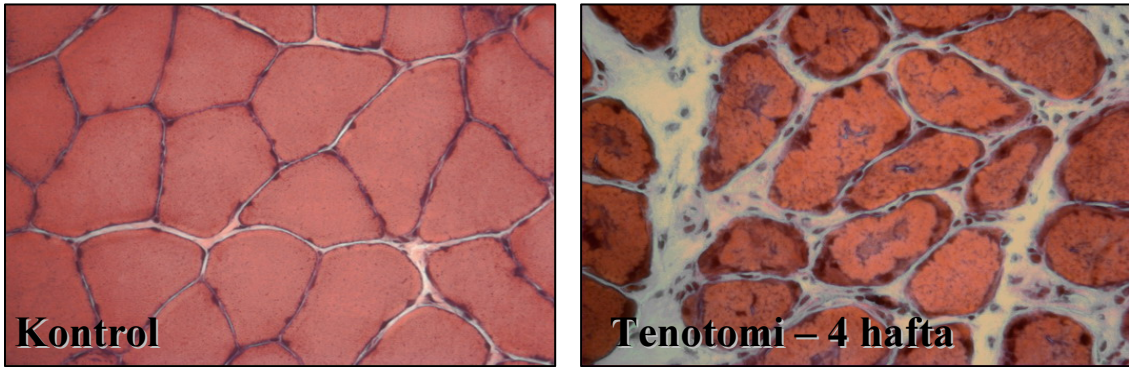
Şekil 4.9. Tenotomi modelinde dejenerasyon sürecinde MHC ekspresyonu grafiği



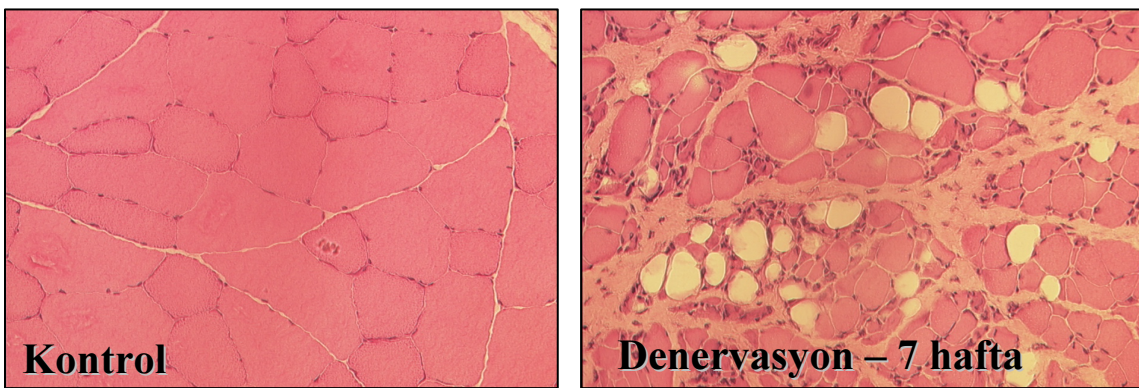
Şekil 4.10. Denervasyon modelinde dejenerasyon sürecinde MHC ekspresyonu grafiği.

5. TARTIŞMA/SONUÇ

Deneysel olarak uygulanan dejenerasyon modelleri, denervasyon ve inaktif kas modeli olarak kullanılan tenotomide dejenerasyon süreçleri karşılaştırıldığında, denervasyonda tipik olarak kasın sinir uyarımının ortadan kalkmasına bağlı atrofik etki gösterdiği, tenotomide ise kasın *preload* geriliminin azalarak etki gösterdiği görülmüştür. Her iki modelde de kas dejenerasyonunun temel bulguları, kas öncülü hücrelerden oluşan ve rejenerasyon cevabını temsil eden küçük çaplı merkezi çekirdekli genç kas lifleri, atrofi, fibrozis ve daha sonraki dönemde yağ hücreleri infiltrasyonu gözlenmiştir. Bu durumda kaslarda yapı ve fonksiyon bozukluklarının sonucu olarak doku mimarisi değişiklikleri meydana gelmektedir.



Şekil 5.1. Tenotomi modelinde dejenerasyon histolojisi: Tenotomi uygulanan kasta, kas lifi çaplarında azalma, endomizyal tabakada artış, fibrotik değişiklikler ve yağ hücreleri infiltrasyonu sonucu doku mimarisi değişiklikleri gözlenmektedir.



Şekil 5.2. Denervasyon modelinde dejenerasyon histolojisi : Denervasyon uygulanan kasta, kas öncülü hücrelerden oluşan ve rejenerasyon cevabını temsil eden küçük çaplı merkezi çekirdekli genç kas lifleri, kas lifi çapı ve sayısında azalma, endomizyal tabakada artış, fibrozis ve yoğun yağ hücreleri infiltrasyonu sonucu doku mimarisi değişiklikleri gözlenmektedir.

Tenotomi ve denervasyon modellerinde en önemli dejenerasyon bulgusu olan atrofi, kontraktıl elemanların kaybına neden olmaktadır. MHC kas dokusunun yapısal proteinlerinden biridir ve kas kasılmasında görev alan kontraktıl elemanlardandır. Dolayısı ile bulgularda yer alan Şekil 4.9 ve 4.10'da gözlenen MHC ekspresyonundaki azalma dejenerasyon sürecindeki atrofi nedeniyle beklenen bir sonuçtur. Tenotomi modelinde tendonun zaman içinde kendini onarması ile birlikte özellikle ağırlık taşıyan gastroknemius kasında meydana gelen atrofinin geri döndüğü gözlenmiştir. Denervasyon modelinde geri dönüşümsüz uyarın eksikliğine bağılı olarak ciddi kas atrofisi geliştiğı gözlenmektedir (Syrový *et al.* 1972, Pette and Vrbova 1992, Midrio *et al.* 1997, Salmons *et al.* 2005). MHC ekspresyonu, gelişen daha ciddi atrofi nedeniyle denervasyon modelinde (Şekil 4.10) tenotomi modeline (Şekil 4.9) göre çok daha belirgin azalmıştır.

Özellikle kas dejenerasyonu gibi köklü yapısal değışikliklerin meydana geldiğı fizyolojik veya patolojik durumlarda gen ekspresyon çalışmaları öncesinde en güvenilir normalizatör referans genin belirlenmesi gerekmektedir. Literatürde dejenerasyon sürecindeki kas dokusunda ekspresyon çalışmaları için en güvenilir referans genin belirlenmesi amacıyla yapılmış bir çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışmada dejenerasyon sürecindeki kas dokusunda, kantitatif ekspresyon çalışmalarında, normalizasyon amacıyla kullanılabilcek 4 *housekeeping* genin ekspresyon düzeyleri belirlenmiştir. *Housekeeping* genlerden GAPDH ve HPRT'nin ekspresyon düzeylerinin, normal kas dokusu ile karşılaştırıldığında dejenerasyon sürecinde değışkenlik gösterdiği sonucuna ulaşılmıştır. β -Aktin ve TBP ekspresyon düzeyleri ise en az değışkenliği sergilemiştir.

Çizelge 5.1. 4 *housekeeping* genin korelasyon analizi sonuçları

<i>Housekeeping</i> Genler	Korelasyon Analizi Sonuçları	
	Tenotomi	Denervasyon
β -Aktin	0,754	0,999724
TBP	0,756935	0,99731
GAPDH	0,671042	-
HPRT	0,640154	0,502358

Korelasyon analizi sonucunda girişim uygulanan örneklerin (sağ kas) kontrol örneklerine (sol kas) oranı 1'e ne kadar yakınsa *housekeeping* genin ekspresyon düzeyi o kadar az değışkendir. Bir başka ifade ile bu oran 1'e ne kadar yakınsa, tenotomi ve denervasyon modellerinde kantitatif RT-PCR çalışmaları için o kadar güvenilir normalizatör genidir.

Çizelge 5.1’de korelasyon analizi sonuçları verilmiştir. Bu sonuçlar ışığında dejenerasyon sürecindeki kas dokusunda RT-PCR deneyleri için *housekeeping* gen seçimi güvenilirlik ve değişmezlik açısından aşağıdaki şekilde özetlenebilir:

En güvenilir

**En az değişkenlik
sergileyen**

β -Aktin = TBP > HPRT > GAPDH

En az güvenilir

**En çok değişkenlik
sergileyen**

GAPDH geni ekspresyon düzeyi normal kas dokusu ile karşılaştırıldığında dejenerasyon sürecindeki kas dokusunda orta düzeyde değişkenlik göstermiştir. Tenotomi modelinde bu değişkenlik 0,671 korelasyon katsayısı değeri ile ifade edilebilirken, denervasyon örneklerinde anlamlı bir analize ulaşmak mümkün olmamıştır. Denervasyon doku örneklerinin ideal şartlarda mRNA izolasyonu yapılmadığı göz önüne alındığında, bu sonucun nedeni GAPDH mRNA molekülünün degradasyona diğer gen ürünlerinden daha yatkın olması olabilir. Bu durum, mRNA degradasyonunun olduğu durumlarda GAPDH ürününün daha fazla etkilendiğini düşündürmektedir. Mikroarray analizlerinde, GAPDH ve β -Aktin mRNA’larının ilk yıkıma uğradıkları 5’ ve 3’ uçlarına ait problemlerin sinyalleri rutin olarak mRNA kalite kontrolü amacıyla kullanılmaktadır. GAPDH, gen ekspresyonu çalışmalarında son yıllara kadar en yaygın olarak kullanılan referans genlerden biridir (Leutenegger *et al.* 1999, von Rechenberg *et al.* 2001). Ancak GAPDH’nin referans gen olarak kullanılması bazı araştırmacılar tarafından eleştirilmektedir (Bustin 2000, Dheda *et al.* 2004). Bunun nedenlerinden biri, çeşitli kanser tipleri ile yapılan çalışmalarda GAPDH ekspresyonunun artış göstermesidir (Ripple and Wilding 1995, Chang *et al.* 1998). Ayrıca GAPDH ekspresyonunun bölünmekte olan hücrelerde arttığı ve bu nedenle referans gen olarak kullanılmasının sakıncalı olduğu belirtilmiştir (Suzuki *et al.* 2000). Çeşitli kanser tiplerinde GAPDH ekspresyonu artış gösterdiği halde, küçük hücreli olmayan akciğer kanseri dokularında, kantitatif gen ekspresyon analizlerinde en güvenilir referans gen seçimi için yapılan bir çalışmada, ekspresyon düzeyi normal dokuya göre en az değişkenlik gösteren (en güvenilir) *housekeeping* gen GAPDH olmuştur (Liu *et al.* 2005).

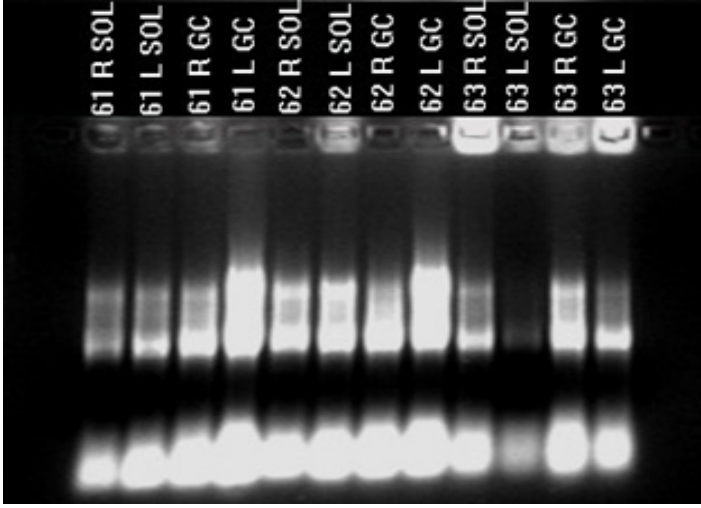
HPRT geni ekspresyon düzeyi, normal kas dokusu ile karşılaştırıldığında dejenerasyon sürecindeki dokularda değişkenlik göstermiştir. Bu nedenle sonuçlar, dejenerasyon sürecindeki kas dokusunda kantitatif RT-PCR uygulamaları için HPRT’nin en az güvenilir

referans genlerden biri olduğunu ortaya koymuştur. Farklı kanser tiplerinden (kolon, meme, prostat, deri ve mesane) alınmış tümör dokularında kantitatif gen ekspresyon analizleri için gerekli referans genlerin değişkenlik ve güvenilirlik açısından karşılaştırıldığı bir çalışmada tüm dokular için en az değişkenlik gösteren *housekeeping* genin HPRT olduğu gösterilmiştir (de Kok *et al.* 2005). Buna karşılık bir başka kanser tipi olan böbrek hücresi karsinomu dokularında, kantitatif gen ekspresyon analizleri için referans genlerin karşılaştırıldığı bir çalışmada HPRT'nin ekspresyon düzeyinin değişkenlik gösterdiği (düştüğü) ve bu dokular için uygun referans gen olmadığı ifade edilmiştir (Jung *et al.* 2007).

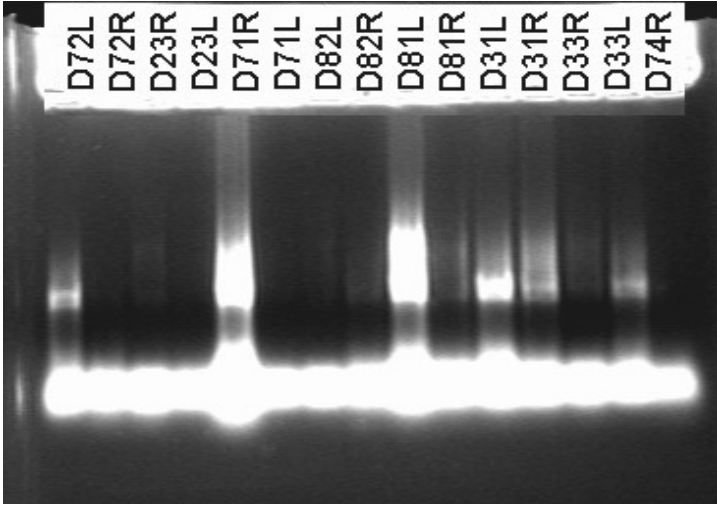
β -Aktin ve TBP genlerinin ekspresyon düzeyleri, normal kas dokusu ile karşılaştırıldığında dejenerasyon sürecindeki dokularda en az değişkenliği sergilemiştir. Çalışma sonucunda birbirlerine çok yakın korelasyon analizi sonuçları ile en az değişkenlik gösteren 2 genin kas dokusunda RT-PCR uygulamaları için en güvenilir referans genler olduğu gösterilmiştir. β -Aktin de GAPDH gibi gen ekspresyonu çalışmalarında son yıllara kadar en yaygın olarak kullanılan referans genlerden biridir (Giguère and Prescott 1999, Swiderski *et al.* 1999). Kantitatif ekspresyon analizleri için en uygun normalizatör genin seçilmesi amacıyla yapılan bir çalışmada en az değişkenlik gösteren *housekeeping* gen olduğu gösterilmiştir (Suzuki *et al.* 2000). Yine kolon kanserinde, kantitatif gen ekspresyon analizleri için gerekli referans genlerin değişkenlik ve güvenilirlik açısından karşılaştırıldığı bir diğer çalışmada β -Aktin'in ekspresyon düzeyinin değişkenlik gösterdiği (arttığı) ve bu dokular için uygun referans gen olmadığı ifade edilmiştir (Tsuji *et al.* 2002). TBP, böbrek hücresi karsinomu dokularında (Jung *et al.* 2007) ve mesane kanseri dokularında (Ohl *et al.* 2006) kantitatif gen ekspresyon analizleri için referans genlerin karşılaştırıldığı iki ayrı çalışmada en güvenilir ve en az değişkenlik gösteren 2 *housekeeping* genden biri olmuştur.

Bu çalışmanın sonuçlarından biri de kas dokusundan mRNA izolasyonunun ideal şartlarının belirlenmesidir. Çalışmada tenotomi örnekleri çıkarıldığı anda TRIzol içine alınarak homojenize edildi ve -80°C 'de dondurularak saklandı. Denervasyon örnekleri ise, çıkarıldığı anda herhangi bir solusyon içine alınmadan doğrudan sıvı azotta dondurularak -80°C 'de saklandı ve daha sonra RNA izolasyonu aşamasında TRIzol ilavesi ile homojenize edildi. Bu nedenle denervasyon örneklerinde RNA izolasyonu tenotomi

örneklerine göre daha uygunsuz koşullarda yapılmıştır (Şekil 5.3. ve Şekil 5.4.). Kas dokusu katı madde oranı ve bağ dokusu yönünden bilinen en sert ve mekanik olarak dirençli dokulardan biridir. Kas dokusundan yapılan RNA izolasyonlarının doku taze iken yapılması altın standarttır. Bu nedenle dokunun endojen RNAzlarını inaktive eden kaotropik tuz çözeltileri içinde (Guanidyum tiosiyanat içeren TRIzol ve benzerleri) homojenizasyonunu takiben -80°C’de dondurularak saklanması en ideal koşuldur. Kas dokusunun doğrudan sıvı azot içinde dondurulduğu ve daha sonra homojenize edildiği durumlarda, özellikle doku parçalayıcısı içinde ısınarak çözünen dokuda, endojen RNAzların aktif hale geçmesine bağlı olarak RNA kalitesinin düştüğü gözlenmiştir (Şekil 5.4.). Taze dondurulmuş dokudan daha sonra yapılan izolasyon RNA kalitesini düşürmekte; ancak bu durum PCR’a dayalı yöntemlerle ekspresyon analizi yapılmasını engellememektedir.



Şekil 5.3. Tenotomi örnekleri RNA elektroforezi; %1.5 Agaroz – formaldehid jel.
(Jel analizinde örneklerin hemen hepsinde 18s ve 28s ribozomal RNA bantları gözlenebilmektedir).



Şekil 5.4. Denervasyon örnekleri RNA elektroforezi; %1.5 Agaroz – formaldehid jel.
(Jel analizinde örneklerin çoğunda RNA'nın yıkıma uğradığı ve 18s, 28s ribozomal RNA bantlarının gözlenemediği anlaşılmıştır).

Yukarıdaki tüm sonuçlar göstermektedir ki, farklı doku ve hücre tiplerinde, RT-PCR uygulamalarında, her çalışma kendi içinde değerlendirilmeli ve yapılacak çalışma öncesi kullanılacak referans genlerin güvenilirliği belirlenmelidir. Ayrıca referans gen seçiminde birden fazla *housekeeping* genin ekspresyon düzeyi en az değişkenliği göstermiş ve güvenilir kabul edilebiliyorsa, ekspresyon analizlerinde en az birden fazla gen, normalizatör olarak kullanılmalı ve ekspresyon düzeylerinin geometrik ortalamaları alınarak normalizasyon yapılmalıdır (Vandesompele *et al.* 2002, Karahüseyinoğlu *et al.* 2008).

KAYNAKLAR

- Anzil, A.P., Sancesario, G., Massa, R., Bernard, G. 1991. Myofibrillar disruption in the rabbit soleus muscle after one-week hindlimb suspension. *Muscle and Nerve*, 14: p. 358-369
- Bacou, F., Vigneron, P., Massoulié, J. 1982. Acetylcholinesterase forms in fast and slow rabbit muscle. *Nature*, Apr 15;296(5858):661-4
- Berg, H.E., Dudley ,G.A., Haggmark, T., Ohlsen, H., Tesch, P.A., 1991. Effects of lower limb unloading on skeletal muscle mass and function in humans. *J. Appl. Physiol.*, 70: p. 1882-1885
- Blau, H. M., Webster, C., Pavlath, G. K. 1983. Defective myoblasts identified in Duchenne Muscular Dystrophy. *PNAS*, 80: 4856-4860
- Blaveri, K., Heslop, L., Yu, D. S., Rosenblatt, J. D., Gross, J. G., Partridge T. A., Morgan JE. 1999. Patterns of repair of dystrophic mouse muscle: studies on isolated fibers. *Dev Dyn* 216(3): 244-256
- Bustin, S.A. 2000. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol*, Oct,25(2):169-93
- Bustin, S. A. 2002. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems *Journal of Molecular Endocrinology* 29, 23–39
- Bustin, S.A. and Mueller, R. 2005. Review: Real-time reverse transcription PCR (qrt-pcr) and its potential use in clinical diagnosis. *Clinical Science* 109, 365-379
- Bustin, S.A., Benes, V. , Nolan, T., Pfaffl, M.W. 2005. Quantitative real-time RT-PCR – a perspective. *Journal of Molecular Endocrinology* 34, 597–601
- Chang, T.J., Juan, C.C., Yin, P.H., Chi, C.W., Tsay, H.J. 1998. Up-regulation of beta-actin, cyclophilin and GAPDH in N1S1 rat hepatoma. *Oncology Reports* 5, 469–471

- de Kok, J.B., Roelofs, R.W., Giesendorf, B.A., Pennings, J.L., Waas, E.T., Feuth, T., Swinkels, D.W., Span, P.N. 2005. Normalization of gene expression measurements in tumor tissues: comparison of 13 endogenous control genes. *Lab Invest*, Jan,85(1):154-9
- Dheda, K., Huggett, J.F., Bustin, S.A., Johnson, M.A., Rook, G., Zumla, A. 2004. Validation of *housekeeping* genes for normalizing RNA expression in real-time PCR. *Biotechniques*, Jul,37(1):112-4, 116, 118-9
- Dulor, J.P., Cambon, B., Vigneron, P., Reyne, Y., Nougues, J., Casteilla, L., Bacou, F. 1998. Expression of specific white adipose tissue genes in denervation-induced skeletal muscle fatty degeneration . *FEBS Letters* 439: 89-92
- Gerber, C., Meyer, D. C., Schneeberger, A. G., Hoppeler, H., and von Rechenberg, B. 2004. Effect of tendon release and delayed repair on the structure of the muscles of the rotator cuff: an experimental study in sheep. *J Bone Joint Surg Am* 86-A, 1973-1982
- Giguère, S., Prescott, J.F. 1999. Quantitation of equine cytokine mRNA expression by reverse transcription-competitive polymerase chain reaction. *Vet Immunol Immunopathol*, Jan, 4,67(1):1-15
- Hall-Craggs, E. C., Seyan, H. S. 1975. Histochemical changes in innervated and denervated skeletal muscle fibers following treatment with bupivacaine (marcain). *Exp Neurol* 46(2): 345-354
- Hanson, A. M., Ferguson, V. L., Simske, S. J., Cannon, C. M., and Stodieck, S. 2005. Comparison of tail-suspension and sciatic nerve crush on the musculoskeletal system in young-adult mice. *Biomed Sci Instrum* 41, 92-96
- Hornberger, T.A., Hunter, R.B., Kandarian, S.C., Esser., K.A. 2001. Regulation of translation factors during hindlimb unloading and denervation of skeletal muscle in rats. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 281: p. C179-C187

- Jackman, R.W., Kandarian, S.C. 2004. The Molecular Basis Of Skeletal Muscle Atrophy. *Am J Physiol Cell Physiol.* Oct; 287(4): C834-43
- Jiang, B., Ohira, Y., Roy, R.R., Nguyen, Q., Ilyina-Kakueva, E.I., Oganov, V., Edgerton, V.R. 1992. Adaptation of fibers in fast-twitch muscles in rats to spaceflight and hindlimb suspension. *J. Appl. Physiol.*, 73(2): p. 58S-65S
- Jung, M., Ramankulov, A., Roigas, J., Johannsen, M., Ringsdorf, M., Kristiansen, G., Jung, K. 2007. In search of suitable reference genes for gene expression studies of human renal cell carcinoma by real-time PCR. *BMC Mol Biol*, Jun, 8;8:47.
- Karahüseyinoglu, S., Kocafe, C., Balci, D., Erdemli, E., Can, A. 2008. Functional structure of adipocytes differentiated from human umbilical cord stroma-derived stem cells. *Stem Cells.* Mar;26(3):682-91. Epub 2008 Jan 10
- Khaitlina, S.Y. 2001. Functional specificity of actin isoforms. *Int Rev Cytol.* 202:35-98
- Leutenegger, C.M., von Rechenberg, B., Huder, J.B., Zlinsky, K., Mislin, C., Akens, M.K., Auer, J., Lutz, H. 1999. Quantitative real-time PCR for equine cytokine mRNA in nondecalcified bone tissue embedded in methyl methacrylate. *Calcif Tissue Int.* Nov;65(5):378-83
- Liu, D.W., Chen, S.T., Liu, H.P. 2005. Choice of endogenous control for gene expression in nonsmall cell lung cancer. *Eur Respir J.* Dec, 26(6):1002-8.
- Mal, T.K., Takahata, S., Ki, S., Zheng, L., Kokubo, T., Ikura, M. 2007. Functional silencing of TATA-binding protein (TBP) by a covalent linkage of the N-terminal domain of TBP-associated factor. *J Biol Chem.* Jul 27;282(30):22228-38. Epub 2007 Jun 6
- Meyer, D.C., Hoppeler, H., Rechenberg, B.V., Greber, C. 2004. A pathomechanical concept explains muscle loss and fatty muscular changes following surgical tendon release. *J of Orthopaedic Research.* 22: 1004-1007

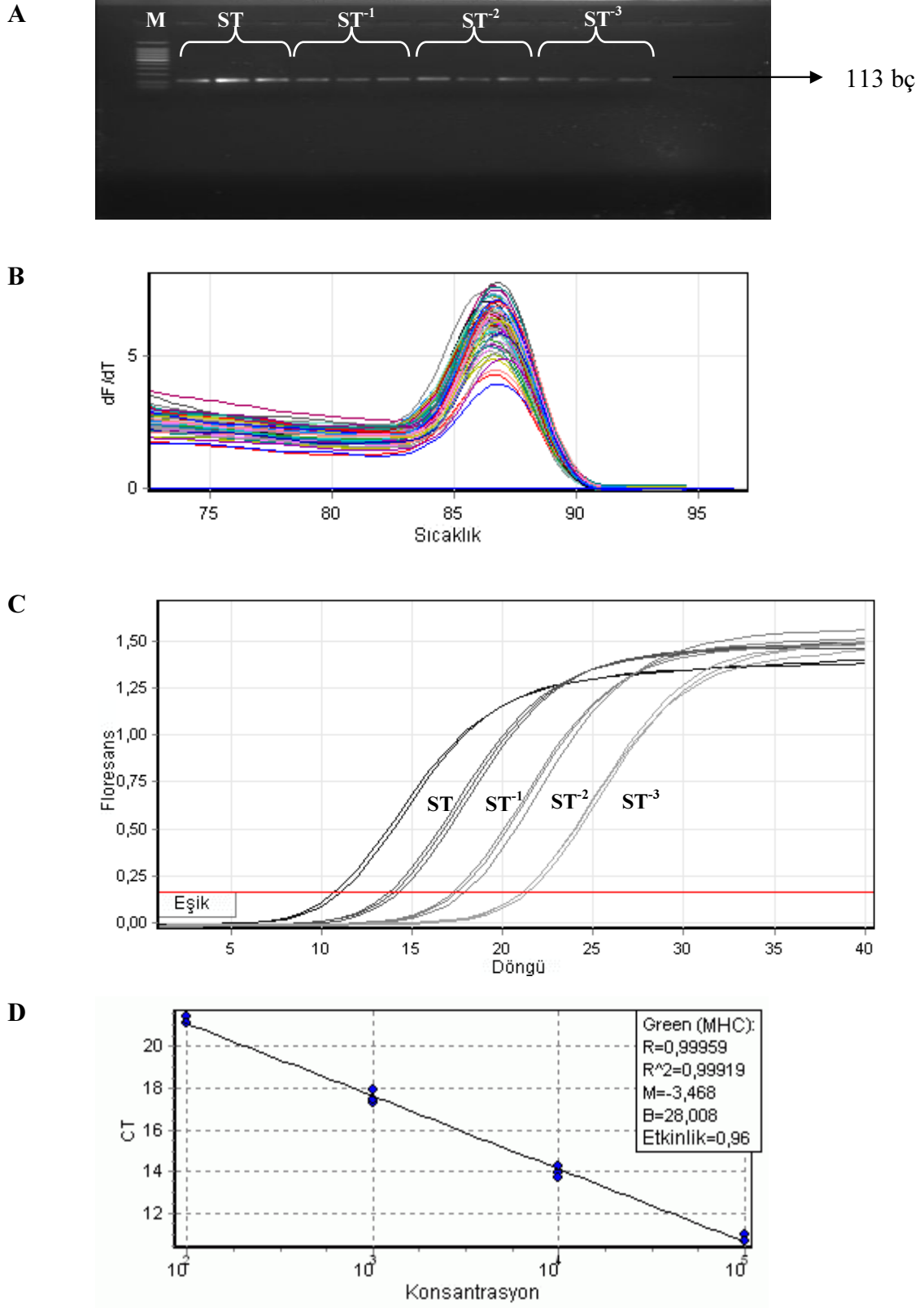
- Midrio, M., Danieli-Betto, D., Megighian, A., Betto, R. 1997. Early effects of denervation on sarcoplasmic reticulum properties of slow-twitch rat muscle fibres. *Pflugers Arch*, 434(4): 398-405
- Nolan, T., Hands, R. E., Bustin, S. E. 2006. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nature Protocols*, 1(3):1559-1582
- Oexle, K. , Kohlschütter, A. 2001. Cause of progression in Duchenne Muscular Dystrophy: Impaired differentiation more probable than replicative aging. *Neuropediatrics*, 32:123-129
- Ohira, Y., Yoshinaga, T., Nomura, T., Kawano, F., Ishihara, A., Nonaka, I., Roy, R.R., Edgerton, V.R. 2002. Gravitational unloading effects on muscle fiber size, phenotype and myonuclear number. *Adv Space Res.*, 30(4):777-81
- Ohl, F., Jung, M., Xu, C., Stephan, C., Rabien, A., Burkhardt, M., Nitsche, A., Kristiansen, G., Loening, S.A., Radonić, A., Jung, K. 2005. Gene expression studies in prostate cancer tissue: which reference gene should be selected for normalization? *J Mol Med*. Dec;83(12):1014-24. Epub 2005 Oct 7.
- Ohl, F., Jung, M., Radonić, A., Sachs, M., Loening, S.A., Jung, K. 2006. Identification and validation of suitable endogenous reference genes for gene expression studies of human bladder cancer. *J Urol*, May, 175(5):1915-20
- Öner, C. 2003. *Genetik Kavramlar*. 6. Baskıdan Çeviri. Palme Yayıncılık, 816 sayfa, Ankara.
- Pette, D., Vrbova, G. 1992. Adaptation of mammalian skeletal muscle fibers to chronic electrical stimulation. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*, 120: 115-202
- Pfaffl, M.W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research* 29 - E45

- Ripple, M.O., Wilding, G. 1995. Alteration of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase activity and messenger RNA content by androgen in human prostate carcinoma cells. *Cancer Research*, 55, 4234–4236
- Roland, M., Hanson, A. M., Cannon, C. M., Stodieck, L. S., and Ferguson, V. L. 2005. Exercise prevention of unloading-induced bone and muscle loss in adult mice. *Biomed Sci Instrum* 41, 128-134
- Salmons, S., Ashley, Z., Sutherland, H., Russold, M. F., Li, F., Jarvis, J. C. 2005. Functional electrical stimulation of denervated muscles: basic issues. *Artif Organs*, 29(3): 199-202
- Schluesche, P., Stelzer, G., Piaia, E., Lamb, D.C., Meisterernst, M. 2007. NC2 mobilizes TBP on core promoter TATA boxes. *Nat Struct Mol Biol.* Dec;14(12):1196-201. Epub 2007 Nov 11
- Stehen, A.M., Luthman, H., Hellgren, D., Lambert, B. 1990. Levels of hypoxanthine phosphoribosyltransferase RNA in human cells. *Exp Cell Res.* Feb, 186(2):236-44
- Suzuki, T., Higgins, P.J., Crawford, D.R. 2000. Control selection for RNA quantitation. *Biotechniques.*, Aug, 29(2):332-7
- Syrový, I., Gutmann, E., Melichna, J. 1972. The effect of denervation on contraction and myosin properties of fast and slow rabbit and cat muscles. *Physiol Bohemoslov*, 21(4): 353-359
- Swiderski, C.E., Klei, T.R., Horohov, D.W.J. 1999. Quantitative measurement of equine cytokine mRNA expression by polymerase chain reaction using target-specific standard curves. *Immunol Methods*, Jan ,1;222(1-2):155-69
- Thompson & Thompson. 2005. *Tıbbi Genetik*. 6. Baskı. Güneş Kitabevi, 446 sayfa, Ankara

- Tsuji, N., Kamagata, C., Furuya, M., Kobayashi, D., Yagihashi, A., Morita, T., Horita, S., Watanabe, N. 2002. Selection of an internal control gene for quantitation of mRNA in colonic tissues. *Anticancer Res*, Nov-Dec;22(6C):4173-8
- Vandekerckhove, J., Weber, K. 1978. At least six different actins are expressed in a higher mammal: an analysis based on the amino acid sequence of the amino-terminal tryptic peptide. *J Mol Biol.* 126:783–802
- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., Speleman, F. 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* Jun, 18;3(7):Research 0034. Epub 2002 Jun 18.
- von Rechenberg, B., Leutenegger, C., Zlinsky, K., McIlwraith, C.W., Akens, M.K., Auer, J.A. 2001. Upregulation of mRNA of interleukin-1 and -6 in subchondral cystic lesions of four horses. *Equine Vet J.* Mar,33(2):143-9
- Whalen, R. G., Haris, J. B., Butler-Browne, G. S., Sesodia, S. 1990. Expression of myosin isoforms during notexin-induced regeneration of rat soleus muscles. *Dev Biol* 141(1): 24-40
- Wong, M. L. and Medrano J. F. 2005. Review: Real Time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques* 39(1),75-85

EKLER

EK 1: MHC Geni RT-PCR Sonuçları



Şekil 4.19. MHC geni RT-PCR sonuçları **A)** Standartların agaroz jel elektroforezi sonuçları. **B)** Standartların ve örneklerin erime eğrisi. **C)** Standart dilüsyonlar için, gerçek zamanlı amplifikasyon eğrileri. **D)** Standart eğri

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Ayşe Yüzbaşıoğlu
Dođum Yeri : Ankara
Dođum Tarihi: 17.01.1977
Medeni Hali : Evli, 1 çocuk sahibi
Yabancı Dili: İngilizce

Eđitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lisans : Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü-1998

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl

1999-2006 : TÜBİTAK DNA/Doku Bankası ve Gen Araştırmaları Laboratuvarı
(Uzman Yardımcısı)

2007.Ocak-Mayıs : TÜBİTAK Teknoloji ve Yenilik Destek Programları Başkanlığı
Biyoteknoloji, Tarım, Çevre ve Gıda Teknolojileri Grubu
(Bilimsel Programlar Uzman Yardımcısı)

2007.Haziran- : Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı
(Uzman)

Yayınları (SCI ve diğer)

Tanyel FC, **Yuzbasioglu A**, Kocaeffe C, Orhan D, Ozguc M, Androgen receptor immunostaining and androgen receptor messenger ribonucleic acid expression are increased in cremaster muscles associated with undescended testis. Urology. 2006, 67(4) : 855-8

Kongre Tebliğleri

1. Dursun, A., Özgül, K., Kalkanoğlu, S., **Yüzbaşıoğlu, A.**, Coşkun, T., Tokatlı, A., Özalp, I., Özgüç, M. Search for a founder effect in Turkish MSUD patients with a novel C213Y mutation at E1 α locus. SSIEM 39th Annual Symposium, Prague, Czech Republic, 4-7 September 2001. Journal of Inherited Metabolic Disease, Vol20(4) suppl 1, 072-P.

2. Dursun, A., Özgül, K., Coşkun, T., Tokatlı, A., Kalkanoğlu, S., Özbaş-Gerçeker, F., **Yüzbaşıoğlu, A.**, Özalp, İ., Özgüç, M. A 11 bp deletion due to IVS3G→A mutation in E2 mRNA from a classical type Turkish MSUD patient. SSIEM 39th Annual Symposium, Prague, Czech Republic, 4-7 September 2001. Journal of Inherited Metabolic Disease, Vol 20(4) suppl 1, 073-P

3. Ozbas-Gerceker, F., **Yuzbasioglu, A.**, Demirtas, M., Ozgul, K., Ozguc, M. TUBITAK DNA/Cell Bank and Gene Research Laboratory. Workshop on Biobanks-practical, ethical and legal aspects, September 12-13, 2002, Uppsala, Sweden. Short presentation 7.

4. Özgüç, M., Ozbas-Gerceker, F., **Yuzbasioglu, A.** TUBITAK DNA/Cell Bank. ISBER 5th Annual Meeting, October 17-20, Perugia, Italy. Cell Preservation Technology Dec 2004, Vol. 2, No. 4: 318. Abstract # 33.

5. Özgüç M, Özbaş-Gerçeker F, **Yüzbaşıoğlu A**, Özgül RK. TÜBİTAK DNA/Cell Bank for rare genetic disorders, From biobanks to biomarkers: Translating the potential of human population genetics research to improve the quality of health of the EU citizen, Wellcome Trust Conference, 20-22 September 2005, Hinxton, England, p18

6. A. Yüzbaşıoğlu, İ. Onbaşılar, D. Üren, R. Soylu, Ç. Kocaefe, M. Özgüç, Dejenerasyonu Sürecindeki Kas Dokusunda rt-PCR Uygulamaları İçin Güvenilir Normalizatör “House Keeping” Gen Seçimi , X.Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi, 6-9 Eylül 2007,Antalya, P39

Projeler

2000-2002 Türk “Mapple syrup urine” hastalarında mutasyon ve polimorfizmlerin saptanması; C213Y mutasyonunun Türk toplumunda “founder” etkisinin araştırılması. H.Ü Araştırma Fonu (0001101007), Yardımcı Araştırmacı

2002-2004 Çocuklarda inguinal herni, hidrosel ve inmemiş testisin nedenleri
H.Ü. Bilimsel Araştırmalar Birimi (01 02 101 004), Yardımcı Araştırmacı

2002-2005 Mesial Temporal Skleroz patolojisinde apoptotik ve sağkalım hücrel cevaplarının mRNA ekspresyonu seviyesinde analizi
H.Ü Araştırma Fonu, (Proje No: 01 02 101 007), Yardımcı Araştırmacı

2005-2007 Mesial Temporal Lob Epilepsisi ve Selenoproteinler: Hipokampal Hücre Hasarına Karşı Sağkalım Cevabındaki Rollerini.
TÜBİTAK-SBAG-2943, Yardımcı Araştırmacı

2005-2007 Genombilim Teknolojileri Altyapısının Güçlendirilmesi (GENTEPE),
SBAG- FP6 -2 (105S364), Yardımcı Araştırmacı

2006-2007 Molecular defects involved in Pelizaeus Merzbacher Like Disease (PMLD), Yardımcı Araştırmacı

2006-2007 MLC disease: Elucidating the role of MLC1 protein in brain physiology and its involvement in MLC pathogenesis, Yardımcı Araştırmacı

2006-2009 Biyobankalama Etkinliklerinde Ulusal Ağ Kurulması (BIYONET),
DPT Proje no: 2006K120040, Yardımcı Araştırmacı