

**FARE GENOMUNDA BULUNAN KOLESTEROL ve  
SAFRA ASİTLERİ SENTEZİNDE GÖREV ALAN  
BAZI ENZİM GENLERİNİN cDNA'LARININ  
ÜRETİLMESİ VE *İN SİTU* HİBRİDİZASYONU İLE  
GEN EKSPRESYON ANALİZİ  
Melda ŞİŞECİOĞLU**

**Doktora Tezi  
Kimya Anabilim Dalı  
Prof. Dr. Hasan ÖZDEMİR  
2010  
Her hakkı saklıdır**

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

**FARE GENOMUNDA BULUNAN KOLESTEROL ve SAFRA  
ASİTLERİ SENTEZİNDE GÖREV ALAN BAZI ENZİM  
GENLERİNİN cDNA'LARININ ÜRETİLMESİ VE *IN SITU*  
HİBRİDİZASYONU İLE GEN EKSPRESYON ANALİZİ**

Melda ŞİŞECİOĞLU

KİMYA ANABİLİM DALI

ERZURUM

2010

Her hakkı saklıdır

Prof. Dr. Hasan ÖZDEMİR danışmanlığında, Melda ŞİŞECİOĞLU tarafından hazırlanan bu çalışma 23.06.2010 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Kimya Anabilim Dalı'nda Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan :Prof. Dr. Nuri BAKAN

İmza:

Üye :Prof. Dr. Hasan ÖZDEMİR

İmza:

Üye :Doç. Dr. Abdulkadir ÇOBAN

İmza:

Üye :Doç. Dr. Ahmet MAVİ

İmza:

Üye :Yrd. Doç. Dr. Halis ŞAKİROĞLU

İmza:

**Yukarıdaki sonucu onaylarım**

(imza)

Prof. Dr. Ömer AKBULUT

**Enstitü Müdürü**

## ÖZET

Doktora Tezi

FARE GENOMUNDA BULUNAN KOLESTEROL ve SAFRA ASİTLERİ  
SENTEZİNDE GÖREV ALAN BAZI ENZİM GENLERİNİN cDNA'LARININ  
ÜRETİLMESİ VE *İN SITU* HİBRİDİZASYONU İLE GEN EKSPRESYON ANALİZİ

Melda ŞİŞECİOĞLU

Atatürk Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Hasan ÖZDEMİR

Organizmalar çok sayıda gen ihtiva eder ve genlerin çoğunluğu düzenleyici proseslerde görev alan proteinleri şifrelemektedir. Gen ekspresyonunun yüksek çözünürlükteki analizi moleküler düzeyde metabolik yolların anlaşılması ve genlerin biyolojik prosesleri nasıl düzenledikleri hakkında önemli bilgiler sağlar. Gen ekspresyonunu belirlemede kullanılan pek çok metot olmakla birlikte mRNA düzeyinde uygulanan ve güçlü bir teknik olan *in situ* hibridizasyon bu yöntemlerin en önemlilerinden birisidir.

Bu çalışmada kolesterol sentezinde görev alan Hmgcr, Pmvk, Mvd, Idi1, Ggps1, Fdps, Fdft1, Sqle, Lss, Dhcr24, Cyp51, Tm7sf2, Sc4mol, Nsdhl, Hsd17b7, Ebp, Sc5d, Dhcr7, Cyp27b1; safra asitleri sentezinde görev alan Cel, Lip1, Soat2, Cyp7a1, Srd5a2, Cyp27a1, Adh1, Adh7, Adh5, Aldh2, Aldh3a2, Aldh9a1, Aldh1b1, Slc27a5, Hadhb, Acaa1b enzim genleri için spesifik primerler dizayn edildi. Bu primerler kullanılarak spesifik cDNA kalıpları hazırlandı. Daha sonra bu cDNA kalıpları ile antisens mRNA'lar (*In vitro* transkripsiyon) üretildi. Üretilen antisens mRNA'lar kullanılarak 14,5 günlük fare embriyo dokularında *in situ* hibridizasyon yapıldı ve bu enzim genlerinin ekspresyona uğradıkları dokular belirlendi. Ekspresyon sonuçları mikroskopta incelenerek internet ortamına (www.genepaint.org) aktarıldı.

**2010, 121 sayfa**

**Anahtar Kelimeler:** *In situ* hibridizasyon, mRNA, cDNA, gen ekspresyonu

## ABSTRACT

Ph.D. Thesis

cDNA'S PRODUCTION OF CHOLESTEROL and BILE ACID SYNTHESIS GENES  
ENCODING ENZYMES IN MOUSE GENOME AND ANALYSIS OF GENES  
EXPRESSION BY *IN SITU* HYBRIDIZATION

Melda ŞİŞECİOĞLU

Atatürk University  
Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Department of Chemistry

Supervisor: Prof. Dr. Hasan ÖZDEMİR

Organisms contain in large quantities gene and most of these genes encode proteins that have function in regulatory processes. High-resolution analysis of gene expression provides important information about how genes regulate biological processes and understanding of metabolic pathways at molecular level. Investigation of expression genes has been developed quite a few techniques. In addition, *in situ* hybridization (ISH) that is a powerful method is one of the important methods for gene expression.

In this study, specific primers were arranged for genes of enzymes that have function in cholesterol synthesis (Hmgcr, Pmvk, Mvd, Idi1, Ggps1, Fdps, Fdft1, Sqle, Lss, Dhcr24, Cyp51, Tm7sf2, Sc4mol, Nsdhl, Hsd17b7, Ebp, Sc5d, Dhcr7, Cyp27b1) and gene of enzymes that have function in bile acid synthesis (Cel, Lip1, Soat2, Cyp7a1, Srd5a2, Cyp27a1, Adh1, Adh7, Adh5, Aldh2, Aldh3a2, Aldh9a1, Aldh1b1, Slc27a5, Hadhb, Acaa1b). Specific cDNA templates were prepared with these specific primers. Then antisense mRNAs (*in vitro* transcription) was produced with specific cDNA templates. *In situ* hybridization in which was used carried out antisense mRNAs tissue of mouse embryo (14.5 days) was made and tissue was determined which these enzyme genes were expressed. Automated microscopic scanning of gene expression data was investigated and these results were transferred in internet ([www.genepaint.org](http://www.genepaint.org)).

**2010, 121 pages**

**Keywords:** *In situ* hybridization, mRNA, cDNA, gene expression

## TEŞEKKÜR

Doktora çalışması olarak sunduğum bu çalışma TBAG-2223 (106T175) nolu TÜBİTAK ve 2006/34 nolu BAP projelerinin bir parçasıdır. Çalışmanın deneysel kısmı, Atatürk Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyokimya Araştırma Laboratuvarı ve Max-Planck Enstitüsü Gen ve Davranışı Bölümünde (Göttingen) gerçekleştirilmiştir.

Çalışmalarımın esnasında her türlü desteği sağlayan, bilgi ve birikimlerinden faydalandığım çok değerli hocam Sayın Prof.Dr. Ö.İrfan KÜFREVİOĞLU'na, Sayın Prof.Dr. Gregor EICHELE'ye, danışmanım Sayın Prof.Dr. Hasan ÖZDEMİR'e ve Sayın Prof.Dr. Mehmet ÇİFTÇİ'ye derin minnet ve şükranlarımı sunarım.

Çalışmalarıma büyük yardım ve ilgilerinden dolayı Atatürk Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü Başkanlığına ve Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyeleri, Sayın Doç.Dr. İlhami GÜLÇİN'e ve Sayın Doç.Dr. Şükrü BEYDEMİR'e, Sayın Yrd.Doç.Dr. Deniz EKİNCİ, Sayın Yrd.Doç.Dr. Murat ŞENTÜRK, Sayın Arş.Gör. Esra DİLEK'e çalışmalarımın bir kısmını Almanya'da gerçekleştiren Sayın Yrd.Doç.Dr. Murat ÇANKAYA'ya ve Sayın Harun BUDAK'a teşekkür ederim. Ayrıca çalışmalarım esnasında değerli katkılarından dolayı Max-Planck Enstitüsü Gen ve Davranışı Bölümü (Göttingen) çalışanlarına, tüm Kimya Bölümü elemanlarına ve Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne ve elemanlarına teşekkür ederim.

Çalışmalarımın her aşamasında maddi-manevi yardım ve desteklerinin yanı sıra göstermiş oldukları sabır ve anlayıştan dolayı ailemin bütün fertlerine sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Melda ŞİŞECİOĞLU

Mayıs 2010

## İÇİNDEKİLER

ÖZET .....	i
ABSTRACT .....	ii
TEŞEKKÜR .....	iii
SİMGELER DİZİNİ .....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	xi
<b>1. GİRİŞ</b> .....	1
1.1. Gen Ekspresyonu .....	1
1.2. Gen Ekspresyonunun Denetimi ve Düzenlenmesi .....	2
1.3. Gen Ekspresyon Analizi .....	12
1.4. Kolesterol Sentezi .....	14
1.4.1. Kolesterol sentezinin düzenlenmesi .....	24
1.5. Safra Asitleri Sentezi .....	25
1.5.1 Safra asitleri sentezinin düzenlenmesi .....	27
<b>2. KAYNAK ÖZETLERİ</b> .....	28
<b>3. MATERYAL ve YÖNTEM</b> .....	46
3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler .....	46
3.2. Yararlanılan Alet ve Cihazlar .....	48
3.3. Kullanılan Çözeltiler .....	49
3.4. Kolesterol ve Safra Asitleri Sentezi için Gen Seçimi .....	52
3.5. Spesifik Genler İçin İnternet Kullanılarak Primer Dizaynı .....	55
3.5.1. cDNA probu yapılacak gen sekansına ulaşılması .....	55
3.5.2. cDNA probu yapılacak gen sekansının blastlanması .....	57
3.5.3. cDNA probu için primer dizaynı .....	61
3.6. RNA-İzolasyonu .....	67
3.7. cDNA Kütüphanesi Hazırlanması (RT PCR) .....	68
3.8. Spesifik Genler İçin cDNA Proplarının Hazırlanması .....	69
3.9. Antisens mRNA Üretimi .....	71
3.10. <i>In Situ</i> Hibridizasyon (ISH) Yönteminin Uygulanması .....	73

3.11. Gen Ekspresyon Örneklerinin Değerlendirilmesi .....	80
<b>4. ARAŞTIRMA BULGULARI</b> .....	<b>82</b>
4.1. Spesifik Genler İçin cDNA Problarının Agaroz Elektroforez Sonuçları .....	86
4.2. <i>İn Situ</i> Hibridizasyon Sonuçları .....	87
<b>5.TARTIŞMA ve SONUÇ</b> .....	<b>100</b>
KAYNAKLAR.....	114
ÖZGEÇMİŞ .....	122



## SİMGELER DİZİNİ

ATP	Adenozin trifosfat
BCIP	5-bromo-4-kloro-3-indolilfosfat,4-toluidin tuzu
cAMP	Siklik adenozin monofosfat
cDNA	Komplementer DNA
dd	Didestile H <sub>2</sub> O
DDT	Ditiyotreitol
DEPC	Dietilpirokarbonat
DNA	Deoksiribonükleik asit
E.C.	Enzim komisyonu numarası
E.coli	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Etilen diamin tetra asetik asit
ER	Endoplazmik retikulum
HRE-	Hormon cevap elementi
ISH	<i>In situ</i> hibridizasyon
mRNA	Messenger RNA
NADPH	Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (redukte form)
NBT	Nitroblue tetrazolium klorür
PBS	Fosfat tamponu tuzu
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
PFA	Paraform aldehit
PK	Proteinaz K
RNA	Ribonükleik asit
RNAsin	RNAase inhibitörü
rRNA	Ribozomal RNA
RT-PCR	Revers transkriptaz PCR
TBE	Tris Borat EDTA tamponu
TE	Transkripsiyon elementleri
TF	Transkripsiyon faktörleri
Tris	Trihidroksimetil amino metan
tRNA	Transfer RNA

## ŞEKİLLER DİZİNİ

<b>Şekil 1.1.</b>	a) Ortamda laktozun bulunmadığı durumda represör proteinin operatör bölgeye bağlanarak yapısal genlerin şifrelenmesinin engellenmesi b) Ortamda laktozun bulunduğu durumda allolaktozun sentezlenmesi ve allolaktozun represör proteine bağlanıp operatör bölgeye bağlanmasının engellenmesi, yapısal genlerin şifrelenmesine sebep olması .....	5
<b>Şekil 1.2.</b>	a) Ortamda triptofan varlığında baskılanmanın gerçekleşmesi ve yapısal genlerin şifrelenmesinin engellenmesi b) Triptofanın bulunmadığı durumda bağlanmanın gerçekleşmeyip yapısal genlerin şifrelenmesi.....	6
<b>Şekil 1.3.</b>	a) Yüksek triptofan seviyesinde attenuasyonun gerçekleşmesi b) Düşük triptofan seviyesinde transkripsiyonun devam etmesi .....	7
<b>Şekil 1.4.</b>	Prokaryotik promotor bölgeler ve konsensus dizilişleri.....	8
<b>Şekil 1.5.</b>	Ökaryotik mRNA'nın sentezlenmesi ve modifikasyonu .....	11
<b>Şekil 1.6.</b>	İki molekül asetil-CoA'nın mevalonata dönüşümü .....	16
<b>Şekil 1.7.</b>	Mevalonattan farnesil pirofosfatın oluşması .....	17
<b>Şekil 1.8.</b>	İki molekül farnesil pirofosfatın skualene skualen sentaz enzimi katalizörlüğünde dönüşümü .....	18
<b>Şekil 1.9.</b>	Skualenden lanosterolün sentezi .....	20
<b>Şekil 1.10.</b>	Lanosterolün kolesterole dönüşümü .....	21
<b>Şekil 1.11.</b>	Kolikasit ve Kenodeoksikolikasitin sentezi .....	26
<b>Şekil 1.12.</b>	Gliko ve taurokolik asitin yapısı .....	27
<b>Şekil 3.1.</b>	Kolesterol sentezi ve ilişkili metabolik yollar.....	53
<b>Şekil 3.2.</b>	Safra asitleri sentezi ve ilişkili metabolik yollar .....	54
<b>Şekil 3.3.</b>	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/</a> web sayfası .....	55
<b>Şekil 3.4.</b>	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/</a> web sayfasından bulunan mus musculus lanosterol sentaz geni (Lss) için sorgu sonucu.....	56
<b>Şekil 3.5.</b>	Mus musculus lanosterol sentaz (Lss) geninin sekansının olduğu sayfanın üst tarafı.....	56
<b>Şekil 3.6.</b>	Mus musculus lanosterol sentaz (Lss) geninin sekansının olduğu sayfanın alt tarafı .....	57

<b>Şekil 3.7.</b> Blastlamanın yapıldığı web sayfasının girişi. “Nucleotide blast” tuşuna basılarak işlemin başlatılması .....	58
<b>Şekil 3.8.</b> Blastlamanın yapıldığı web sayfasının açılmış hali. İlgili yerlerin doldurulması ve “BLAST” tuşuna basılması .....	58
<b>Şekil 3.9.</b> Mus musculus lanosterol sentaz (Lss) geni için yapılan blastlama sonucunun üst tarafı.....	59
<b>Şekil 3.10.</b> Mus musculus lanosterol sentaz (Lss) geni için yapılan blastlama sonucunun alt tarafı .....	59
<b>Şekil 3.11.</b> Mus musculus lanosterol sentaz (Lss) geni için, diğer genlerle en az homolojinin olduğu ve baz sıralamasında 2000–3100 arasındaki bölgeden seçilen cDNA parçası .....	60
<b>Şekil 3.12.</b> Primer belirlemek için kullanılan site: Gen sekansının ilgili kutucuğa yapılandırılması. Genin kısa adı, istenilen cDNA boyutu, primer büyüklüğü vb. bilgilerin girilmesi.....	62
<b>Şekil 3.13.</b> Primer oluşturma programının bulduğu primerlerin baz sıralarının üst tarafı ve forward primerin seçilen kısmı.....	63
<b>Şekil 3.14.</b> Primer oluşturma programının bulduğu primerlerin baz sıralarının alt tarafı ve revers primerin seçilen kısmı .....	63
<b>Şekil 3.15.</b> Left (forward) primerin blastlama sonucunun üst tarafı .....	64
<b>Şekil 3.16.</b> Left (forward) primerin blastlama sonucunda ortaya çıkan ve ilgili primerlerle homolojisi olan genler. Query: Verilen primerin baz sırası, Sbjct: Homoloji gösteren genin ilgili bölgesi.....	64
<b>Şekil 3.17.</b> Right (revers) primerin blastlama sonucunun üst tarafı .....	65
<b>Şekil 3.18.</b> Right (revers) primerin blastlama sonucunda ortaya çıkan ve ilgili primerlerle homolojisi olan genler. Query: Verilen primerin baz sırası, Sbjct: Homoloji gösteren genin ilgili bölgesi .....	65
<b>Şekil 3.19.</b> cDNA’ dan üretilecek olan DNA parçası (cDNA probu) .....	66
<b>Şekil 3.20.</b> cDNA probu için yapılan blastlama sonucu.....	66
<b>Şekil 3.21.</b> 14,5 günlük fare embriyosundaki bazı organ ve yapıların yerlerinin gösterilmesi .....	74
<b>Şekil 3.22.</b> Tecan Genesis platformu; <i>in situ</i> hibridizasyon yapmaya uygun şekli (A) Genesis RSP 150 platformu, (B) İki özel kaptan oluşması.....	75

<b>Şekil 3.23.</b> Slaytların hazırlanma şekli .....	75
<b>Şekil 3.24.</b> (A): Slayt kaplama makinesi (B): Slaytları iclemede kullanılan mikroskop (C): Slaytların taramasının yapıldığı scanner cihazı .....	80
<b>Şekil 3.25.</b> Genepaint.org sorgu ve sonuç sayfası (A) Bölümlerin hazırlandığı kısım (B) Seçilen gen resmi programı kullanılarak büyütülüp, küçültülerek ilgililenilen kısmın incelenmesi (C-E) Yetişkin fare beynindeki bazı ekspresyon örnekleri .....	81
<b>Şekil 4.1.</b> Kolesterol sentezi için spesifik genler için yapılan cDNA problemlerine ait agaroz elektroforezi sonucu .....	86
<b>Şekil 4.2.</b> Safra asitleri sentezi için spesifik genler için yapılan cDNA problemlerine ait agaroz elektroforezi sonucu .....	87
<b>Şekil 4.3.</b> Sitokrom P450, 27. aile, b alt ailesi, polipeptid 1 (Cyp27b1) geninin 14,5 günlük fare embriyosu üzerinde farklı kesimlerde yapılan <i>in situ</i> hibridizasyon işlemlerinde elde edilen sonuçlar .....	88
<b>Şekil 4.4.</b> Mevalonat (difosfo) dekarboksilaz (Mvd) geninin 14,5 günlük fare embriyosu üzerinde farklı kesimlerde yapılan <i>in situ</i> hibridizasyon işlemlerinde elde edilen sonuçlar .....	89
<b>Şekil 4.5.</b> Farnesil difosfat farnesil transferaz1(Fdft1) geninin 14,5 günlük fare embriyosu üzerinde farklı kesimlerde yapılan <i>in situ</i> hibridizasyon işlemlerinde elde edilen sonuçlar .....	90
<b>Şekil 4.6.</b> Skualen epoksidaz (Sqle) geninin 14,5 günlük fare embriyosu üzerinde farklı kesimlerde yapılan <i>in situ</i> hibridizasyon işlemlerinde elde edilen sonuçlar .....	91
<b>Şekil 4.7.</b> 24-dehidrokolesterol redüktaz (Dhcr24) geninin 14,5 günlük fare embriyosu üzerinde farklı kesimlerde yapılan <i>in situ</i> hibridizasyon işlemlerinde elde edilen sonuçlar .....	92
<b>Şekil 4.8.</b> Sitokrom P450, 7. aile, alt birim a, polipeptid 1 (Cyp7a1) geninin 14,5 günlük fare embriyosu üzerinde farklı kesimlerde yapılan <i>in situ</i> hibridizasyon işlemlerinde elde edilen sonuçlar .....	93
<b>Şekil 4.9.</b> Asetil-koenzim A açıltransferaz 1B (Acaa1b) geninin 14,5 günlük fare embriyosu üzerinde farklı kesimlerde yapılan <i>in situ</i> hibridizasyon işlemlerinde elde edilen sonuçlar .....	94

- Şekil 4.10.** Hidroksiaçil-koenzim A dehidrogenaz/3-ketoaçil-koenzim A tiyolaz/enoil-koenzim A hidrotaz (üçfonksiyonlu protein), beta alt birimi (Hadhb) geninin 14,5 günlük fare embriyosu üzerinde farklı kesimlerde yapılan *in situ* hibridizasyon işlemlerinde elde edilen sonuçlar..... 95
- Şekil 4.11.** Aldehit dehidrogenaz 9, alt birim A1 (Aldh9a1) geninin 14,5 günlük fare embriyosu üzerinde farklı kesimlerde yapılan *in situ* hibridizasyon işlemlerinde elde edilen sonuçlar ..... 96
- Şekil 4.12.** Alkol dehidrogenaz 7 (IV. sınıf), sigma polipeptid (Adh7) geninin 14,5 günlük fare embriyosu üzerinde farklı kesimlerde yapılan *in situ* hibridizasyon işlemlerinde elde edilen sonuçlar ..... 97

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Kolesterol sentezi genleri.....	29
Çizelge 2.2. Safra asitleri sentezi genleri .....	36
Çizelge 3.1. Kullanılan kimyasal maddeler .....	46
Çizelge 3.2. Belirli bir cDNA için yapılan PCR reaksiyon karışımı .....	71
Çizelge 3.3. Antisens mRNA üretimi için ependorf tüpüne yapılan pipetlemeler .....	72
Çizelge 3.4. DNase karışımının hazırlanması .....	72
Çizelge 3.5. <i>In situ</i> hibridizasyon işlemlerinin basamaklar halinde gösterilmesi .....	76
Çizelge 4.1. Kolesterol sentezi genleri için primer dizaynı sonuçlarına ait bilgiler .....	83
Çizelge 4.2. Safra asitleri sentezi genleri için primer dizaynı sonuçlarına ait bilgiler ..	85
Çizelge4.3. Kolesterol sentezi genleri için 14,5 günlük fare embriyosu dönemindeki ekspresyon yorumları ve ekspresyon çalışmaları sonucu <a href="http://www.genepaint.org/">http://www.genepaint.org/</a> web sayfasına aktarılan gen ekspresyon fotoğraflarına ulaşmak için kod numaraları.....	98
Çizelge 4.4. Safra asitleri sentezi genleri için 14,5 günlük fare embriyosu dönemindeki ekspresyon yorumları ve ekspresyon çalışmaları sonucu <a href="http://www.genepaint.org/">http://www.genepaint.org/</a> web sayfasına aktarılan gen ekspresyon fotoğraflarına ulaşmak için kod numaraları.....	99

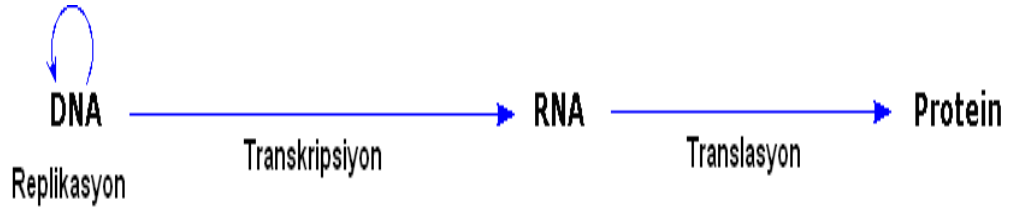
## 1. GİRİŞ

### 1.1. Gen Ekspresyonu

Nükleik asitler genetik bilginin depolanması ve ifade edilmesi için gereklidirler. Kimyasal olarak birbirinden farklı iki değişik nükleik asit vardır; deoksiribonükleik asit (DNA) ve ribonükleik asit (RNA). DNA ökaryotik hücre çekirdeklerinin kromozomlarında, mitokondrilerinde ve bitkilerin kloroplastlarında bulunur. Çekirdek içermeyen prokaryotik hücrelerde ise tek bir kromozom olup, plazmit adı verilen ekstra bir DNA da bulunmaktadır (Champe and Harvey 1994).

Hücre DNA'sı hücrenin yaşamsal işlevlerine yardımcı olabilecek genleri ve genler arası bölgeleri içermektedir. Her DNA molekülünde bulunan kalıtım birimlerine gen denir. Daha kavramsal bir yaklaşımda gen, kopyalanabilen, ifade edilebilen, mutasyona uğrayabilen ve bilgiyi depolayan bir birim olarak dikkate alınmaktadır. Moleküler anlamda gen; fonksiyonel bir ürün, ribozomal ribonükleik asit (rRNA), taşıyıcı ribonükleik asit (tRNA) ve polipeptid sentezini kodlayan DNA dizisi olarak tanımlanabilir. DNA'da fonksiyonel bir ürün oluşturan bu bölgelere gen adı verilir. Genlerin ürünleri hücrenin metabolik aktivitelerini yönetir. DNA, gen dizileriyle birlikte kromozomlar halinde düzenlenmiştir. Kromozomlar, genetik bilginin aktarılmasında araç olarak hizmet gören yapılardır. Ökaryotik hücreler genellikle birden fazla, çoğu bakteri ve virüsler ise bir tek kromozoma sahiptir. Bir tek kromozom binlerce gen taşıyabilir. Bir hücrenin tüm genleri ve intergen DNA (genler arasındaki DNA)'ları birlikte hücre genomunu oluşturmaktadır. DNA molekülünde şifrelenen genetik bilginin ifade edilmesi veya bu bilginin kullanılmasına gen ekspresyonu denir (Klug 2002; Nelson and Cox 2005).

Genetik bilginin ifadesi karmaşık bir işlemdir ve hücrede bilgi akışının temelini oluşturur. Normal hücrelerde genetik bilginin akışı şu şekilde olur ve bu olaya santral doğma denir.



## 1.2. Gen Ekspresyonunun Denetimi ve Düzenlenmesi

Hücrelerin her proteine, her an aynı oranda ihtiyacı bulunmaz. Hücrelerde bazı gen ürünleri çok büyük miktarlarda bulunurken, diğer gen ürünleri daha az miktarlarda bulunurlar. Bazı gen ürünlerine olan gereksinim zamanla değişebilir. Bazı metabolik yol enzimlerine gereksinim besin kaynakları değiştikçe ya da tükendikçe azalabilir ya da artabilir. Çok hücreli bir organizmanın gelişimi sırasında, hücrel farklılaşmayı etkileyen bazı proteinler, çok az hücrede yalnızca kısa bir süre bulunabilir. Hücre işlevinin özgülleşmesi, değişik gen ürünlerine olan gereksinimi çarpıcı şekilde etkileyebilir. Ayrıca konstitütif proteinler denilen bazı proteinler çevre şartlarından bağımsız olarak sürekli sentezlenirken bazı proteinler ise çevre şartlarındaki değişikliklere göre sentezlenir veya sentezleri baskılanır, bunlara da adaptif (indüklenebilen) proteinler denir. Protein sentezinin yüksek maliyeti nedeniyle, eldeki enerjinin en verimli şekilde kullanımı için gen ifadesinin düzenlenmesi gerekir. Bunun için, buralarda görev alan proteinlerin ve enzimlerin sentezlerinin baskılanması veya aktif hale getirilmesi önemlidir. Ökaryotik ve prokaryotik hücrelerde genetik şifrenin en son fonksiyonel ürünlerinden biri olan proteine dönüştürülmesi yani genetik ifadenin denetimi birçok basamakta gerçekleştirilmektedir. Özellikle ökaryotlarda denetim daha fazla safhalarda gerçekleştirilir. Bu safhalar; ilk RNA kopyasının sentezi (transkripsiyon), mRNA'nın sentez sonrası modifikasyonu, protein sentezi (Translasyon), mRNA'nın parçalanması, protein parçalanması, protein hedeflenmesi ve taşınması basamaklarını içerir. Ancak denetimin en önemli noktası DNA'dan RNA'nın



sentezlendiği transkripsiyon basamağının başlangıç safhasıdır (Küfrevioğlu 2003; Nelson and Cox 2005; Küfrevioğlu 2008).

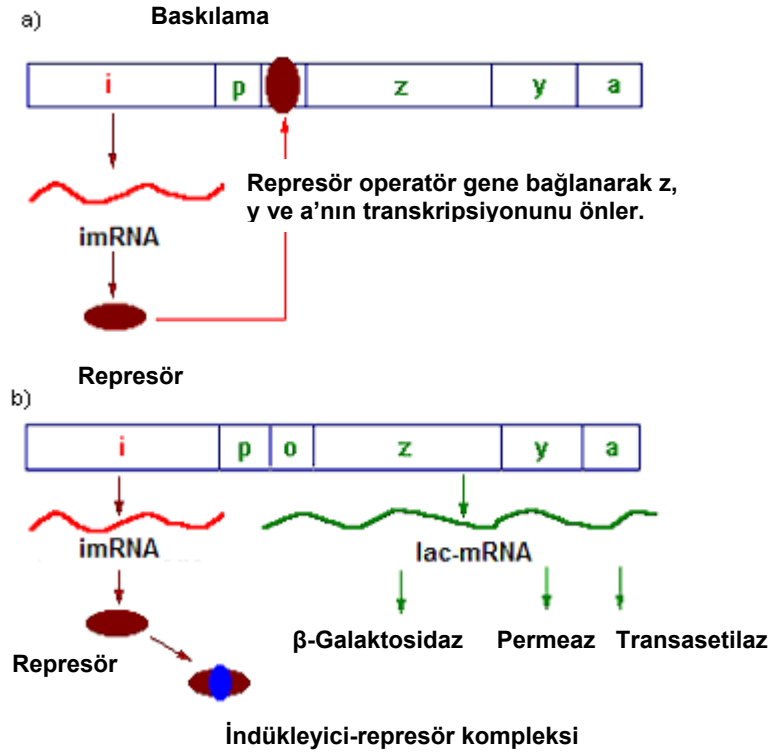
Prokaryotlarda transkripsiyonun düzenlenme mekanizması "operon" modeliyle açıklanırken; ökaryotlarda ve özellikle hayvan organizması gibi çok hücreli canlılarda aynı DNA'yı taşıyan farklı hücrelerin bulunması ve bu hücreler arasında koordinasyonu sağlayan çok sayıdaki sinyalizasyon sistemlerinin (hormonlar, nörotransmitterler, immün sistem ve sinir sistemi gibi) varlığı sebebiyle düzenlenme mekanizması çok daha karmaşık ve birçok faktörün rol aldığı bir olaydır (Küfrevioğlu 2003, 2008).

Prokaryotik hücreler birbiriyle bağlantılı proseslerde gerekli olan ürünleri kodlayan, ortak bir promotor bölge tarafından kontrol edilen bir grup genin ekspresyonunu düzenleyen basit ve genel bir mekanizmaya sahiptirler (Klug 2002; Nelson and Cox 2005).

Prokaryotlardaki genetik ifadenin düzenlenmesi mekanizmasının operon modeliyle açıklandığı yukarıda ifade edilmişti. Operonlar bakterilerde çok sayıda genlerin kümelandığı ve bu genlerin regülasyonunu da sağlayan dizilişleri taşıyan DNA bölgeleridir. Bakterilerde genetik ifadenin düzenlenmesi işte bu operon modelleriyle açıklanmaya çalışılmıştır ve yapısı aydınlatılan ilk operon modeli E. Coli'deki laktoz operon modelidir. E.Coli bakterisi karbon kaynağı olarak glukoz ve gliserolün yanı sıra laktozu da kullanabilir. Yapılan çalışmalarda ortamda laktozun bulunmadığı durumda laktoz metabolizmasından sorumlu olan genlerin aktivitesinin baskılandığı, laktoz bulunduğu durumda ise bu genlerin aktivitelerinin indüklendiği gözlenmiştir. Laktoz operonunda, lacZ adı verilen gen, laktozu glukoz ve galaktoza çeviren  $\beta$ -galaktozidaz enziminin amino asit dizisini belirler. Laktoz, glikolizde öncelikli enerji kaynağı olarak kullanılacaksa bu dönüşüm gereklidir. İkinci gen olan lacY, laktozun hücre içine alınmasını kolaylaştıran permeaz enzimini şifrelerken; üçüncü gen lacA, transasetilaz enzimini şifreler. Bu enzimin fizyolojik rolü açık olmamakla birlikte, hücrede laktozun sindirilmesiyle ortaya çıkan toksik yan ürünlerin uzaklaştırılmasından sorumlu olabileceği düşünölmektedir (Klug 2002).

E.coli'de bu enzimlerin fizyolojik indükleyicisi olarak laktozun transglukasyonu ile oluşan allolaktöz görev yapmaktadır. Bu bileşimin oluşumu indüksiyon öncesi hücrede mevcut olan az miktarda  $\beta$ -galaktozidaz molekülleri tarafından katalizlenmektedir. Yapılan çalışmalar izopropiltiyogalaktosid (IPTG) gibi metabolize olmayan bazı bileşiklerin de indükleyici olduğunu göstermiştir.

Söz konusu olan laktoz operonunun genetik elemanlarını bir regülatör (düzenleyici) gen, bir operatör gen ve bir seri yapısal genler oluşturmaktadır. “i” geni regülatör geni, “p” promotor bölgeyi (bu bölgeye RNA polimeraz bağlanır), “o” operatör geni, “z, y ve a” ise yapısal genleri temsil etmektedir. Regülatör gen, operatör genle etkileşebilen ve protein yapısında molekül olan bir represör meydana getirir. Operatör gen kontrol ettiği yapısal genlerin bitişğinde bulunur. Represör proteinin operatör gene bağlanması sonucu yapısal genlerin transkripsiyonu engellenir. Operatör gen ve beraberindeki yapısal genlere bir arada operon adı verilir. Ayrıca RNA polimerazın bağlanması içinde bir promotor bölgesi vardır. IPTG gibi indükleyici bileşikler represöre bağlanarak onun operatör genle etkileşmesini önler. Bu durumda da yapısal genler sözü edilen üç enzimi şifreleyen bir mRNA molekülüne çevrilir (Klug 2002; Keha ve Küfrevioğlu 2004).



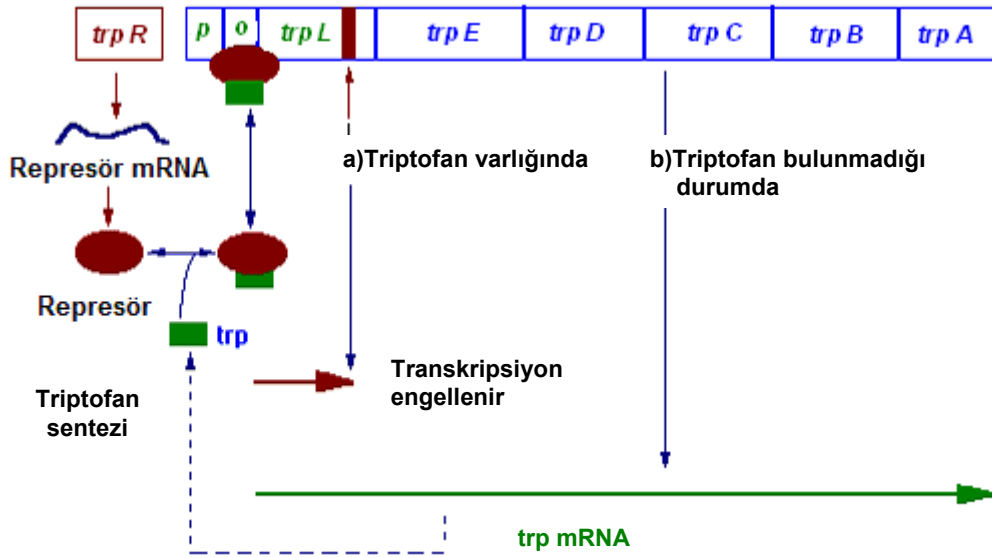
**Şekil 1.1.** a) Ortamda laktozun bulunmadığı durumda represör protein operatör bölgeye bağlanarak yapısal genlerin şifrelenmesini engeller. b) Ortamda laktozun bulunduğu durumda allolaktoz sentezlenir ve bu da represör proteine bağlanıp operatör bölgeye bağlanmayı engeller ve yapısal genlerin şifrelenmesine sebep olur.

E.Coli kendini laktoz yanında glukozun da bulunduğu bir ortamda bulursa, laktozu parçalayacak yapısal genlerin şifrelenmesi enerjinin rasyonel kullanımı açısından uygun değildir. Glukoz, adenilat siklaz enzimini inhibe ederek ATP'den memelilerde çok önemli düzenleyici rolleri olan cAMP oluşumunu engeller. Bunun sonucu olarak (katabolit aktive edici protein) CAP-cAMP kompleksi oluşmaz ve indüklemeye mekanizması çalışmaz. Ortamda glukoz yoksa adenilat siklaz enzimi inhibe olmaz, cAMP oluşur. cAMP "katabolit aktive edici proteine (CAP)" bağlanarak CAP-cAMP kompleksi oluşur. Oluşan bu kompleks bu proteinin laktoz operonunda spesifik bir diziliş bölgesine bağlanmasını ve sonuç olarak genin indüklenmesini sağlamaktadır (Küfrevioğlu 2008).

E. Colide yapısı aydınlatılan diğer bir operon modeli de translasyonel düzenlemeye örnek olan triptofan operon modelidir. Protein sentezi için triptofan gerektiğinde bu

amino asidin sentezinden görevli beş enzim aynı mRNA üzerinden sentezlenir. Kontrol mekanizması lac operonundan farklı şekilde gerçekleşir (Klug 2002; Küfrevioğlu 2003).

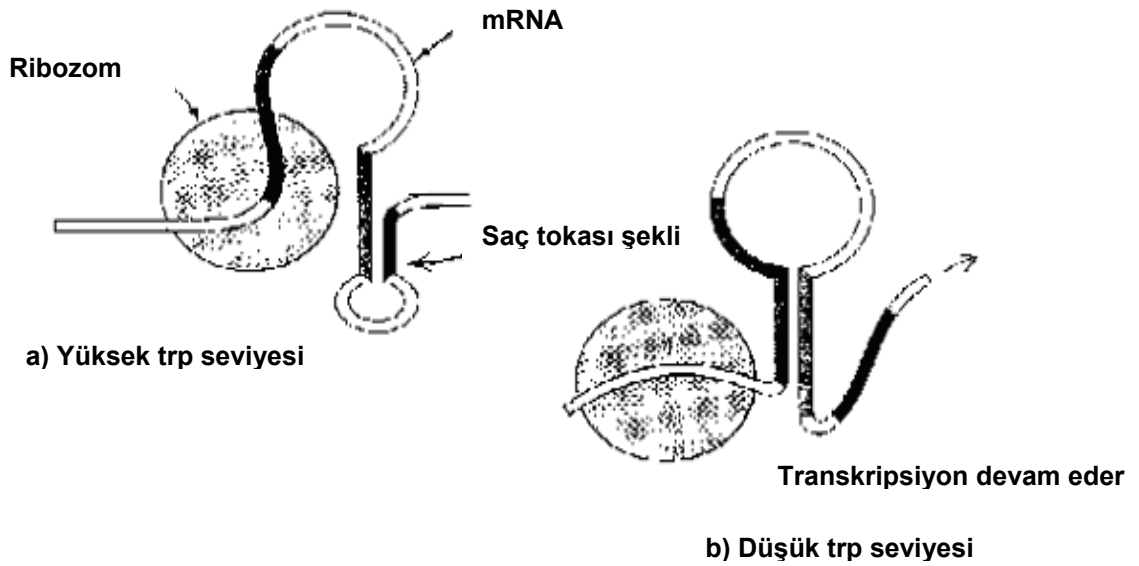
Baskılama; R geninden mRNA ve daha sonra represör protein sentezlenir. Ortamda triptofan varsa indükleyici olarak etki yapar ve represör proteine bağlanır. Bağlanma gerçekleştikten sonra represör proteinin konformasyonunda değişme meydana gelir. Böylece represör protein operatör bölgeye bağlanabilir hale gelir. Oluşan kompleksin bağlanması yapısal genlerin transkripsiyonunu engeller. Ortamda triptofan yoksa represör proteine bağlanıp konformasyonu değiştirecek triptofan olmadığından bağlanma gerçekleşmez. Represör protein operatör bölgeye bağlanamadığından yapısal genler şifrelenir ve triptofan sentezinden sorumlu beş enzim sentezlenir.



**Şekil 1.2.** a) Ortamda triptofan varlığında baskılama gerçekleşir ve yapısal genler şifrelenemez. b) Triptofan bulunmadığı durumda bağlanma gerçekleşemez ve yapısal genler şifrelenir.

Prokaryotlarda organel bulunmadığından transkripsiyon ve translasyon aynı anda gerçekleşir. Transkripsiyonun sonlanmadan translasyonun meydana geldiği de görülür. Attenuasyon transkripsiyonun translasyon ile kontrol edilmesinin bir sonucudur. Yüksek triptofan konsantrasyonunda translasyon sırasında triptofana karşılık gelen UGG kodonları hızlı bir şekilde geçilerek ilerlenir. Daha sonra stop kodonuna gelindiğinde protein sentezi durur ve mRNA saç tokası şeklini alır. Bu noktadan itibaren

transkripsiyon engellenir. Bu olaya attenuasyon denir. Lider diziden itibaren attenuasyon olana kadar 140 nükleotitlik mRNA sentezlendiği belirlenmiştir. Triptofan ortamda yoksa lider diziden itibaren transkripsiyon devam eder. UGG kodonlarına geldiğinde ortamda triptofan bulunmadığından ribozom duraklar. Bu nedenle mRNA saç tokası şeklini almaz ve yapısal genlerin transkripsiyonu gerçekleştirilir.



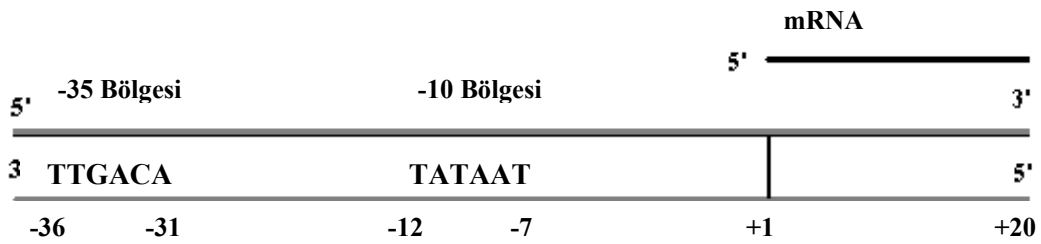
**Şekil 1.3.** a) Yüksek triptofan seviyesinde attenuasyon gerçekleşir. b) Düşük triptofan seviyesinde transkripsiyon devam eder.

Ökaryotlarda ise gen ifadesinin düzenlenmesi prokaryotlardan tamamen farklıdır. Ökaryotlar organel yapılarını barındırdıklarından transkripsiyon ve translasyon hücrenin farklı bölgelerinde olur. Ama bu iki olay aynı zamanda olmaz. Ökaryotik hücreler prokaryotik hücrelerden çok daha fazla genetik bilgi taşır. Ayrıca DNA ökaryotlarda histon proteinleri ile kompleksler oluşturarak kromatinler halinde bulunur. Kromatinin açık (transkripsiyona uygun) veya kapalı (uygun değil) yapıda olması gen regülasyonu için bir açma-kapama düğmesi rolünü üstlenir. Genlerin düzenlenmesinde prokaryotlar ile ökaryotlar arasındaki en önemli özelliklerden biriside ökaryotların ekzonlarla birlikte intronları da içermeleridir. Ökaryotik hücrenin bütün hücrelerinde aynı DNA olmasına rağmen her hücrede sadece o hücre için gerekli olan genler ihtiyaç duyulduğunda şifrelenir (Klug 2002; Keha ve Küfrevioğlu 2004; Lewin2004; Turner 2004; Küfrevioğlu 2005).

Ökaryotlarda gen ekspresyonunun denetimi ve düzenlenmesi değişik safhalarda kontrol edilir;

1. Transkripsiyon safhasında düzenlenme
2. Splicing safhasında düzenlenme
3. mRNA üzerinde modifikasyonla düzenlenme
4. Translasyon safhasında düzenlenme

1. Transkripsiyon safhasında düzenlenme; transkripsiyon, DNA kalıbı üzerinde “promotor” adı verilen spesifik bölgelerde başlar. Bu bölgeler prokaryotlarda yaklaşık olarak 40 baz çiftinden ibarettir. mRNA'nın sentezlenmeye başladığı bazdan 10 baz öncesinde yer alan altı bazdan ibaret bir sıra, RNA polimerazın  $\sigma$  alt birimi tarafından tanınmaktadır. Başlangıçtan 35 baz ötede yer alan ikinci bir tanınma bölgesi de vardır. Prokaryotik promotör bölgelerinde mutabık kılınan (consensus) baz dizilişleri yer almaktadır. Bu dizilişler -35 bölgesindeki TTGACA ve -10 bölgesindeki TATAAT (TATA kutusu) baz sıralarından oluşur. Burada, +1 kopyalanan ilk bazı; negatif sayılı bazlar +1'den önce gelen bazları (upstream bases); pozitif sayılı bazlar ise +1 ve sonra gelen bazları (downstream bases) ifade etmektedir.



**Şekil 1.4.** Prokaryotik promotör bölgeler ve konsensus dizilişleri

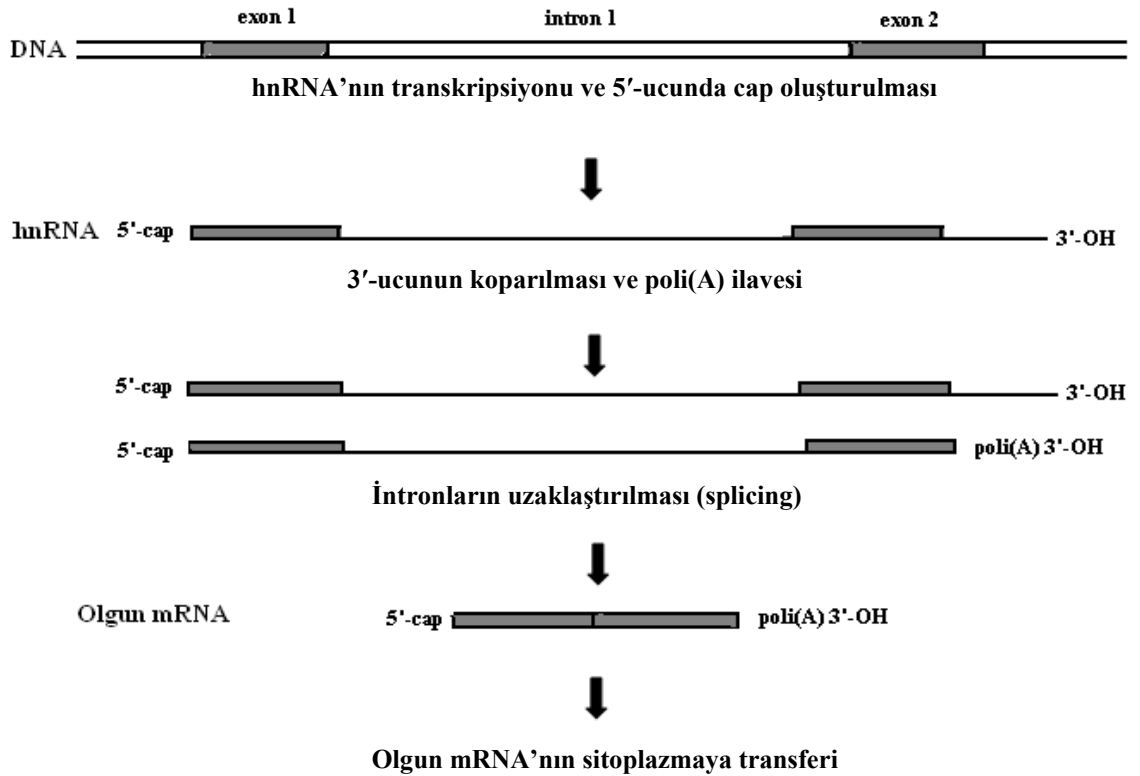
Ökaryotlarda her bir RNA polimeraz için farklı promotör bölgeler söz konusudur. 5,8S, 18S ve 28S rRNA'ları sentezleyen RNA pol I promotörlerinin tümü, prokaryotik promotörler gibidir. RNA pol III tarafından kopyalanan 5S rRNA ve tRNA genlerinin promotörleri ise bazen +8 ve +30, bazen de +50 ve +70 noktalarında, yani,

transkripsiyonu yapılan bazlar içinde yer almaktadır. Ancak, RNA pol II enziminin kopyalanan protein genlerinin daha çok sayıda ve farklı promotorları mevcuttur; 1- TATA kutusu, -25 ile -35 baz çiftleri arasında yer alır ve TATA(T/A)T dizilişindedir. Transkripsiyonun başlangıcını belirlemede öncelikli role sahiptir. 2- CAAT ve GC kutuları, -40 ile -100 baz çiftleri arasında bulunur ve CCAAT ve GGGCG dizilişindedir. Transkripsiyonun sıklığını belirler. Ökaryotik protein genlerinin transkripsiyonunun başlaması için önce TATA kutusuna bazı transkripsiyon faktörlerinin bağlanması (TFIID ve diğer 6 TFII'ler) ve ardından da RNA pol II'nin bunlarla kompleks meydana getirerek C-ucunun spesifik kinazlarca fosforillenmesi gerekmektedir. Transkripsiyon başlangıç kompleksinde en az 50 protein zinciri bulunmaktadır. Fosforilasyonu takiben DNA çift sarmalı açılarak transkripsiyon başlar. Bir gen yapısı, transkripsiyonunu düzenleyen "transkripsiyon elementlerini (TE)" de içinde bulundurur. Promotorlar, RNA polimerazları bağlayan ve transkripsiyonun başlangıç noktasını belirleyen; transkripsiyon elementleri ise, transkripsiyon faktörleri (TF) adı verilen çeşitli proteinleri bağlayarak transkripsiyon hızını düzenleyen DNA üzerindeki dizilişlerdir. TE'ler ökaryotik protein genlerinde +1 noktasından önce, mRNA kodlayan dizilişlerinden sonra ve hatta bu dizilişlerin içindeki intronlar da bile yer alabilir. Bazen TE, promotor bölgeden binlerce baz ötede bulunabilir ve daha başka genlerin kontrolünde de rol oynayabilir. TE'ler; bazı hormon ve sinyallere cevabı (HRE-hormone response element), transkripsiyonun hızlandırılmasının (enhancers) ve yavaşlatılıp, baskılanmasının (silencers, repressors) düzenlendiği DNA bölgeleri olarak sınıflandırılabilir. Bu bölgelere, hormon-reseptör komplekslerinin de aralarında bulunduğu, birbirinden farklı yapıda olan ve farklı şekillerde aktive edilen yüzlerce çeşit transkripsiyon faktörlerinden bir veya birkaçı bağlanarak, ökaryotik genetik ekspresyonu düzenler.

2. Splicing safhasında düzenlenme; ökaryotlarda primer kopyalar hemen mRNA olarak kullanılmaz. Nükleustan stoplazmaya geçmeden önce bazı modifikasyonlar geçirirler. Ökaryotlardaki primer transkript büyüklüğü 2.000 ile 20.000 baz arasında değişir ve bunlara heterojen nükleer RNA'lar (hnRNA) adı verilir. Bunlar kendilerinden türetilen mRNA'lardan birçok defa daha uzundur. Bu yapıların heterojenliği, baz dizilişlerinde,

protein amino asit sıralanışına aynen çevrilen bölgelerin (ekzonlar) yanısıra, protein yapısına kalıplık yapmayan ve splicing mekanizmasıyla uzaklaştırılan bölgelerin (intronlar) bulunmasından kaynaklanmaktadır. Ökaryotik mRNA'lar 5' uçlarında modifiye edilmiş nükleotid "cap"ler ihtiva ederler. 5'-cap'in ökaryotik protein sentezinin başlangıcında belirleyici bir rolü vardır. 3' uçlarında da 200 civarında adenin nükleotidinden ibaret poli A kuyrukları takılıdır. Uçlardaki söz konusu modifikasyonlar ökaryotik mRNA'ların ekzonükleazlara karşı daha dayanıklı olmasını sağladığından, bu moleküller prokaryotik mRNA'lara göre daha uzun ömürlüdür. hnRNA'ların yapılarındaki intronların uzaklaştırılmasına "splicing" denir. Bu olayda hem zincirin kesilmesi ve ardından da iki ucun birleştirilmesi gerçekleşir. "Splicing" fonksiyonu U1, U2, U4,U6 şeklinde gösterilen ve her biri 10 civarında proteinle oluşturdukları snRNP kompleksleri halinde iş gören 5 çeşit snRNA (küçük nükleer RNA) tarafından yerine getirilir. U1 snRNA nükleer mRNA intronunun 5' ucuna yakın sekansa komplementer bir sekansa sahiptir ve primer transkriptte bu bölgeye bağlanır. Daha sonra U2, U4, U5 ve U6 snRNP'lerin katılması spliceozom adı verilen bir kompleks oluşumuna neden olur ve bunun içinde gerçek splicing reaksiyonu meydana gelir. U2 snRNA'nın dallanma tarafında baz çiftleşmesi yapması çıkıntı oluşturur; adenozin çıkıntı yaparak intronun 5' ucuna saldırır ve 2,5'-fosfodiester bağı oluşturur. Daha sonra 5'-ekzonun 3' hidroksili bu basamakta daha sonra bir nükleofil olarak benzer reaksiyonla intronun 5'ucuna saldırır. Sonuçta intronun tam kesimi olur ve ekzonlar birleşir. Bir hnRNA üzerinde alternatif splicing'lerle farklı olgun mRNA'lar oluşturulabilmekte ve farklı proteinler üretilmektedir.





**Şekil 1.5.** Ökaryotik mRNA'nın sentezlenmesi ve modifikasyonu

3. mRNA üzerinde modifikasyonla düzenlenme; bazen aynı mRNA'nın farklı hücrelerde farklı baz modifikasyonu da farklı proteinleri ortaya çıkarabilmektedir. Mesela, şilomikronların yapısındaki apoB-48 ve VLDL yapısındaki apoB-100, sırasıyla bağırsak ve karaciğerde aynı mRNA'dan sentezlenmektedir. ApoB-48, apoB-100'ün amino ucundaki aminoasitleri aynen taşımakta olan ve 48kdal molekül ağırlığında bir proteindir. Yapılan araştırmalar, bağırsakta, bu proteinlerin mRNA'sındaki CAA kodonunun bir "sitidin deaminaz" enzimi tarafından UAA kodonuna, yani, glutamin kodonundan "stop" kodonuna dönüştürüldüğünü ve bunun sonucu olarak, DNA üzerinde aynı gen tarafından şifrelenen iki farklı uzunlukta proteinin karaciğer ve bağırsakta böyle bir mekanizma ile ortaya çıktığını göstermiştir.

4. Translasyon safhasında düzenlenme; bu düzenlemeye örnek olarak ‘‘hem’’ grubu eksikliğinde, retikülositlerde hemoglobin alt birimleri olan  $\alpha$  ve  $\beta$  alt birimleri sentezinin yavaşlatılması verilebilir. Bu durumda, eIF-2 özel bir kinaz tarafından fosforillenerek inaktif hale dönüştürülmekte ve protein sentezinin başlaması önlenmektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalar, translasyon safhasındaki kontrolün, protein sentezinin düzenlenmesinde çok büyük bir öneme sahip olduğunu ortaya koymuştur (Klug 2002; Küfrevioğlu 2008).

### 1.3. Gen Ekspresyon Analizi

Bir multiselüler organizmanın her bir hücresi bütün genetik bilgiyi içerse de belirli bir hücre veya dokuda genomun sadece belirli bir kısmı ekspresyona uğrar. Gen ekspresyonu gen arreyleri, RNase koruma ölçümleri, RNA *in situ* hibridizasyonu, Northern analizi ve protein seviyesinde yapılan Western blot ve immunohistokimya gibi metotları ihtiva eden çok farklı şekillerde belirlenebilir. Bir genin ekspresyona uğradığı yer, zaman ve miktarı; transkripsiyon ve translasyonun düzenlenmesine, mRNA ile protein transferine ve gen ürünlerinin yarılanma ömürlerine bağlıdır. Geniş bir genom skalası üzerinde ekspresyon haritalarını belirlemek amacıyla teknolojiler geliştirmek için çok gayretler sarf edilmektedir. Bunu belirlemek için kullanılan en yaygın metot mikroarraylerdir. Bu metotta DNA'ları temsil eden binlerce gen inert bir yüzey üzerinde noktalar halinde bulunur. Bu şekilde binlerce genin ekspresyon analizi aynı anda yapılabilir. Sıkça kullanılan mikroarrayler 2x2 cm boyutundadır ve yaklaşık 6000 tane DNA fragmenti ihtiva eder. Şimdiye kadar 15.000 insan geni için mikroarrayler oluşturulmuş ve kanserli hücrelerin tanısında kullanılabilmiştir (Küfrevioğlu 2003; Romualdi *et al.* 2003).

RNA *in situ* hibridizasyonu sistematik olarak 1980'lerin ortasından itibaren kullanılmaktadır. Bu metodun temel prensibi basittir; dokular veya dokuların bir kısmı, işaretlenmiş sentetik DNA veya işaretlenmiş antisens RNA problemleri ile muamele edilir. Doku içerisindeki mevcut sens mRNA, prob ile hibridizasyona uğrar; daha sonra otoradyografi veya immunohistokimya gibi belirleme reaksiyonları ile transkriptin doku

ve hücrel lokalizasyonu ortaya çıkarılır. RNA *in situ* hibridizasyonu, örnek yeterince küçükse bütün olarak (fare embriyosu gibi) veya örneğin belirli kısımlarında (fare beyni gibi) gerçekleştirilir (Küfrevioğlu 2003).

Antikorlar, doku örneklerinde proteinleri lokalize ve karakterize etmede kullanılmaktadır. Prensip olarak proteinlerin antikor lokalizasyonu, RNA *in situ* hibridizasyonuna tercih edilir; çünkü gen fonksiyonu mRNA'larda değil, proteinlerde ortaya çıkar. RNA ve proteinlerin lokalizasyonları, sekresyona uğrayan proteinlerde olduğu gibi, farklılık gösterebilir. RNA, gen ekspresyonu yapan hücre içinde bulunurken; protein, sentezlendiği kısımdan belirli bir mesafe uzaklıkta olan dokularda mevcut olabilir. Örnek olarak, peptid hormonları kanda mevcut olmasına karşılık, özelleştirilmiş endokrin bezlerinde sentezlenir. Protein dağılımı ve mRNA'ların böyle özel farklılıklarına ek olarak temporal (geçici) farklılıklar da vardır. Ritmik genler olan *mPer1* ve *mPer2*, 24 saatlik bir ritimle yüksek bir ekspresyonla bir periyodik harita içerisinde ekspresyona uğrarlar. Bu siklik ekspresyon, karşılık gelen proteinlerde de gözlenir; ancak protein pik ekspresyonu yaklaşık 6 saatlik bir fark ile mRNA'ya kıyasla gecikmelidir. Bu yüzden spatiotemporal (sürekli) mRNA ile protein ekspresyon haritaları arasında farklı durumlar bulunmaktadır ve mRNA'ya dayalı ekspresyon dataları yorumlandığında bu durum akılda tutulmalıdır. Buna karşılık, bir hücredeki özel bir transkriptin varlığı, karşılık gelen proteini sentezlemek için potansiyelin var olduğunun bilinmesi gerektiğini vurgulamak gerekir (Küfrevioğlu 2003).

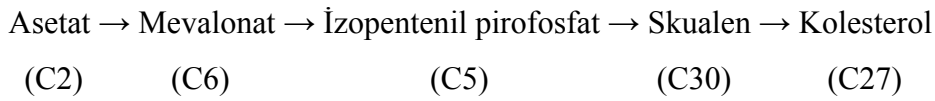
Antikorlarla çalışmak bize çok daha kesin bilgiler vermesine karşın çalışmalarda transkriptlerin kullanılması tercih edilir. Çünkü antikor oluşturmak zaman kaybına neden olduğu gibi oldukça pahalı bir yoldur. İmmünizasyon için doğru posttranslasyonel modifikasyonlu proteinlerin yanı sıra antiserum üretimi için hayvanlar kullanılmalıdır. Bununla birlikte kullanılan antikorlardan sadece biri immunohistokimyasal lokalizasyon için uygundur. Yani prosedür sonunda sadece bir tane proteinin lokalizasyonu belirlenebilir. Ancak RNA problemlerinin kullanımı daha kısa zamanda ve daha az maliyetle gerçekleştirilebilir (Klug 2002; Küfrevioğlu 2003).

Yeni bir proteinin biyokimyasal fonksiyonları ve hücre seviyesinde lokalizasyonu önceden çalışılmış proteinlerin homolojisinden yararlanılarak belirli oranda tahmin edilebilir. Fizyolojik seviyede protein ve genlerin fonksiyonlarını anlamak ise ekspresyon analizi, genetik manipulasyon ve hücreye dayalı denemeler gibi deneysel çalışmalara bağlıdır. *In situ* hibridizasyon (ISH) hücresel seviyede gen ekspresyon analizi için güçlü bir metottur. Otomatikleştirilmiş gen ekspresyon analizi ile çok fazla sayıda genin ekspresyonu belirlenebilir (Visel *et al.* 2004; Çankaya *et al.* 2007).

#### 1.4. Kolesterol Sentezi

Kolesterol, ökaryotik membranların yapısında bulunan ve membranın akışkanlık özelliğini düzenleyen bir bileşiktir. Aynı zamanda steroid hormonlarının, D-vitamininin ve safra asitlerinin türetildikleri başlangıç maddesidir. Kolesterol 27 karbonlu steroid yapısında bir bileşik olup, karbon atomlarının hepsi tek öncül olan asetattan sağlanır. İzopren birimleri asetattan kolesterole giden yolda anahtar ara ürünlerdir ve diğer birçok doğal lipidin öncülleridir ve tüm bu yollarda izopren birimlerinin polimerleşme mekanizmaları benzerdir.

Yapılan çalışmalar sonucunda kolesterol sentezinin ana hatlarıyla;

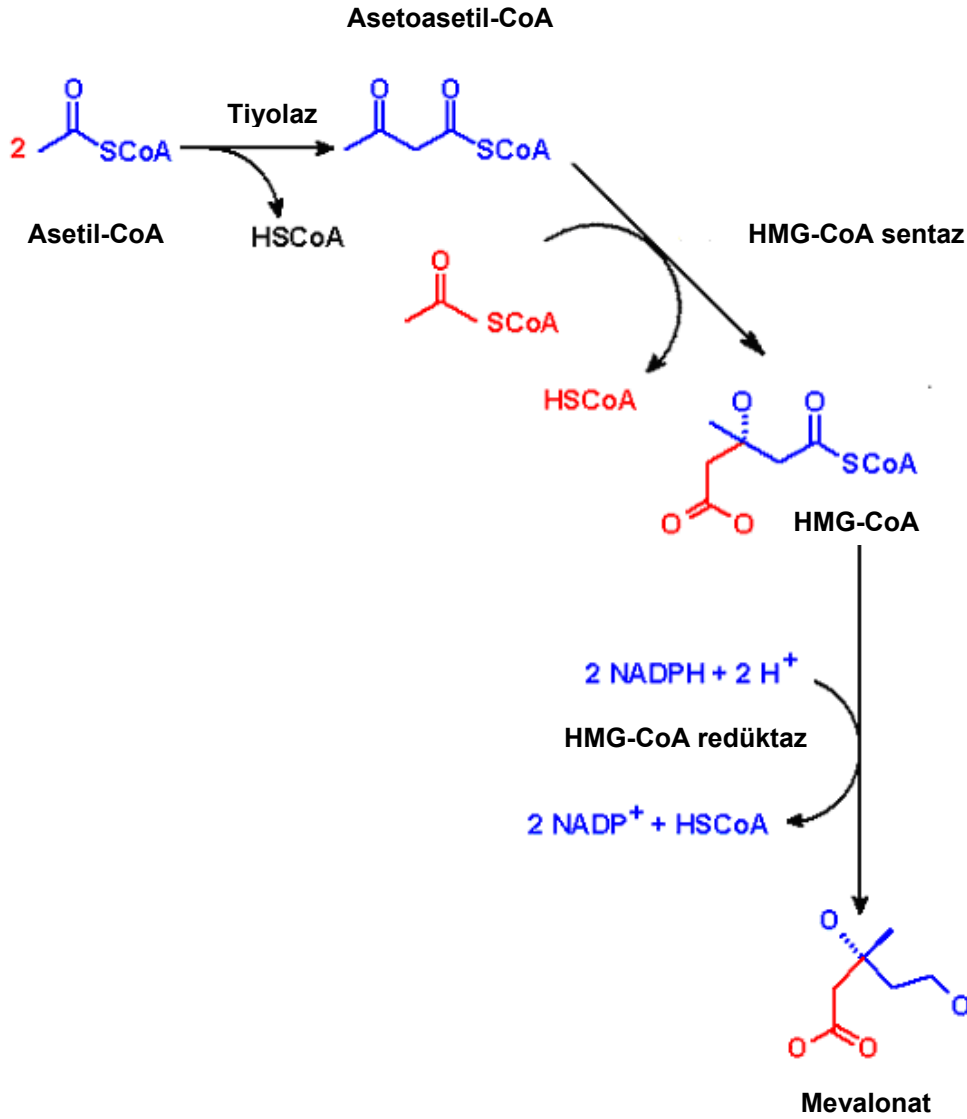


yolunu takip ettiği ortaya koyulmuştur (Keha ve Küfrevioğlu 2004; Nelson and Cox 2005).

Kolesterol uzun zincirli yağ asitleri gibi asetil-CoA'dan yapılır. Asetil-CoA molekülleri yağ asitlerinin oksidasyonundan, pirüvattan ve amino asitlerden sağlanır (Gümüştas 2008).

Kolesterol sentezi dört evrede gerçekleşir. Evre I'de, üç asetat birimi altı-karbonlu bir ara ürün olan mevalonatı oluşturmak üzere kondanse olur. Evre II mevalonatın aktif izopren birimlerine çevrilmesini içerir ve evre III 30 karbonlu doğrusal yapıda skualen oluşturmak için altı adet 5-karbonlu izopren biriminin polimerleşmesidir. Son olarak evre IV'te skualen halka yapısına geçerek steroid çekirdeğin dört halkası oluşur ve bir dizi daha değişiklik (oksidasyonlar, metil gruplarının uzaklaşması ya da yer değiştirmesi) son ürün olan kolesterolü oluşturur.

Kolesterol biyosentezindeki birinci evre mevalonat ara ürününü verir. İki molekül asetil-CoA kondanse olarak asetoasetil-CoA'yı oluşturur, bu da üçüncü bir asetil-CoA molekülüyle birleşerek altı karbonlu bir bileşik olan 3-hidroksi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA)'yı oluşturur. Sırasıyla, tiyolaz ve HMG-CoA sentaz tarafından katalizlenen bu ilk iki tepkime tersinirdir. Üçüncü tepkime kontrol altında tutulan basamaktır: iki molekül NADPH'in her birinin iki elektron vermesiyle HMG-CoA'nın HMG-CoA redüktaz tarafından mevalonata indirgenmesidir.

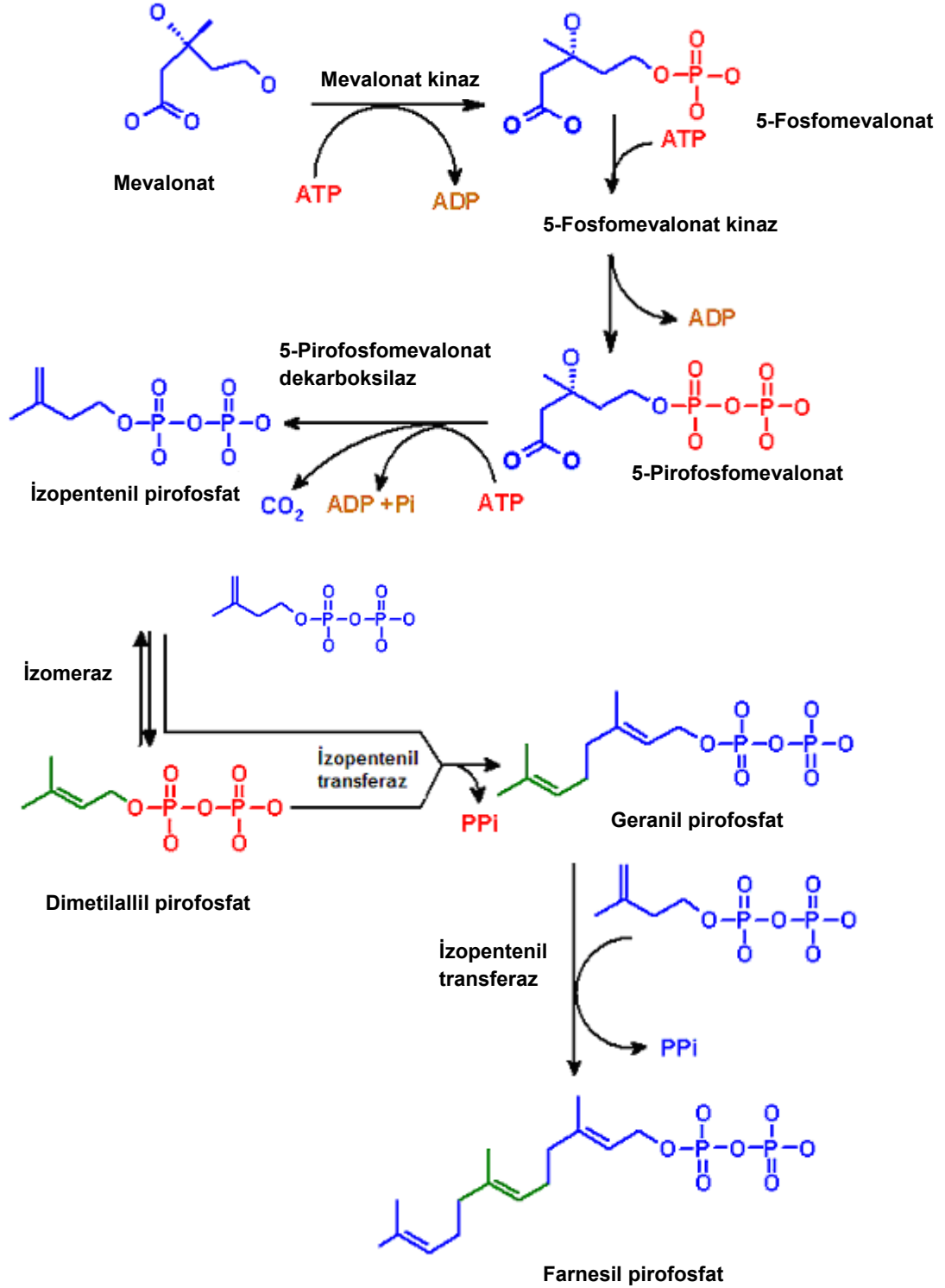


**Şekil 1.6.** İki molekül asetil-CoA'nın mevalonata dönüşümü

Kolesterol sentezinin sonraki evresinde üç ATP'den üç fosfat grubu mevalonata transfer edilir. 3-fosfo-5-pirofosfomevalonat ara ürünündeki mevalonatin C-3'ündeki hidroksil grubuna tutunan fosfat iyi ayrılabilen bir gruptur; sonraki kademede bu fosfat ve yanındaki hidroksil grubu, beş karbonlu bir ürün olan  $\Delta^3$ -izopentenilpirofosfatta bir çift bağ oluşturarak birlikte ayrılır. 3-izopentenil pirofosfatın izomerleşmesi ikinci aktif izopren olan dimetilallil pirofosfatı oluşturur.

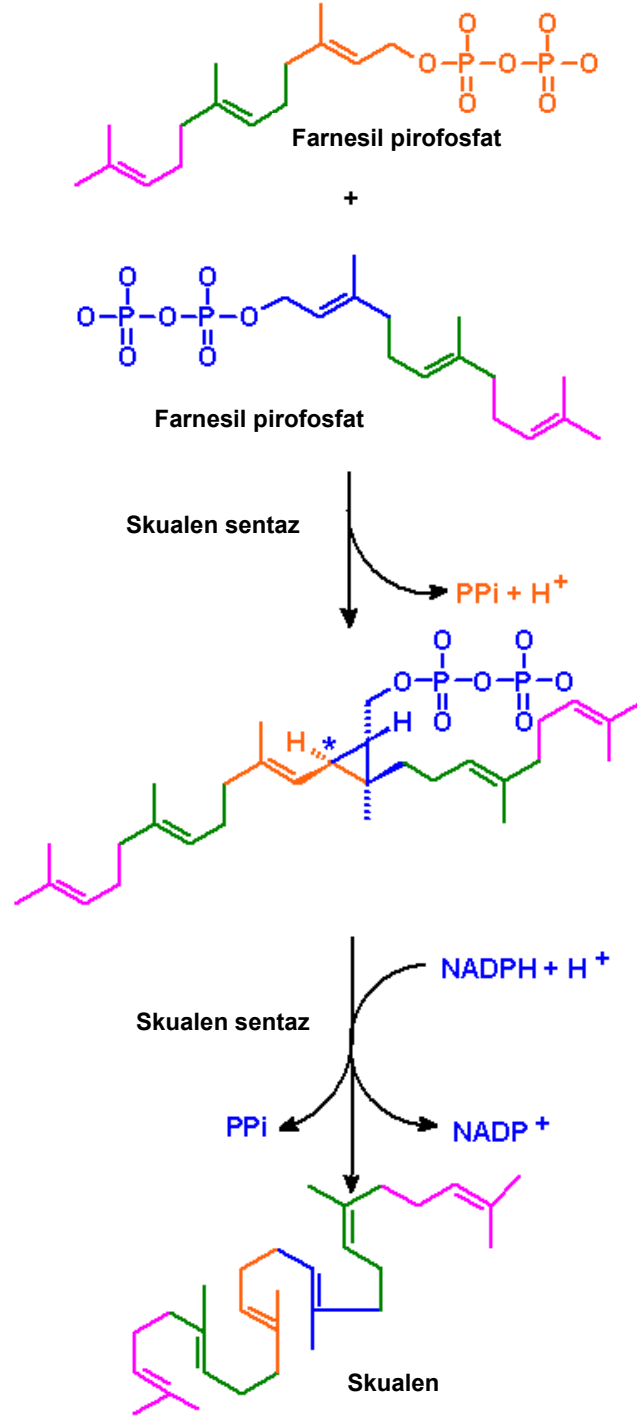
Üçüncü evrede izopentenil pirofosfat ve dimetilallil pirofosfat bir baş-kuyruk birleşmesine uğrar ve bir pirofosfat grubu yerinden ayrılır ve 10-C zincirli geranil

pirofosfat oluşur. Geranil pirofosfat izopentenil pirofosfatla diğer bir baş-kuyruk kondensleşmesine uğrar ve 15 karbonlu ara ürün olan farnesil pirofosfatı verir.



Şekil 1.7. Mevalonattan farnesil pirofosfatın oluşması

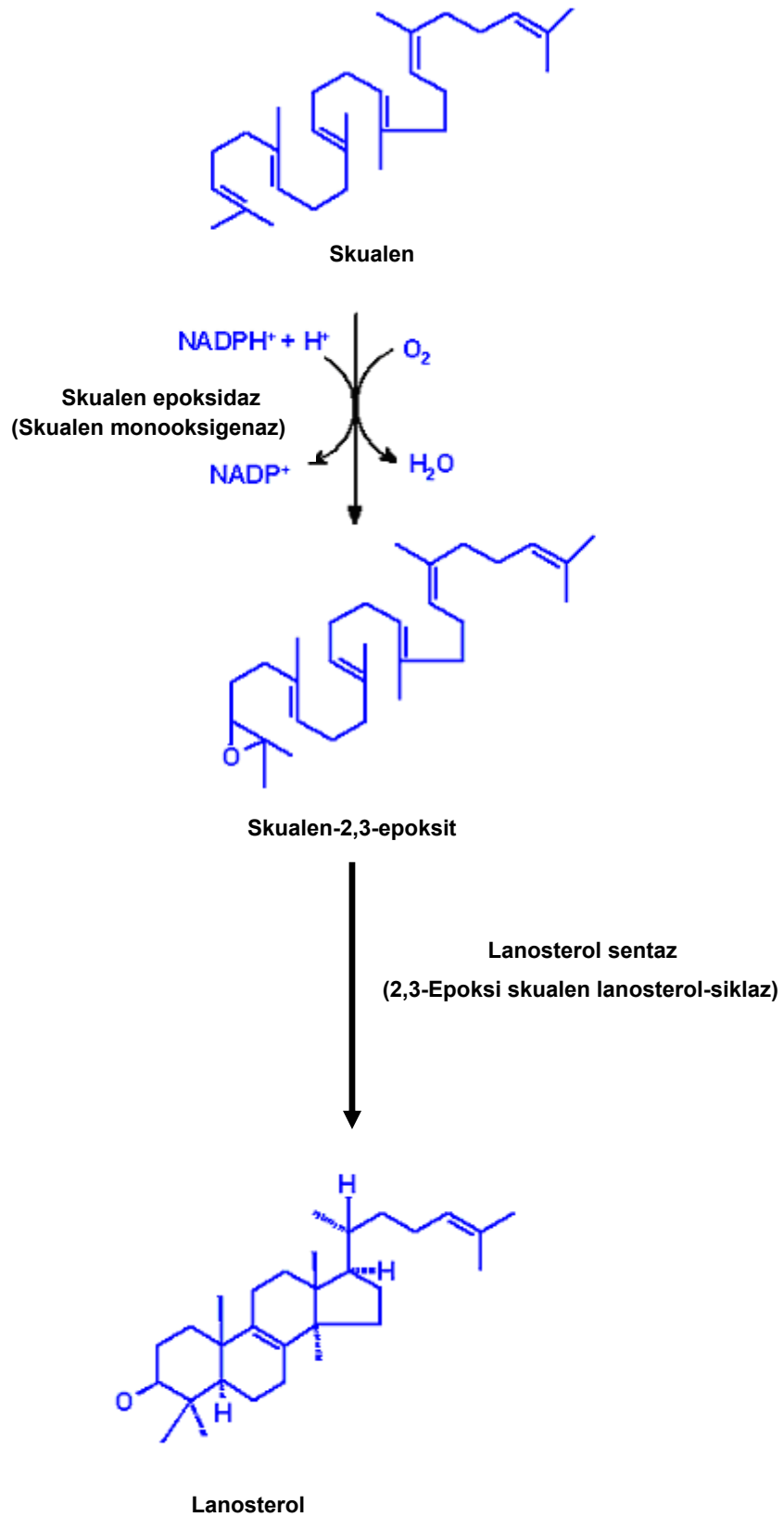
Son olarak iki molekül farnesil pirofosfat, bir pirofosfat uzaklaşmasıyla bağlanarak skualen oluşur.



**Şekil 1.8.** İki molekül farnesil pirofosfatın skualene skualen sentaz enzimi katalizörlüğünde dönüşümü

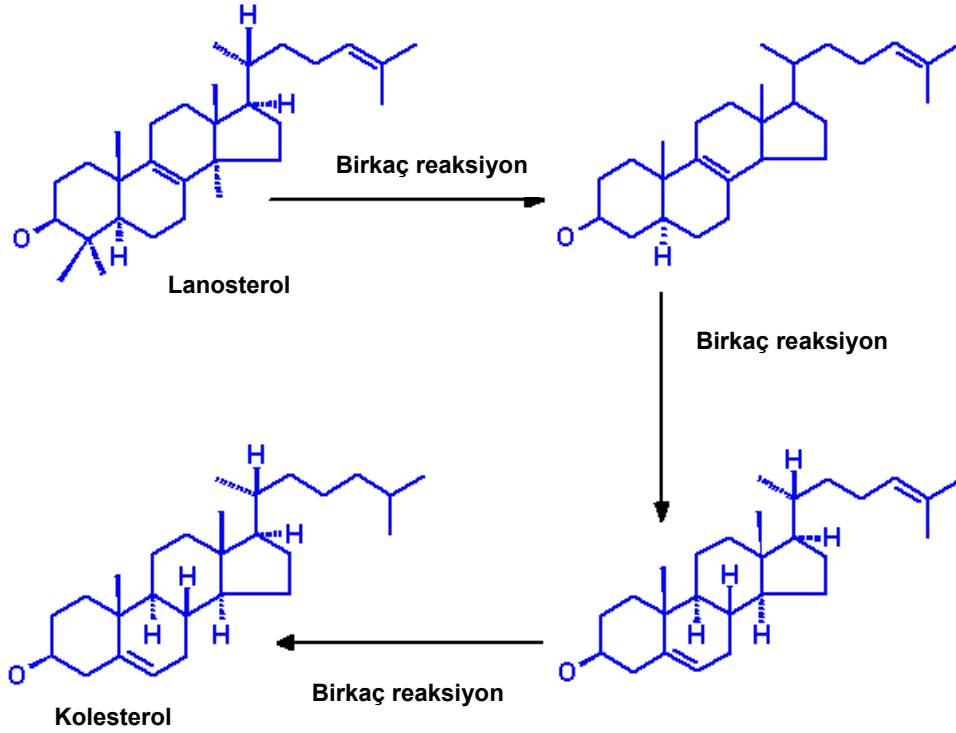


Dördüncü evrede skualenin dört halkalı steroid çekirdeğine çevrilmesidir. Skualen monooksijenazın etkisi  $O_2$ 'den bir oksijen atomunu bir epoksit oluşturmak üzere skualen zincirinin ucuna eklemektir. Bu enzim diğer bir karışık işlevli oksidazdır; NADPH  $O_2$ 'nin diğer oksijen atomunu  $H_2O$ 'ya indirir. Skualen 2,3-epoksit ürününün çift bağları doğrusal skualen epoksidi halka yapısına çevirebilecek şekilde yönlendirilmiştir. Hayvan hücrelerinde bu halkalaşma steroid çekirdeğin dört karakteristik halkasını taşıyan lanosterolün oluşmasıyla sonuçlanır.



Şekil 1.9. Skualenden lanosterolün sentezi

Sonuç olarak lanosterol, bazı metil gruplarının yer değiştirmesine ve bazılarının ayrılmasını içeren 20 civarında tepkimeyle kolesterole çevrilir.



**şekil 1.10.** Lanosterolün kolesterole dönüşümü

Omurgalılarda kolesterol sentezi başta karaciğer (%80) olmak üzere, deri, adrenal korteks, beyin, ince bağırsaklar, testis gibi organlarda gerçekleşir. Karaciğerde yapılan kolesterolün küçük bir kısmı hepatositlerin zarına yerleşir, fakat büyük bir kısmı  formdan birinde uzaklaştırılır; bunlar safra kolesterolü, safra asitleri ve kolesterol esterleridir. Ayrıca kolesterol sentezinde ara ürün olarak oluşan izopentenil pirofosfattan A vitamini, E vitamini, K vitamini, karotenler, dolikoller ve elektron taşıyan kinonlar (ubikinon, plastokinon) sentezlenebilir (Nelson and Cox 2005; Gümüştaş 2008).

Kolesterol ve kolesterol esterleri, triaçilgliserol ve fosfolipitler gibi esas olarak suda znmez. Bununla birlikte, bu lipitler yapıldıkları dokulardan kullanılacakları ya da depolanacakları dokulara taşınmalıdır. Bunlar, apolipoprotein adı verilen özgül taşıyıcı

proteinlerin triaçilgliserol, fosfolipitler, kolesterol ve kolesterol esterlerinin çeşitli bileşimleriyle oluşan makromolekül kompleksleri olan plazma lipoproteinleri şeklinde bir dokudan diğerine kan plazmasında taşınır. Bu lipoproteinler şilomikronlar, çok düşük dansiteli lipoproteinler (VLDL), düşük dansiteli lipoproteinler (LDL) ve yüksek dansiteli lipoproteinler (HDL)'dir.

Bağırsak mukoza hücreleri ER lümeninde, yağ asitlerinin aktifleşmesi ve tekrar esterleşme reaksiyonları ile triaçilgliseroller ve kolesterol esterleri sentezlenir. Bu nötral lipidler çok hidrofobik oldukları için protein, fosfolipid ve serbest kolesterolün oluşturduğu ince bir polar lipid tabakası içinde toplanmış bir yapı oluşturur. Bu yapıya şilomikron adı verilir. Yüksek oranda triaçilgliserol taşıyan, dansitesi en az ve en büyük lipoprotein olan şilomikronlar, bağırsak mukoza hücrelerinde üretilir ve besinsel triaçilgliserol, kolesterol ve kolesterol esterlerini (ayrıca bu hücrelerde yapılan ilave lipidleri) periferik dokulara taşırlar. Şilomikronlardaki triaçilgliserollerin periferik dokulardaki lipoprotein lipazlar tarafından birkaç dakika içinde hidrolizlenmesi sonucu geride kalan kolesterolce zengin şilomikron kalıntıları karaciğer tarafından alınır. Yani diyetle alınan eksojen kolesterolün tamamına yakını karaciğere taşınmış olur.

Çok düşük dansiteli lipoproteinler (VLDL), vücutta (büyük ölçüde karaciğerde) sentezlenmiş olan triaçilgliserollerini adipoz dokuya ve iskelet kaslarına taşır. VLDL'ler triaçilgliserollere ek olarak, bazı kolesterol ve kolesterol esterlerinin yanı sıra apoB-100, apoC-I, apoC-II, apoC-III ve apoE'yi içerir. Bu apolipoproteinler, son derece hidrofobik lipidleri çözünebilir hale getirirken aynı zamanda lipoproteinlerin metabolizma ve fonksiyonlarını da düzenlerler.

VLDL'den lipoprotein lipazla triaçilgliserollerin uzaklaştırılması sonucu geriye kalan kısım (IDL-orta dansiteli lipoprotein) düşük dansiteli lipoproteinlere (LDL) dönüştürülür. Ana apolipoprotein olarak apoB-100 taşıyan, kolesterol ve kolesterol esterlerince çok zengin olan LDL'ler, apoB-100'ü tanıyan özgül plazma zarı reseptörlerine sahip olan karaciğer dışı dokulara kolesterol taşır. Bu reseptörler aynı zamanda kolesterol ve kolesterol esterlerinin alımına da aracılık eder.

Yüksek dansiteli lipoproteinler (HDL), karaciğerde sentezlenir ve ekzositoz ile kana salınırlar. HDL'nin görevleri apoC-II'nin dolaşımdaki bir deposu olmak, ekstrahepatik dokulardan serbest kolesterolü uzaklaştırmak ve esterleştirmek, kolesterol esterlerini VLDL ve LDL'ye yer değiştirme reaksiyonuyla (triacilgliserollerle değiştirerek) transfer etmek, kolesterol esterlerini karaciğere taşımaktır. HDL karaciğerde yıkılır ve kolesterol salınır. Apo C-II, HDL'den VLDL ve şilomikronlara transfer edilir. ApoC-II lipoprotein lipazın aktivatörüdür (Champe and Harvey 1994; Keha ve Küfrevioğlu 2004; Nelson and Cox 2005)

Kolesterol hücre içinde depolanırken veya taşınırken konjüge haline, yani, uzun zincirli yağ asitleriyle ester bağı yapmış şekle çevrilmelidir. Bu esterleşme iki enzim aracılığı ile yapılır.

1) Hücre içinde açıl CoA: Kolesterol açıl transferaz (ACAT)



2) HDL'nin periferel dokulardan topladığı kolesterole, yapısındaki fosfatidilkolinden (lezitin) açıl grubu aktaran ve yine HDL'nin bir bileşeni olan lezitin: Kolesterol açıl transferaz (LCAT)



(Keha ve Küfrevioğlu 2004).

### 1.4.1. Kolesterol sentezinin düzenlenmesi

Kolesterol sentezindeki hız belirleyici basamak HMG-CoA redüktaz enzimi tarafından 3-hidroksi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA) molekülünün mevalonata dönüştüğü basamaktır ve HMG-CoA redüktaz enzimi farklı metabolik kontrol türlerinin etkisine maruz kalır.

Gen ekspresyonunun sterole-bağımlı olarak düzenlenmesi; HMG-CoA redüktaz geninin ekspresyonu, redüktaz geninin yukarı kısmında bulunan DNA parçasındaki sterol düzenleyici elemente (SRE) bağlanan bir transkripsiyon faktörü (sterol düzenleyici elemente bağlanan protein-SREBP) tarafından kontrol edilir. SREBP başlangıçta endoplazmik retikulum membranı ile ilişkili durumdadır, proteolitik kesim neticesinde proteinin aktif formu serbestleşir ve çekirdeğe geçer. SREBP DNA'ya bağlandığında redüktaz geninin ekspresyonu artar. Kolesterol seviyesi düştüğünde SREBP aktivasyonu gerçekleşerek HMG-CoA redüktaz artar ve daha çok kolesterol sentezlenir. Tersine yüksek kolesterol seviyeleri transkripsiyon faktörünün aktivasyonunu engeller. Kolesterol içeriği HMG-CoA redüktaz protein ve mRNA stabilitesini de etkiler. Artan kolesterol seviyesi her ikisinin de stabilitesinin azalıp yıkımlarının artmasına sebep olur.

Sterolden bağımsız fosforilasyon/defosforilasyon; HMG-CoA redüktaz aktivitesi bir protein kinaz ve fosfoprotein fosfataz tarafından kovalent olarak kontrol edilir. Enzimin fosforillenmiş hali inaktiftir ve defosforile olduğunda aktif hale geçer.

Hormonal düzenleme; HMG-CoA redüktaz aktivitesi hormonal olarak kontrol edilir. İnsulin artışı HMG-CoA redüktaz gen ekspresyonunun artışını sağlar, glukagon ise tersine bir etki gösterir.

İlaçlar tarafından inhibisyon; HMG-CoA'nın yapısal analogları olan statin türü ilaçlar, örneğin simvastatin, lovastatin ve mevastatin HMG-CoA redüktaz'ın geri dönüşümlü ve

yarışmalı inhibitörleridir. Bu ilaçlar hiperkolesterolemili hastalarda plazma kolesterol düzeylerinin azaltmak için kullanılırlar.

Karaciğer HMG-CoA redüktazı, kolesterol sentezinin ara ürünü olan mevalonat tarafından geri beslemeli (feed-back) inhibe olma özelliğine sahiptir. Ayrıca diyetle alınan ve şilomikronlarla karaciğere gelen kolesterol, HMG-CoA redüktazı inhibe ederek kolesterol sentezini kısmen azaltır (Champe and Harvey 1994; Gümüştaş 2008).

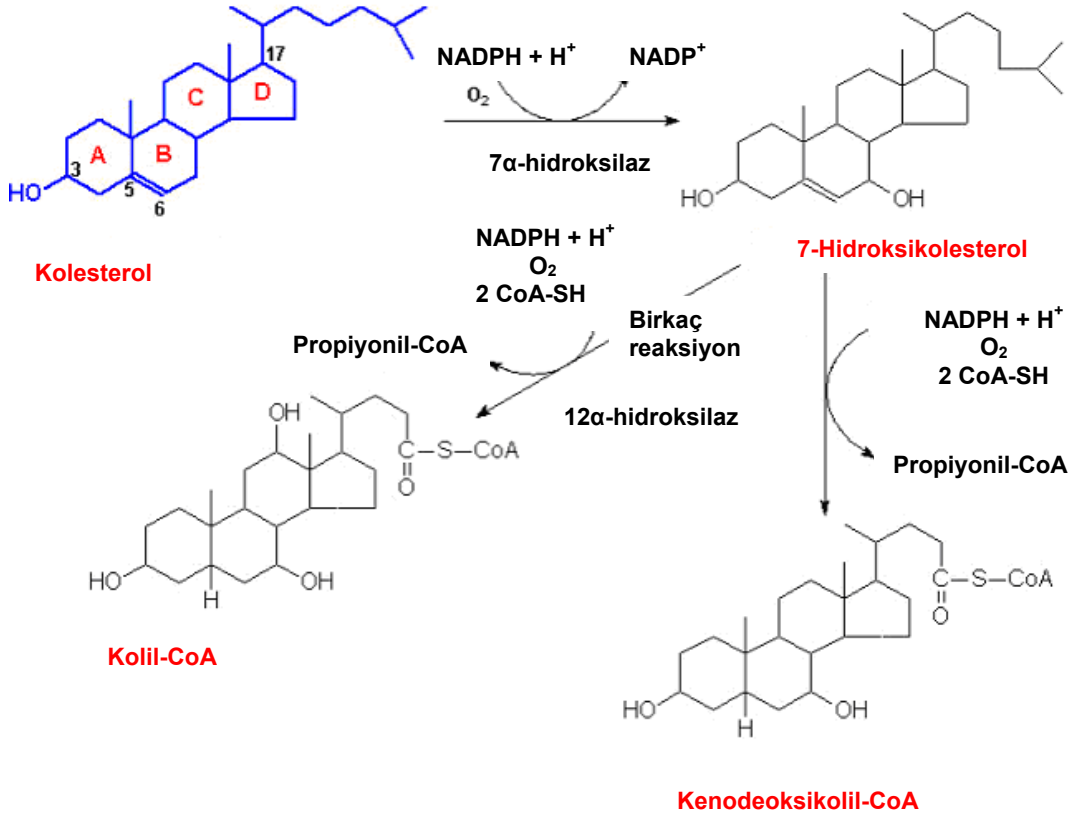
### **1.5. Safra Asitleri Sentezi**

Safra asitleri ve onların tuzları karaciğerde sentezlenen ve yağ sindirimine yardımcı olan amfipatik kolesterol türevleridir. Safra asitleri 24 karbon içerirler, ayrıca iki veya üç tane hidroksil grubu ve bir karboksil grubuyla sonlanan bir yan zincir bulunur. Safra asitleri amfipatiktirler. Tüm hidroksil grupları  $\alpha$  konumunda (halka düzleminin üstünde yer alır), metil grupları ise  $\beta$  konumundadır (halka düzleminin altında yer alır). Bu yüzden, moleküller hem polar hem de nonpolar bir yüzeye sahiptir ve bağırsakta emülsifiye edici ajanlar olarak işlev görebilir. Böylece, diyetle alınan triaçilgliserol ve diğer kompleks lipidlerin pankreasın sindirim enzimleri tarafından yıkılması için hazırlanmasına yardımcı olurlar (Champe and Harvey 1994; Nelson and Cox 2005).

Ayrıca safra asitleri, lipidlerin emilimi sırasındaki misel oluşumunda vazgeçilmez katkısından dolayı, yağların absorpsiyonunda da önemlidir ve vücuttan fazla kolesterolün uzaklaştırılma şeklidir. Bunun yanı sıra, safra kesesine atılmak üzere gelen kolesterolün çökerek taş oluşturmasını, lezitinle beraber, deterjan etkisiyle önlemesi safra asitlerinin fonksiyonlarından birisidir (Keha ve Küfrevioğlu 2004).

En bol bulunan safra asidi çeşitleri kolikasit ve kenodeoksikolikasittir. İki ayrı yoldan kolik asit ve kenodeoksikolik asit oluşur. Hız sınırlayıcı basamakta görev yapan ve mikrozomal bir enzim olan  $7\alpha$ -hidroksilaz için oksijen, NADPH, sitokrom P<sub>450</sub> ve C vitamini gereklidir. Daha sonra  $12\alpha$ -hidroksilazın katalizlediği tepkime ile kolik asit sentezlenir. Kolesterolün yan zincirinin uç kısmının oksitlenmesinden sonra aktif CoA

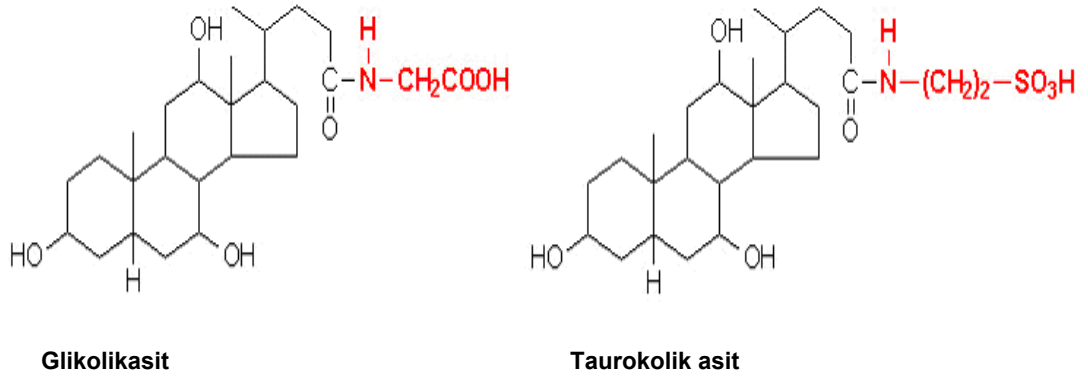
türevleri oluşur. Bu tepkimeyi sadece karaciğer mikrozomları içerisinde bulunan aktif bir enzim gerçekleştirmektedir. Bu arada üç karbon kaybı ile 27 karbonlu kolesterol, 24 karbonlu safra asitlerine dönüşür. Ayrıca  $\Delta^5$  çift bağı da doymuş hale gelir.



**Şekil 1.11.** Kolikasit ve Kenodeoksikolikasinin sentezi

Safra asitleri salgılanmadan önce karaciğerde glisin ve taurin ile konjüge edilerek gliko ve taurokolik asit veya gliko ve taurokenodeoksikolik aside çevrilirler. Konjügasyon sırasında 24. karbondaki CoA ayrılır ve yerini amid bağı ile bağlanmış glisin veya taurin alır. Böylece primer safra asitlerinin sentezi tamamlanır. Sentezlenen konjüge safra asitleri safra kanalları ile doğrudan duodenuma geçer veya gerektiğinde kullanılmak üzere safra kesesinde depo edilirler (Nelson and Cox 2005; Gümüştas 2008).





**Şekil 1.12.** Gliko ve taurokolk asitin yapısı

### 1.5.1. Safra asitleri sentezinin düzenlenmesi

Safra asitleri sentezi  $7\alpha$ -hidroksilasyon basamağında, enterohepatik dolaşımdaki safra asitleri konsantrasyonu ile düzenlenir. Kolesterol sentezini düzenleyen HMG-CoA redüktaz gibi  $7\alpha$ -hidroksilaz da kovalent fosforilasyon-defosforilasyon ile kontrol edilir.  $7\alpha$ -hidroksilazın fosforile formu enzimin aktif şeklidir. Ayrıca C vitamini eksikliği  $7\alpha$ -hidroksilasyon basamağında etkili olarak safra asitleri oluşumunu engeller (Nelson and Cox 2005; Gümüştaş 2008).

## 2. KAYNAK ÖZETLERİ

Gen ekspresyonu gen arreyleri, RNase koruma ölçümleri, RNA *in situ* hibridizasyonu, Northern blot analizi ve protein seviyesinde yapılan Western blot ve immunohistokimya gibi metotları ihtiva eden çok farklı şekillerde belirlenebilir. *In situ* hibridizasyon ve proteinlerin doku üzerinde nerelerde bulunduğu belirlenmesi; metabolizmanın nasıl çalıştığı ve nasıl bir düzenleme ile kontrol edildiğinin anlaşılabilmesi için her bir bileşenin ekspresyon zamanı ve yerinin bilinmesi biyolojik alanda oldukça faydalı bilgiler sağlar (Albrecht *et al.* 1998; Küfrevioğlu *et al.* 2003). Yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen veriler doğrultusunda oldukça deforme olmuş dokuların kayıtlarına, bilinen anatomik bölgeler ile hücrelerin ilişkisini gösteren verilere, genlerin lokalize ve yoğun oldukları bölgeleri gösteren ekspresyon sonuçlarına ulaşılabilir. Ayrıca elde edilen bilgiler ile yalnızca biyoloji alanının gelişmesine değil aynı zamanda kanser ve doku rejenerasyon çalışmalarına da katkıda bulunulması amaçlanmaktadır (Visel *et al.* 2004; Jagalur *et al.* 2007).

Kolesterol sentez yolunun incelenmesi; kolesterol ve diğer lipitlerin organlar arasında nasıl taşındığının, kolesterolün hücrelere giriş işleminin (reseptör-aracılı endositoz), diyet kolesterolü tarafından etkilenen hücre içi kolesterol üretimi yolunun ve kolesterol üretiminin düzenlenmesinin bozulmasıyla sağlığın nasıl etkilendiğinin anlaşılmasına yol açmıştır (Keha ve Küfrevioğlu 2004; Nelson and Cox 2005). Embriyonik gelişme döneminde kolesterol sentezi oldukça önemlidir. Kolesterol sentezindeki anormallikler fetal gelişimin ilk dönemlerinde dismorfik özellikler ve iskelet yapısında anormal dokuların meydana gelmesi konusunda belirleyici bir öneme sahiptir (Kovacs *et al.* 2002).

Karaciğer, beden sterol dengesinin düzenlenmesi ve sürdürülmesinde merkezi bir rol oynamaktadır. Kolesterolün karaciğerde safra asitlerine dönüştürülmesi ve feçes yoluyla uzaklaştırılması kolesterolün vücuttan atılmasının en önemli yoludur (Post *et al.* 2004). Safra asitleri küçük bağırsağa salgılanarak bağırsaklarda deterjan etkisi gösterip diyet

kolesterolün, lipitlerin ve yağda çözünen vitaminlerin absorpsiyonunda rol oynamaktadır (Tiemann *et al.*2004).

Farede kolesterol sentezinde 20 tane ve safra asitleri sentezinde de toplam 33 tane gen olduğu bulunmuştur (genome.jp). Bu tez kapsamında kolesterol sentezi genlerinin 19 tanesi, safra asitleri sentezi genlerinin ise 16 tanesinin ekspresyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Kolesterol ve safra asitleri sentezinde yer alan bu genler ile ilgili literatür çalışmaları aşağıda özetlemiştir.

### **Kolesterol Sentezinde Yer Alan Genler:**

**Çizelge 2.1.** Kolesterol sentezi genleri

1	Hmgcr	3-hidroksi-3-metilglutaril-koenzim A reduktaz
2	Pmvk	Fosfomevalonat kinaz
3	Mvd	Mevalonat(difosfo) dekarboksilaz
4	Idi1	İzopentenil -difosfat delta izomeraz
5	Ggps1	Geranilgeranil difosfat sentaz 1
6	Fdps	Farnesil difosfat sentaz
7	Fdft1	Farnesil difosfat farnesil transferaz 1
8	Sqle	Skualen epoksidaz
9	Lss	Lanosterol sentaz
10	Dhcr24	24-dehidrokolesterol redüktaz
11	Cyp51	Sitokrom P450, 51. aile
12	Tm7sf2	Transmembran 7, 2. aile üyesi
13	Sc4mol	Sterol-C4-metil oksidaz-like
14	Nsdhl	NAD(P) <sup>+</sup> bağlı steroid dehidrogenaz-like
15	Hsd17b7	Hidroksisteroid(17-beta) dehidrogenaz 7
16	Ebp	Fenilalkilamin Ca <sup>2+</sup> antagonist (emopamil) bağlanma proteini
17	Sc5d	Sterol-C5-desaturaz (fungal ERG3, delta-5-desaturaz) homolog
18	Dhcr7	7-dehidrokolesterol redüktaz
19	Cyp27b1	Sitokrom P450, 27. aile, b alt ailesi, polipeptid 1

3-hidroksi-3-metilglutaril-koenzim A redüktaz (Hmgcr; EC:1.1.1.34), granülsüz endoplazmik retikulum ve peroksizomlarda yer alan bir glikoprotein transmembran enzimidir. 3-hidroksi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA)'nın mevalonata dönüşümünü katalizleyen HMG-CoA redüktaz enzimi kolesterol sentezinde kontrol noktasındaki basamaktır (Kovacs *et al.* 2002; Ohashi *et al.* 2003a). Bu enzim memelilerde beyin, karaciğer ve testislerde farklı oranlarda bulunmaktadır (Belgacem and Martin 2007). Yapılan araştırmalar sonucunda elde edilen veriler Alzheimer hastalığının gelişiminde kolesterol metabolizmasının önemli bir etkisinin olduğunu göstermiştir. HMG-CoA redüktaz enzimi geninin düzenlenmesindeki anormallikler ile bu hastalığın oluşması ve ilerlemesi arasında bir ilişki olduğu görülmektedir (Refolo *et al.* 2001; Porcellini *et al.* 2007). Gelişim dönemi süresince fare beyin, karaciğer ve böbreğinde kantitatif mRNA düzeyleri RNase koruma ölçümü (RNase protection assay, RPA) yöntemi kullanılarak belirlenip HMG-CoA redüktaz enzim geninin ekspresyonu araştırılmıştır. Doğumdan önceki 5 günlük (-5), doğumdan sonra 5 günlük ve yetişkin fare beyin, karaciğer ve böbreğindeki ekspresyon seviyeleri karşılaştırılmıştır. Beyinde -5 ve 5 günlük dönemler arasında yetişkin fareye göre bu genin ekspresyonu daha kuvvetli olarak gözlenmiştir. Karaciğerde ise -5 günlük dönemde diğer dönemlere göre daha fazla ekspresyona uğradığı belirlenmiştir. Böbreklerde ise dönemler arasında çok önemli bir değişiklik gözlenmemiştir. HMG- CoA redüktaz enzim geninin doğum öncesi dönemde beyin ve karaciğerde daha fazla ekspresyona uğraması bu organlardaki hücrelerin ve dokuların çoğalması ve gelişmesinde kolesterolün önemli bir rolü olduğunu göstermektedir (Hanaka *et al.* 2000). mRNA *in situ* hibridizasyon yöntemiyle yapılan bir çalışmada Hmgcr geninin farede (E)10,5-14,5 günlük embriyonik gelişme dönemlerindeki ekspresyon profilleri araştırılmıştır. Hmgcr geni 10,5 günlükte dorsal kök bezleri ve sinir bezlerinde kuvvetli ekspresyon göstermiştir. 12,5 günlükte ön ve arka ayaklarda, sonraki gelişme dönemlerinde (13,5-14,5) interdigital (parmaklararası) bölgelere doğru ekspresyon görülmüştür. 13,5 günlükte saç ve bıyık foliküllerinde ekspresyon görülmüştür (Marijanovic *et al.* 2003).

Mevalonat kinaz (Mvk; EC:2.7.1.36) enzimi mevalonatın 5-fosfomevalonata fosforilasyonunu katalizler (Chu *et al.* 2007). Mvk enzimi feed-back inhibisyonu ile

kolesterol sentezinin düzenlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır (Tanaka *et al.* 1990). Mvk geninin mutasyona uğraması sonucunda enzimin aktivitesini kaybetmesi ile periyodik ateş sendromları, Hiper IgD sendromu (HIDS), mevalonik asidüri gibi hastalıkların oluştuğu görülmüştür (Houten *et al.* 2001). Mvk enzim geninin RNA *in situ* hibridizasyon yöntemiyle yapılan çalışmasında 14,5 günlük fare embriyosunda her yerde zayıf ve yaygın olarak ekspresyona uğradığı belirlenmiştir (Visel *et al.* 2004).

Fosfomevalonat kinaz (Pmvk; EC:2.7.4.2) enzimi 5-fosfomevalonat'ın 5-pirofosfomevalonat'a dönüşümünü katalizler (Olivier *et al.* 1999). Zellweger sendromlu hastalarda mevalonat kinaz ve fosfomevalonat kinaz enzimlerinde eksiklik görülmüştür (Hogenboom *et al.* 2002). Yapılan bir çalışmada RT-PCR analizi ve microarray yöntemi kullanılarak faredeki four-cell (4C, E2), morula (MO, E3) ve blastosist (BL, E3,5) embriyonik dönemlerinde gen ekspresyon profilleri karşılaştırılmıştır. Çalışmanın sonucunda Pmvk enzimi geninin mRNA ekspresyonunun blastosist (BL) döneminde diğer iki döneme göre daha yüksek seviyede olduğu belirlenmiştir (Cui *et al.* 2007).

GHMP kinaz protein ailesinin bir üyesi olan mevalonat (difosfo) dekarboksilaz (Mvd; EC:4.1.1.33) enzimi mevalonat-5-pirofosfat'ın isopentenil pirofosfat (IPP)'a dönüşümünü katalizler (Krepkiy and Miziorko 2004). Bu gen hakkında herhangi bir ekspresyon çalışmasına rastlanmamıştır.

İzopentenil-difosfat deltaizomeraz (Idi1; EC:5.3.3.2) enzimi 3-izopentenil pirofosfatı dimetilallil pirofosfata izomerleştirir (Berg *et al.* 2002). Bu enzim mRNA seviyesinde düzenlenir (Paton *et al.* 1997). Idi1 enziminin memelilerde yüksek derecede korunduğu ve hemen her yerde ekspresyona uğradığı belirlenmiştir (Breitling *et al.* 2003). Bu gen hakkında her hangi bir ekspresyon çalışmasına rastlanmamıştır.

Geranilgeranil difosfat sentaz 1(Ggps1; EC:2.5.1.1) enzimi izopentenil difosfat ve farnesil difosfat arasındaki kondensasyon reaksiyonlarını katalizler. İnsanda Ggps1 enzim geni kalpte yüksek seviyede; dalak, testis, beyin, plasenta, karaciğer, akciğer, iskelet kası, böbrek ve pankreasta da kısmi olarak ekspresyona uğramıştır. Aynı zaman

da bu enzim geninin prostat kanseri için risk oluşturan genlerden birisi olabileceği belirlenmiştir (Zhao *et al.* 2000). Yapılan bir çalışmada farede Western blot analizi yapılmış ve beyin dalak, akciğer, testis ve böbreklerde kuvvetli ekspresyon; iskelet kası ve kalpte orta seviyede ekspresyon; karaciğerde zayıf ekspresyon olduğu belirlenmiştir (Vicent *et al.* 2000).

Sitozolik/peroksizomal bir enzim olan farnesil difosfat sentaz (Fdps; EC:2.5.1.1) enzimi geranil pirofosfat, dimetilallil pirofosfat ve izopentenil pirofosfat'ın art arda kondensasyon reaksiyonlarını katalizlemektedir (Hosfield *et al.* 2004; Martin *et al.* 2007). Bu gen hakkında herhangi bir ekspresyon çalışmasına rastlanmamıştır.

Farnesil difosfat farnesil transferaz 1 (Fdft1; EC:2.5.1.21) enzimi endoplazmik retikulumda yer alır ve iki molekül farnesil difosfatın kondensasyonu ile skualenin sentez reaksiyonunu katalizlemektedir (Collins *et al.* 2001). Bu gen hakkında herhangi bir ekspresyon çalışmasına rastlanmamıştır.

Skualen epoksidaz (Sqle; EC:1.14.99.7) enzimi skualenin 2,3-oksidoskualen'e dönüşümünü gerçekleştiren kolesterol sentezi metabolik yolundaki ilk oksijenlenme (oxygenation) reaksiyonunu katalizlemektedir (Nagai *et al.* 2002).

İntegral membran proteini olan lanosterol sentaz (Lss; EC:5.4.99.7) 2,3-oksidoskualen'i lanosterol'e dönüştürmektedir (Ruf *et al.* 2004). *In situ* hibridizasyon yöntemiyle farede yapılan bir çalışmada Lss'nin 14,5 günlük embriyonik dönemde merkezi sinir sistemi, karaciğer, adrenal gland, spinal kord ve dorsal kök bezinde kuvvetli diğer yerlerde zayıf olarak ekspresyon olduğu tespit edilmiştir (Visel *et al.* 2004). Diğer bir çalışmada ise 14,5 günlük embriyonik dönemde spinal kord, merkezi sinir sistemi, over, dorsal kök bezi ve karaciğerde orta seviyede, diğer yerlerde zayıf olarak ekspresyon olduğu; 10,5 günlük embriyonik dönemde beyin, göz, dorsal kök bezi ve kalpte ekspresyona uğradığı belirlenmiştir (Reymond *et al.* 2002).

24-dehidrokolesterol redüktaz (Dhcr24; EC:1.3.1.72) enzimi desmosterolün kolesterole dönüşümünü katalizleyen bir oksidoredüktaz enzimidir (Di Stasi *et al.* 2005; Lu *et al.* 2006). Bu enzim membrandaki kolesterol seviyesini değiştirerek neuroprotective proseslerde (Sinir hücresi ölümünü ve yaralanmasını engelleme yeteneği bulunan ajanların kullanıldığı işlem) görev almaktadır (Pedretti *et al.* 2008). Mutant farelerle yapılan bir çalışmada elde edilen sonuçlardan bu enzim geninin ekspresyonunun normal cilt gelişimi için çok önemli olduğu belirlenmiştir (Mirza *et al.* 2006).

Sitokrom P450, 51.aile (Cyp51; EC:1.14.13.70) enzimi prokaryotik ve ökaryotik organizmalarda 1000'den fazla üyeye sahip olan sitokrom P450 enzim ailesine ait olan mikrozomal bir enzimdir (Debeljak *et al.* 2000; Cotman *et al.* 2004). Bu enzim memelilerde lanosterolün kolesterole dönüşüm reaksiyonunu katalizler (Xu *et al.* 2008).

Yapılan bir çalışmada sitokrom P450 (CYP) ailesine ait 40 fare geni için RT-PCR yöntemi kullanılarak E7, E11, E15 ve E17 olmak üzere dört farklı embriyonik gelişme dönemi ile karaciğer, akciğer, kalp, dalak, iskelet kasları, testis ve böbreğin de yer aldığı 8 farklı yetişkin fare dokusu için ekspresyon profilleri incelenmiştir. Bu gen ailesine ait olan ve kolesterol sentezinde görev alan Cyp51 geninin bu dört gelişme döneminin her birinde ve çalışılan bütün fare dokularında ekspresyona uğradığı tespit edilmiştir (Choudhary *et al.* 2003).

Transmembran 7, 2.aile üyesi (Tm7sf2; EC:1.3.1.70) genine ait cDNA ile yapılan Northern blot analizi ile yetişkin insan kalp, beyin, pankreas, akciğer, karaciğer, iskelet kası ve böbreklerde değişik seviyelerde ekspresyon gözlenirken; plasenta, dalak, timus, bağırsaklarda ekspresyon gözlenmemiştir (Lemmens *et al.* 1998).

NAD(P)<sup>+</sup> bağlı steroid dehidrogenaz-like (Nsdhl; EC:1.1.1.170) enzimi granülsüz endoplazmik retikulum da yer alır ve kolesterol sentezinin son basamaklarından biri olan C-4 metil gruplarının art arda uzaklaştırılması reaksiyonlarını katalizler (Ohashi *et al.* 2003b; Jiang and Herman 2006). Nsdhl geninin mutasyona uğraması sonucunda insanlarda CHILD sendromu denilen hastalık oluşmaktadır. Nsdhl geninin farede

gestasyon süresince embriyo gelişiminde ekspresyona uğradığı, 16,5 günlük embriyonik gelişme döneminde kuvvetli ekspresyona uğradığı Northern blot analizi yöntemi kullanılarak belirlenmiştir (Caldas *et al.* 2005). Ayrıca mRNA *in situ* hibridizasyon yöntemiyle yapılan bir çalışmada Nsdhl geninin farede (E)10,5–14,5 günlük embriyonik gelişme dönemlerindeki ekspresyon profilleri karşılaştırıldığında 11,5 günde 10,5 güne göre dorsal kök bezinde daha fazla ekspresyona uğradığı gözlemlenmiştir (Marijanovic *et al.* 2003).

Hidroksisteroid (17-beta) dehidrogenaz 7 (Hsd17b7; EC:1.1.1.270/1.1.1.62) enzimi kolesterol sentezindeki post-skualen enzimlerinden biridir ve endoplazmik retikulumda yer almaktadır (Ohnesorg and Adamski 2006). mRNA *in situ* hibridizasyon yöntemiyle yapılan bir çalışmada Hsd17b7 geninin farede (E)10,5–14,5 günlük embriyonik gelişme dönemlerindeki ekspresyon profilleri araştırılmıştır. Hsd17b7 geni 10,5 günde dorsal kök bezleri ve beyin sinir bezlerinde kuvvetli ekspresyon göstermiştir. 12,5 günde ön ve arka ayaklarda ekspresyon görülmüştür. Sonraki gelişme dönemlerinde (13,5–14,5) İnterdigital (parmaklararası) bölgelere doğru ekspresyon sınırlanmıştır. 13,5 günde de saç ve bıyık foliküllerinde ekspresyon görülmüştür (Marijanovic *et al.* 2003).

Fenilalkilamin  $Ca^{2+}$  antagonist (emopamil) bağlanma proteini (Ebp; EC:5.3.3.5) enzimi kolesterolün lanosterole dönüşümündeki ara basamaktaki reaksiyonu katalizlemektedir (Becker *et al.* 2001). Ebp enzimi endoplazmik retikulumda yer almaktadır. Ebp enzim geninin memelilerde çoğu dokuda ekspresyona uğradığı, özellikle karaciğerde kuvvetli ekspresyona uğradığı belirlenmiştir (Silve *et al.* 1996). Bu enzim geninin mutasyona uğraması sonucunda insanlarda Conradi-Hunermann sendromu denilen hastalık oluşmaktadır (Bae *et al.* 2001).

Sterol-C5-desaturaz (fungal ERG3, delta-5-desaturaz) homolog (Sc5d; EC:1.14.21.6) enzimi lanosterolün 7-dehidrokolesterolle dönüşümünü katalizler (Krakowiak *et al.* 2003). Sc5d enzim geninin eksikliğinde lathosterolosis denilen genetik hastalık oluşmaktadır. Farelerde kolesterol eksikliğinde böbreküstü bezi, pankreas ve hipofiz



bezi salgı granüllerinin sayısında önemli bir azalma olduğu belirlenmiştir (Gondre-Lewis *et al.* 2006).

7-dehidrokolesterol redüktaz (Dhcr7; EC:1.3.1.21) enzimi kolesterol sentezinin son basamağı olan 7-dehikolesterolün kolesterole dönüşüm reaksiyonunu katalizler (Gondre-Lewis *et al.* 2006). Dhcr7 geninin mutasyona uğraması sonucunda otozomal resesif bir hastalık olan Smith-Lemli-Opitz sendromu oluşmaktadır (Solca *et al.* 2007). Dhcr7 geninin insanda en fazla ekspresyona böbrek üstü bezi, karaciğer, testis ve beyin dokularında uğradığı tespit edilmiştir (Correa-Cerro and Porter 2005). mRNA *in situ* hibridizasyon yöntemiyle yapılan bir çalışmada Dhcr7 geninin farede (E)10,5–14,5 günlük embriyonik gelişme dönemlerindeki ekspresyon profilleri karşılaştırıldığında dorsal kök bezlerinde 11,5 günde 10,5 güne göre daha fazla ekspresyon olduğu görülmüştür (Marijanovic *et al.* 2003).

RT-PCR yöntemi ile sitokrom P450 (CYP) ailesine ait 40 fare geni için hem yetişkin dokularında hem de dört farklı embriyonik dönemde (E7, E11, E15, E17) ekspresyon profilleri incelenmiştir. Sitokrom P450, 27. aile, b alt ailesi, polipeptid 1(Cyp27b1; EC: 1.14.13.13) enzim geni sadece E7 embriyonik gelişme döneminde ekspresyona uğramıştır. Ayrıca yetişkin fare dokularında böbrek ve testislerde ekspresyon görülmüştür (Choudhary *et al.* 2003).

### Safra asitleri Sentezinde Yer Alan Genler:

**Çizelge 2.2.** Safra asitleri sentezi genleri

1	Cel	Karboksil ester lipaz
2	Lip1	Lizozomal asit lipaz A
3	Soat2	Sterol O-açıltransferaz 2
4	Cyp7a1	Sitokrom P450, 7. aile, a alt aile, polipeptid 1
5	Srd5a2	Steroid 5 alfa-reduktaz 2
6	Cyp27a1	Sitokrom P450, 27. aile, a alt ailesi, polipeptid 1
7	Adh1	Alkol dehidrogenaz 1 (I. sınıf)
8	Adh7	Alkol dehidrogenaz 7 (IV. sınıf), sigma polipeptid
9	Adh5	Alkol dehidrogenaz 5 (III. sınıf), chi polipeptid
10	Aldh2	Aldehit dehidrogenaz 2, mitokondrial
11	Aldh3a2	Aldehit dehidrogenaz 3. aile, A2 alt aile
12	Aldh9a1	Aldehit dehidrogenaz 9, A1 alt aile
13	Aldh1b1	Aldehit dehidrogenaz 1.aile, üye B1
14	Slc27a5	Çözünmüş taşıyıcı 27.aile (yağ asit taşıyıcı), üye 5
15	Hadhb	Hidoksi-açıl-koenzim A dehidrogenaz/3keto-açıl-koenzim A tiyolaz/enoil-koenzim A hidrotaz (üç fonksiyonlu protein), beta altbirimi
16	Acaa1b	Asetil-koenzim A açıltransferaz 1B

Karboksil ester lipaz (Cel; EC:3.1.1.3 \ EC:3.1.1.13) enzimi safra asitlerinin sentezinde yer alarak lipitlerin absorpsiyonunda görev almanın yanı sıra diyetle alınan A vitaminin yaklaşık yarısının absorpsiyonunda da önemli bir göreve sahiptir (Weng *et al.* 1999). Pankreatik sekresyonda ve memelilerin süt bezlerinde bol miktarda bulunmaktadır. Hepatosit, endotelial hücreler, makrofajlar tarafından salgılanmakla birlikte plazma ve karaciğerde düşük miktarda bulunmaktadır (Camarota *et al.* 2004). Yapılan başka bir çalışmada Cel geninin pankreasta sürekli, süt bezlerinde de hamilelik süresince olmak üzere iki dokuda ekspresyona uğradığı belirlenmiştir. Bu enzim bu dokularda

sentezlenip yine bu dokulardan salgılanmaktadır. Northern blot analizi ile farede yapılan bu çalışmada süt bezlerinde hamilelik döneminin 14. gününde Cel geninin ekspresyona uğradığı tespit edilmiştir (Kannius-Janson *et al.* 1998).

Lizozomal asit lipaz A (Lipa/Lal/Lip1; EC:3.1.1.13) enzimi plazma lipoprotein seviyesinin homeostatik kontrolü ve karaciğer, dalak ve makrofajlarda hücrel lipid birikmesini önlemede katkıda bulunmaktadır (Du *et al.* 1998). Bu enzim endoplazmik retikulumda sentezlenmektedir (Lian *et al.* 2004).Yapılan bir çalışmada 11–16 günlük fare embriyosunda *in situ* hibridizasyon yöntemiyle Lal geninin ekspresyonu değerlendirilmiştir. Lal geni kalp, over, testis, tükürük bezi, dil, seminal gland gibi çoğu dokuda zayıf ekspresyona uğramıştır. Hepatositler, dalak ve timus hücrelerinde kuvvetli ekspresyona uğramıştır. Çok daha kuvvetli ekspresyon bağırsak, adrenal korteks, pankreas, böbrek epitelyum hücrelerinde görülmüştür. Belirgin seviyede ekspresyon 12 günlük fare embriyosunda kroid pleksusun epitelyum hücrelerinde; 14 günlükte karaciğer ve akciğerde; 16 günlükte bağırsak ve böbrekte görülmüştür (Du *et al.* 1996).

Sterol O-açıltransferaz (Soat2; EC:2.3.1.26)/Açıl-CoA: kolesterol açıltransferaz (ACAT2) enzimi karaciğerde kolesterol ve açıl-CoA'dan kolesterol esterlerinin sentez reaksiyonunu katalizler (Bell *et al.* 2007). İntegral membran proteini olan ACAT enzimi endoplazmik retikulumda lokalize olmuştur (Lee *et al.* 2004). ACAT enzimlerini (ACAT1 ve ACAT2) kodlayan iki gen Soat1 ve Soat2 olarak bilinmektedir. Farede Soat1 makrofajlarda, adrenokortikal hücreler, yağ bezlerinde yüksek ekspresyona, karaciğer ve bağırsaklarda düşük seviyede ekspresyona sahiptir. Soat2'nin ekspresyonu ise bağırsak ve karaciğer ile sınırlıdır ve ACAT aktivitesinden bu dokularda bu genin sorumlu olduğu düşünülmektedir (Buhman *et al.* 2000). Kolesterol esterleri bağırsaklardaki kolesterol absorpsiyonu ve hepatik lipoprotein üretimi gibi önemli fizyolojik proseslerde görev almaktadır. ACAT-2'nin RT-PCR yöntemiyle çeşitli fare dokularında yapılan analizinde karaciğer, bağırsak ve embriyo karaciğerinde yüksek ekspresyona sahip olduğu tespit edilmiştir. Yine aynı çalışmada yapılan Northern blot analizi ile de karaciğer ve küçük bağırsakta ekspresyona uğradığı belirlenmiştir (Cases *et al.* 1998).

Safra asitleri sentezi kolesterolün 7 $\alpha$ -hidroksilaz (Sitokrom P450, 7. aile, a alt aile, polipeptid 1, Cyp7a1; EC:1.14.13.17) enzimi tarafından katalizlenen 7 $\alpha$ -hidroksilasyonu ile başlar. Cyp7a1 geni tarafından şifrelenen 7 $\alpha$ -hidroksilaz enzimi düz endoplazmik retikulumda lokalize olmuştur (Hewitt *et al.* 2003, Post *et al.* 2004). Cyp7a1 geni transkripsiyon seviyesinde düzenlenmektedir (Chen *et al.* 2002). Kolesterol 27-hidroksilazın yokluğunda safra asitleri sentezinin durduğu ya da yavaşladığı belirlenmiştir (Arnon *et al.* 1998).

Sitokrom P450, 27. aile, a alt ailesi, polipeptid 1 (Cyp27a1; EC:1.14.13.15) geninin enzimi karaciğerde kolesterolden safra asitleri sentezindeki ilk basamaklardan birini katalizlemektedir. Bu yola alternatif bir ikincil yol olarak sterol 27-hidroksilaz enzimi (Cyp27a1), kolesterolün 27-hidroksilesterol veya 3 $\beta$ -hidroksi-5-kolestenoik asite dönüşümünü katalizlemektedir. Bu bileşikler karaciğere taşınır ve burada safra asitlerine dönüştürülür. Mitokondrial sitokrom P-450 enzimi olan sterol 27-hidroksilazın çok çeşitli doku ve organlarda ekspresyona uğradığı belirlenmiştir. Bu enzim safra asitleri sentezinde çok önemli bir role sahip olmakla birlikte ekstrahepatik dokulardan kolesterolün uzaklaştırılması, kolesterol homeostazının düzenlenmesi ve D vitamini metabolizmasında görev almaktadır. Cyp27a1 geninin eksikliğinde fare ve insanlarda farklı etkileri olmasına rağmen her iki türde de sterol ve safra asitleri metabolizmasında düzensizlik görülmüştür (Rosen *et al.* 1998, Dubrac *et al.* 2005). Yapılan bir çalışmada sitokrom P450 (CYP) ailesine ait 40 fare geni için RT-PCR yöntemi kullanılarak 7, 11, 15 ve 17 günlük olmak üzere dört farklı embriyonik gelişme dönemi; karaciğer, akciğer, kalp, dalak, iskelet kasları, testis ve böbreğin de yer aldığı 8 farklı yetişkin fare dokusu için ekspresyon profilleri incelenmiştir. Cyp27a1 enzim geninin ise sadece E7 embriyonik gelişme döneminde ekspresyona uğradığı tespit edilmiştir (Choudhary *et al.* 2003).

Alkol (ADH) ve aldehit (ALDH) dehidrogenazlar alkol ve aldehitlerin çeşitli metabolizmalarını katalizlemektedirler. ADH izoenzimleri substrat spesifitesi ve hücrel lokalizasyonuna göre birkaç sınıfta gruplandırılır. Memelilerdeki Adh enzimleri geniş bir doku dağılımına ve substrat çeşitliliğine sahip olan kompleks bir

enzim ailesinden oluşmaktadır. Adh enzimleri dimerik ve çinko bağlı enzimler olup,  $\text{NAD}^+$ /  $\text{NADH}$  elektron verici ve alıcıları kullanılarak alkol ve aldehitlerin oksidasyon ve redüksiyonunda görev alırlar (Westerlund *et al.* 2007). Aldehit dehidrogenazlar ise pek çok çeşit aldehitin oksidasyonunu katalizleyen ve yapısal olarak birbirine benzeyen bir grup enzimdir. İzofomlarının farklı noktaları fiziksel ve katalitik özellikleri ile mikrozomal, mitokondrial ve sitozolik olmak üzere farklı yerlerdeki lokalizasyonlarından kaynaklanmaktadır (McCaffery *et al.* 1991).

Farede sitozolde bulunan alkol dehidrogenaz 1 (I. sınıf) (Adh1; EC:1.1.1.1) enzimi retinol ve etanolün oksidasyonunun gerçekleştiği reaksiyonu katalizlemektedir (Rout and Armant 2002). Adh1 (sınıf I) izoenzimi retinolün oksidasyon reaksiyonunu katalizlemesinin yanı sıra etanol ve çeşitli alkoller için substrat spesifitesinde sahiptir. Karaciğer enzimi olarak bilinirler fakat bu enzim böbrek, mide, bağırsak akciğer, saç kökleri ve cilt gibi pek çok doku ve organda tespit edilmiştir. Adh1 geninin yetişkin ve embriyonik farede *in situ* hibridizasyon yöntemiyle yapılan ekspresyon çalışmalarında şu sonuçlar elde edilmiştir: 8,5 ve 9,5 günlük embriyoda ekspresyon görülmemiştir. 10,5 ve 11,5 günlükte primitive böbreklerde, ön ve arka ayaklarda (forelimb-hindlimb) güçlü ekspresyon; 12,5 günlükte servikal prevertebral de; 13,5 günlükte para vertebral kas hücrelerinde; 14,5 günlükte sonraki gelişme dönemlerinde kahverengi yağ dokusu olacak olan latero servikal mezenkim bölgesinde ekspresyon tespit edilmiştir. Adh1 transkriptinin fetal iç organların çoğunda ekspresyona uğradığı belirlenmiştir. Akciğerde 11,5 günlük gibi erken bir dönemde başlayan ekspresyonun 13,5–15,5 günlük dönemlerde çok kuvvetli bir şekilde devam ettiği belirlenmiştir. 15,5–16,5 günlük dönemlerde fetal gut epitelyumda kuvvetli ekspresyon; bağırsak villuslarında ekspresyon tespit edilmiş ancak mide epitelyumunda ve ince bağırsakta ekspresyonun gerçekleşmediği tespit edilmiştir. 14,5–16,5 günlük dönemlerde uriner bladder (mesane) epitelyumunda; 12,5 günlükte adrenal glandda çok yoğun ekspresyon belirlenmiştir. Fetal gelişim dönemi boyunca medulla hücrelerinde, 16,5 günlükte böbrek tübüllerinde, 15,5–16,5 günlükte karaciğerde çok zayıf ekspresyon belirlenmiştir. Yetişkin farede mide, bağırsak, böbrek özellikle bazı nefronlarda daha kuvvetli bir şekilde, kuvvetli seviyede gonadlarda, karaciğer ve adrenal glandda ekspresyon belirlenmiştir. Karaciğer

enzimi olarak bilinen Adh1'in bütün hepatosit hücrelerinde kuvvetli bir şekilde ekspresyona uğradığı belirlenmiştir. Akciğerlerde fetal gelişim dönemi boyunca güçlü ekspresyon olmasına karşın yetişkin akciğerinde çok zayıf bir ekspresyon belirlenmiştir (Vonesch *et al.* 1994). RT-PCR yöntemi kullanılarak yapılan başka bir çalışmada yetişkin fare karaciğerinde Adh1 geninin ekspresyona uğradığı tespit edilmiştir (Rout and Armant 2002). Oligonükleotid *in situ* hibridizasyon yöntemi kullanılarak yapılan çalışmada farede Adh1'in gastrik mukoza, rektum, mide ve gastrik salgı bezinde ekspresyonu belirlenmiştir (Westerlund *et al.* 2007). Northern blot analizi yöntemi kullanılarak Adh gen ailesine ait Adh1 (sınıf I) geni için 14 farklı yetişkin fare dokusunda çalışma yapılmıştır, bu çalışmanın sonucunda, Adh1 (sınıf I)'in karaciğer, bağırsak ve gözde yüksek ekspresyon; böbrek, over ve uterusu orta seviyede ekspresyon; spinal kord, timus, kalp, mide mukozası, cilt ve testislerde düşük seviyede ekspresyon görülürken; beyin ve dalakta ise ekspresyon görülmemiştir (Zgombic-Knight *et al.* 1995). Radyoaktif oligonükleotid *in situ* hibridizasyon yöntemi kullanılarak yetişkin ve embriyo dönemindeki (E9,5-E19,5) farede Adh1 (sınıf I) enzim geninin ekspresyon çalışmaları yapılmıştır. Bu çalışmanın sonucunda Adh1 13,5 günlükte adrenal gland'da; 15,5 günlükte karaciğer ve bağırsakta; 19,5 günlükte olfaktori epitelyumda; aynı zamanda adrenal korteks de kuvvetli ve yaygın bir ekspresyon göstermiştir. Yetişkin farede ise olfaktori epitelyumda ekspresyon belirlenirken, epidermiste ise ekspresyon görülmemiştir (Westerlund *et al.* 2005). Yapılan başka bir çalışmada *in situ* hibridizasyon yöntemiyle fare embriyo ve yetişkin dokularındaki Adh izoenzimlerinin ekspresyon çalışması yapılmıştır. Adh1 geninin embriyoda bağırsak, üriner sistem, adrenal gland, konjunktival kese, epidermis, nazal epitelyum ve akciğerde; yetişkin farede uterus, böbrek, bağırsak, adrenal korteks, testis ve karaciğerde ekspresyona uğradığı belirlenmiştir (Ang *et al.* 1996). Yapılan bir çalışmada embriyonik ve yetişkin fare adrenal gland (böbreküstü bezi) bölgesinde *in situ* hibridizasyon yöntemiyle Adh genlerinin ekspresyon çalışmaları yapılmıştır. Sınıf I Adh geninin 16,5 günlük embriyonik gelişme döneminde adrenal gland ve hemen yanında bulunan böbrek tübüllerinde; yetişkin farede ise sadece adrenal glandda ekspresyona uğradığı belirlenmiştir (Haselbeck *et al.* 1997). Farede Adh1 geni için yapılan immunohistokimya çalışmasında şu sonuçlar elde edilmiştir: 11,5 ve 12,5 günlük embriyonik gelişme döneminde Adh1 adrenal hücrelerinde kuvvetli ve yaygın

bir şekilde ekspresyon göstermiştir. Bu dönemlerde Adh1 geni bu hücrelerin yanı sıra böbrek hücrelerinde de ekspresyona uğramıştır. 14,5, 15,5 ve 16,5 günlük embriyonik gelişme dönemlerinde adrenal gland da ekspresyon görülmüştür (Haselbeck and Duester 1998). *In situ* hibridizasyon yöntemiyle 14,5 günlük farede yapılan başka bir çalışmada Adh1'in adrenal gland, akciğer mezenkimi ve nazal epitelyumda ekspresyona uğradığı tespit edilmiştir (Cankaya *et al.* 2007). RNA *in situ* hibridizasyon yöntemiyle farede 12,5 ve 15,5 günlük embriyonik gelişme dönemleri ve P75 postnatal dönemde yapılan çalışmada Adh1 geni için ureterde 12,5 günlükte zayıf, 15,5 günlükte kuvvetli ekspresyon, aynı zamanda bladderde (mesane) kuvvetli ekspresyon görülmüştür (Mitchell *et al.* 2006).

Farede sitozolde bulunan alkol dehidrogenaz 7 (IV. sınıf), mu ya da sigma polipeptid (Adh7; EC:1.1.1.1) izoenzimi retinol ve etanolün oksidasyonunun gerçekleştiği reaksiyonu katalizlemektedir. RT-PCR yöntemi kullanılarak yapılan çalışmada yetişkin fare karaciğerinde Adh7'nin ekspresyonu belirlenirken beyinde tespit edilmemiştir (Rout and Armant 2002). Northern blot analizi yöntemi kullanılarak ADH gen ailesine ait sınıf IV ADH geni için 14 farklı yetişkin fare dokusunda çalışma yapılmıştır. Bu çalışmanın sonucunda, Adh7 (Sınıf IV) için yüksek seviyede mide mukozasında; orta seviyede göz, timus, cilt, overde; çok düşük seviyede de beyin, spinal kord, dalak, kalp, böbrek ve testislerde ekspresyon belirlenmiştir. Farede Adh7 (Sınıf IV) *in situ* hibridizasyon çalışması yapılarak over, cilt, timüs, göz ve midede yüksek seviyede ekspresyon gösterdiği belirlenmiştir (Zgombic-Knight *et al.* 1995).Yapılan bir çalışmada *in situ* hibridizasyon yöntemiyle fare embriyo ve yetişkin dokularındaki Adh izoenzimlerinin ekspresyon çalışması yapılmıştır. Adh7 geninin embriyoda adrenal gland, nazal epithelyumda; yetişkin farede özafagus epitelyum hücrelerinde, epididim, testis, adrenal korteks ve midede ekspresyona uğradığı belirlenmiştir. Ayrıca Adh7'nin, 10,5, 11,5, 14,5, 16,5 günlük embriyo döneminde ekspresyona uğradığı tespit edilmiştir (Ang *et al.* 1996). Yapılan başka bir çalışmada embriyonik ve yetişkin fare adrenal gland (böbreküstü bezi) bölgesinde *in situ* hibridizasyon yöntemiyle Adh genlerinin ekspresyon çalışmaları yapılmıştır. (Sınıf IV) Adh7 geninin 16,5 günlük embriyonik gelişme döneminde ve yetişkin farede adrenal glandda ekspresyon görülürken, böbrek

tübüllerinde ekspresyon görülmemiştir (Haselbeck *et al.* 1997). Farede Adh7 geni için yapılan immunohistokimya çalışmasında 11,5 ve 12,5 günlük embriyonik gelişme döneminde adrenal hücrelerinde zayıf ekspresyon gösterdiği belirlenmiştir (Haselbeck and Duester 1998). Radyoaktif oligonükleotid *in situ* hibridizasyon yöntemi kullanılarak yetişkin ve embriyo dönemindeki (E9,5-E19,5) (sınıf IV) Adh 7 enzim geninin ekspresyon çalışmaları yapılmıştır. Bu çalışmanın sonucunda Adh 7 geni 15,5 günlükte olfaktori epitelyumda; 19,5 günlükte adrenal gland, olfaktori epitelyum, konjunktival epitelyum, epidermis ve saç foliküllerinde; orta seviyede de korteks hücrelerinde ekspresyon görülmüştür. Yetişkin farede de olfaktori epitelyumda ve epidermiste zayıf ekspresyon görülmüştür (Westerlund *et al.* 2005).

Oligonükleotid *in situ* hibridizasyon yöntemi kullanılarak yapılan çalışmada farede alkol dehidrogenaz 4 (II. sınıf), pi polipeptid (Adh4; EC:1.1.1.1) geninin dil epitelyumu, özafagus ve midede, gastrik mukozada ekspresyonu belirlenmiştir (Westerlund *et al.* 2007). 6,5–8,5 günlük embriyonik gelişme dönemindeki farede *in situ* hibridizasyon yöntemiyle yapılan çalışmada Adh4 enziminin 6,5 günlükte ekspresyona uğramadığı, 7,5 günlükte primitif mezoderm, 8,5 günlükte primitif mezoderm ve graniel (kafatası) mezenkimde ekspresyona uğradığı belirlenmiştir (Ang and Duester 1997). Adh4 enziminin *in situ* hibridizasyon yöntemiyle yapılan analizinde 14,5 günlük fare embriyosunda olfaktori soğancığı, bağırsaklar, merkezi sinir sistemi, karaciğer ve cranial bezinde kuvvetli, diğer yerlerde zayıf olarak ekspresyona uğradığı belirlenmiştir (Visel *et al.* 2004).

Yapılan bir çalışmada *in situ* hibridizasyon yöntemiyle fare embriyo ve yetişkin dokularındaki Adh izoenzimlerinin ekspresyon çalışması yapılmıştır. Alkol dehidrogenaz 5 (III. sınıf), chi polipeptid (EC:1.1.1.1 \ EC:1.1.1.284) Adh5'in embriyo ve yetişkin fare dokularında düşük seviyede ekspresyona uğradığı belirlenmiştir. Ayrıca Adh5'in 10,5, 11,5, , 14,5, 16,5 günlük embriyo döneminde ekspresyona uğradığı tespit edilmiştir (Ang *et al.* 1996). Radyoaktif oligonükleotid *in situ* hibridizasyon yöntemi kullanılarak yetişkin ve embriyo dönemindeki (E9,5-E19,5) farede (sınıf III) Adh 5 enzim geninin ekspresyon çalışmaları yapılmıştır. Bu çalışmanın sonucunda Adh 5, 13,5



günlük dönemde zayıf ve her yerde yaygın ekspresyon göstermiştir (Westerlund *et al.* 2005).

Aldehit dehidrogenaz 2, mitokondrial (Aldh2; EC:1.2.1.3) enzimi asetaldehit detosifikasyonunda rol oynamaktadır (Ohsawa *et al.* 2003). Northern blot analizi ile yapılan çalışmada farede karaciğerde yüksek seviyede, böbrekte düşük seviyede Aldh2 belirlenmiştir (Chang and Yoshida 1994). RT-PCR yöntemi kullanılarak yapılan diğer bir çalışmada yetişkin fare karaciğerinde; mitokondrial Aldh (Aldh2) geninin ekspresyona uğradığı tespit edilmiştir (Rout and Armant 2002).

RT-PCR yöntemi kullanılarak yapılan çalışmada yetişkin fare karaciğerinde ve beyinde korneal Aldh (Aldh3) geninin ekspresyona uğradığı tespit edilmiştir (Rout and Armant 2002).

Aldehit dehidrogenaz 9, A1 alt aile (Aldh9a1; EC:1.2.1.3\EC:1.2.1.47) enziminin aktivitesinin insanda karaciğer, adrenal gland ve böbreklerde çoğunlukta olduğu, Northern blot ile yapılan analizde Aldh9a mRNA'sının karaciğer, böbrek, iskelet kası, kalp, beyin, pankreas, akciğer, plasentada bulunduğu belirlenmiştir (Vaz *et al.* 2000).

Radyoaktif oligonükleotid *in situ* hibridizasyon yöntemi kullanılarak yetişkin ve embriyo dönemindeki (E9,5-E19,5) farede yapılan çalışmada Aldh1 geninin mezensefalik (orta beyine ait) dopamin nöron hücrelerinde kuvvetli ekspresyona uğradığı belirlenmiştir (Westerlund *et al.* 2005). RT-PCR yöntemi kullanılarak yapılan çalışmada yetişkin fare karaciğerinde; Aldh1 (sitolik retinol dehidrogenaz Aldh2) geninin ekspresyona uğradığı tespit edilmiştir (Rout and Armant 2002).

Aldehit dehidrogenaz, 7. aile, üye A1 (Aldh7a1; EC:1.2.1.3) enzim geninin RNA *in situ* hibridizasyon yöntemiyle 14,5 günlük fare embriyosunda yaygın ve kuvvetli olarak tüm dokularda ekspresyona uğradığı belirlenmiştir (Visel *et al.* 2004).

Çözünmüş taşıyıcı 27.aile (yağ asit taşıyıcı), üye 5 (Slc27a5; EC:6.2.1.7) / FATP5 enzimi integral transmembran protein olan FATP/Slc27 ailesinin karaciğer spesifik bir üyesidir. Bu enzim hem yağ asidi taşıyıcı hem de safra asiti-CoA aktivitesine sahip olan bir enzimdir (Hubbard *et al.* 2006). Western blot tekniği kullanılarak yapılan bir çalışmada E18,5 ve yetişkin fare de FATP ailesi üyelerinin ekspresyonlarına bakılmış ve bu protein ailesinin diğer üyelerinin farklı dokularda farklı oranlarda ekspresyona uğradığı belirlenirken, FATP5/Slc27a5 geninin her iki evrede de ekspresyon göstermediği belirlenmiştir (Schmuth *et al.* 2005). RT-PCR yöntemi kullanılarak 10,5–18,5 günlük fare embriyosunda yapılan başka bir çalışmada FATP5/ Slc27a5 geninin ekspresyona uğramadığı belirlenmiştir (Schaiff *et al.* 2007).

Mitokondrial trifunctional protein (MTP) yağ asitlerinin 4 basamaktan oluşup tekrar eden  $\beta$  oksidasyonunda görev almaktadır. MTP, MTP $_{\alpha}$  (Hadha) ve MTP $_{\beta}$  (Hadhb) olmak üzere iki alt birimden oluşmaktadır. MTP $_{\beta}$  (Hadhb) Hidoksiaçil-koenzim A dehidrogenaz (Hadhb; EC:2.3.1.16) 3-ketoaçil-CoA tiyolaz aktivitesi gösterir ve  $\beta$  oksidasyonda dördüncü basamağını katalizler (Ibdah *et al.* 2001).

Asetil-koenzim A açıltransferaz 2 (Acaa2; EC:2.3.1.16) enzim geninin RNA *in situ* hibridizasyon yöntemiyle 14,5 günlük fare embriyosunda merkezi sinir sistemi, mide, karaciğer, özafagus, kroid pleksusda çok daha belirgin olmak üzere tüm dokularda ekspresyona uğradığı belirlenmiştir (Visel *et al.* 2004).

Retinol dehidrogenaz 14 (Rdh14; EC:1.1.1.-]) geninin RNA *in situ* hibridizasyon yöntemiyle yapılan analizinde 14,5 günlük fare embriyosunda ekspresyona uğramadığı görülmüştür (Visel *et al.* 2004).

Tinol dehidrogenaz 13 (Rdh13; EC:1.1.1.-]) enzim geninin RNA *in situ* hibridizasyon yöntemiyle 14,5 günlük fare embriyosunda merkezi sinir sistemi, dorsal kök bezi ve cranial bezinde ekspresyona uğradığı belirlenmiştir (Visel *et al.* 2004).

Fare dokuları üzerinde kolesterol ve safra asitleri sentezinde yer alan bazı genler üzerine ekspresyon çalışması yapılmasına rağmen bu metabolik yolların tamamını içeren genlerin detaylı bir çalışmasına rastlanmamıştır. Ekspresyon analizleri birçok çalışmanın temelini oluşturduğundan, 14,5 günlük farede kolesterol ve safra asitleri sentezi metabolizmasının genlerinin gen ekspresyon çalışmasının literatüre önemli katkı sağlayacağı düşünülerek bu çalışma planlanmıştır.

### 3. MATERYAL ve YÖNTEM

#### 3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Çalışmalarda Çizelge 3.1’de belirtilen maddeler kullanıldı.

**Çizelge 3.1.** Kullanılan kimyasal maddeler

1 kb DNA ladder	NEBiolabs
2-Log DNA ladder	NEBiolabs
Agaroz	Life Technologies
Amonyum asetat	Merck
Anti-Dig-Fab-POD	Roche
BCIP(5-bromo-4-kloro-3-indolilfosfat,4-toluidin tuzu)	Roche
Bisbenzimidin	Sigma
BMB blocking reagent	Roche
Borik asit	Merck
Brom fenol mavisi	Pharmacia Biotech
DEPC (Dietilpirokarbonat)	Sigma
DNase I (RNase Free)	Roche
DNTPs	Roche
DTT, ditiyotreitöl	Sigma
EDTA	Sigma
Enhancer	Qiagen, USA
Etanol	Roth GmbH, 76185 Karlsruhe
Etidyum bromür	Sigma
Fenol	Roth GmbH, 76185 Karlsruhe
Filtre	Sartorius
Filtre Kağıdı	Sigma
Formaldehit	Electron microscopy sciences
Formamid	Fluka
Gliserin	Appli chem
Glisin	Sigma
Glutaraldehit(%25)	Merck
Hidroklorik asit, (HCl), 1N çözelti	Roth GmbH, 76185 Karlsruhe

**Çizelge 3.1.** (devam)

Hidrojen peroksit (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	Fluka
ISH Tamponu	Ambion
İyotasetamid	Sigma
Kalsiyum klorür	Merck
Kb-Ladder	NEBiolabs
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Merck
Kloroform	Roth GmbH, 76185 Karlsruhe
Ksilonsiyanol	Sigma
Levamisole ([(-)-tetramizol hidroklorür)	Sigma
Maleik asit	Fluka
Metanol	Roth GmbH, 76185 Karlsruhe
Microscop slides	Menzel gläser
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Riedel de Haen
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Roth GmbH, 76185 Karlsruhe
NBT (Nitroblue tetrazolium klorür)	Roche
NEN Blocking reagent	NEN/Perkin-Elmer
NEN Tiramide signal amplification	NEN/Perkin-Elmer
NeutrAvidin-AP	Roche
Potasyum klorür	Roth GmbH, 76185 Karlsruhe
Proteinaz K	Roche
Revers transkriptaz	Invitrogen
RNA H	Roche
RNase inhibitörü	Roche
RNaseZAP	Sigma
Sheep Serum	Chemicon International Inc.
Sodyum klorür (NaCl)	Roth GmbH, 76185 Karlsruhe
SP6-primeri	MWG
SP6-RNA-Polimeraz	Roche
T7-DNA-Primeri	MWG
T7-RNA-Polimeraz	Roche
Taq-DNA-Polimeraz	Sigma
TBE	Sigma
Tissue-Tec (OCT)	Sakura
Trietanolamin	Fluka
Tris	Roth GmbH, 76185 Karlsruhe
Tween-20	Sigma

### 3.2. Yararlanılan Alet ve Cihazlar

Derin Dondurucular	: Proliline, GFL, NORD CAP
Destile Su Üretme Cihazları	: USF Seraclest SD 2000, Heraus Destamat Jurgens
Elektroforez cihazı	: Bio lab agaroz elektroforezi
Etüv	: Mememert
Görüntüleme Cihazı	: Sony
Hassas Terazı	: Comnilab OC 3100-P
<i>In Situ</i> Hibridizasyon Cihazı	: TECAN
Kar Üretme Cihazı	: B-390, Scotsman
Kiriyostat	: Leica
Kurutucu cihaz	: Concentrator 5301, Eppendorf
Magnetik Karıştırıcı	: IKA-Combimay RET, Jurgens
Mikroskoplar	: Leica
Mikrotom Cihazı	: Leica
Otomatik Pipetler	: Biohit, Eppendorf, Socorex ve Oxford Pipettors
PCR Cihazları	: Eppendorf Mastercycler Gradient, Applied biosystems
Gene Amp PCR system 2400	
pH metre	: pH-Meter 766 calimatic, Knick
Saf su cihazı	: Milliaqua
Slayt kaplama cihazı	: Promounter RCM 2000, Medite/Meisci
Soğutmalı	: Biofuge (Pico)
Soğutmasız Santrifüjler	: Sorvall RC3B
Steril Kabin	: Mememert
Tarama (Scan) Cihazı	: Leica
UV-VIS Spektrofotometre	: Hewlett Packard, 8453
Vorteks	: IKA MS2 Minishaker

### 3.3. Kullanılan Çözeltiler

1. 6x Loading Tamponu: Didistile suda çözülmüş %30 gliserol, %0,25 bromfenol mavisi ve %0,25 ksilen siyanol FF alınıp istenen miktarda hazırlandı ve 4°C'de saklandı.
2. 10x TBE Tamponu: 108 g Tris, 55 g borik asit ve 40 ml EDTA (0,5 M'lık ve pH: 8,0) alınıp 950 ml ELGA suda çözülüp son hacim 1 lt'ye tamamlandı. -20°C'de saklandı.
3. 2-Log DNA Ladder (0,1-10,0 kb) reaktifi: 150 µl gliserol (%100), 150 µl DEPC'li su ve 100 µl 6x loading tamponu konup karıştırıldı ve daha sonra 100 µl DNA ladder (1000 µg/µl) alınıp eklenerek -20°C'de saklandı.
4. %1'lık Agaroz Jeli: 1x TBE'den 100 ml alınıp üzerine 1 g agaroz kondu ve 1,5 dakika mikro dalga fırınında ısıtıldı.
5. DEPC (Dietil pirokarbonat)'li su: 1 ml DEPC alındı 1 lt dd H<sub>2</sub>O ilave edilip 4 saat karıştırıcıda karıştırıldıktan sonra otoklavlandı ve oda sıcaklığında saklandı.
6. 5xNTE Tamponu: 146,25 g NaCl (2,5M), 6,055 g Tris (50 mM), 9,305 g EDTA (25mM) alındı ve 950 ml sıcak dd H<sub>2</sub>O (60°C) çözülüp pH: 8 ayarlandıktan sonra 1 lt'ye tamamlandı ve otoklavlandı.
7. 10x PBS: 80 g NaCl, 2 g KCl, 14,4 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ve 2,4 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> alınarak dd H<sub>2</sub>O'da çözülüp pH: 7,4 ayarlanıp son hacim 1 lt yapıldıktan sonra otoklavlandı.
8. 10xTN: 121,5 g Tris 87,96 g NaCl alınıp 950 dd H<sub>2</sub>O'da çözüldü ve pH: 7,5 ayarlandı. Son hacim 1 lt'ye tamamlandıktan sonra otoklavlandı.

**9.** TNB (%0,5'lik bloking reaktifi): 1xTN çözeltisinden 100 ml alınıp içine yüzdesi %0,5 olacak şekilde blocking reaktifi konup ve 1 saat 60°C'de karıştırıcı üzerinde karıştırıldı, daha sonara oda sıcaklığına getirildikten sonra pH: 8,0 ayarlandı ve 50'ml'lik kısımlar halinde -20°C de saklandı.

**10.** TMN: 500 ml'si hazırlamak için 6,06 g Tris, 2,92 g NaCl ve 5,08 g MgCl<sub>2</sub>-6H<sub>2</sub>O alınıp ELGA suda çözülüp daha sonra pH: 9,5 ayarlandı, stoklar halinde -20°C'de saklandı.

**11.** 2xPK (Proteinaz K Tamponu): 1 litre için 100mM Tris (12,1 g), 10mM EDTA (3,72 g) alınıp 950 ml otoklavlanmış dd H<sub>2</sub>O'da çözülüp daha sonra pH: 8,0'a ayarlanarak oda sıcaklığında saklandı.

**12.** 20x SSC: 1 lt 20x SSC hazırlamak için 175,3 g NaCl, 88,2 g Na sitrat-trisodyum sitrat dihidrat alınıp 950 ml dd H<sub>2</sub>O'da çözülüp pH: 7,0 ayarlandıktan sonra 1 lt hacime tamamlandı ve otoklavlandı.

**13.** Maleat Tamponu: 1 lt maleat tamponu hazırlamak için 8,765 g NaCl, 16 g maleik asit alınıp 950 ml ELGA suda çözülüp pH: 7,5 ayarlandıktan sonra 1 lt hacim tamamlandı.

**14.** %10'luk Tween: 100 ml %10'luk tween hazırlamak için 10 g tween-20 tartılıp üzerine 90 g otoklavlanmış dd H<sub>2</sub>O konarak çözülerek hazırlandı. Renk reaktifi, TMN, Hyb-Mix reaktifleri haricindeki *in situ* hibridizasyon sırasında kullanılan bütün reaktiflere son tween konsantrasyonu %0,5 olacak şekilde tween ilave edildi.

**15.** %50'lik Formamid I: 1 lt bu çözeltiden hazırlamak için 100 ml 20x SSC, 500 ml formamid ve 400 ml'de otoklavlanmış dd H<sub>2</sub>O alınıp karıştırıldı.



**16.** %50'lik Formamid II:1 lt bu çözültiden hazırlamak için 50 ml 20x SSC, 500 ml formamid ve 450ml'de otoklavlanmış dd H<sub>2</sub>O alınıp karıştırıldı.

**17.** 0,2 M HCl: 100 ml bu çözültiden hazırlamak için 1 M'lik HCl'den 20 ml alındı ve hacim otoklavlanmış dd H<sub>2</sub>O ile 100 ml tamamlandı.

**18.** %4'lük PFA: 200 ml bu tampondan hazırlamak için 180 ml otoklavlanmış dd H<sub>2</sub>O, 0,4 ml NaOH alındı ve 60°C kadar ısıtıldı. Bu sıcaklığa gelindiğinde 12 g PFA konarak çözüldü ve 0,6 ml HCl, 20 ml 10xPBS konup karıştırıcıda karıştırıldıktan sonra kullanılmaya kadar +4°C de saklandı.

**19.** 4 M'lik Amonyum Asetat: 100 ml bu çözültiden hazırlamak için 31,12 g amonyum asetat alındı ve 70 ml çözümlü son hacim dd H<sub>2</sub>O ile 100 ml tamamlanarak otoklavlandı ve -20°C'de saklandı.

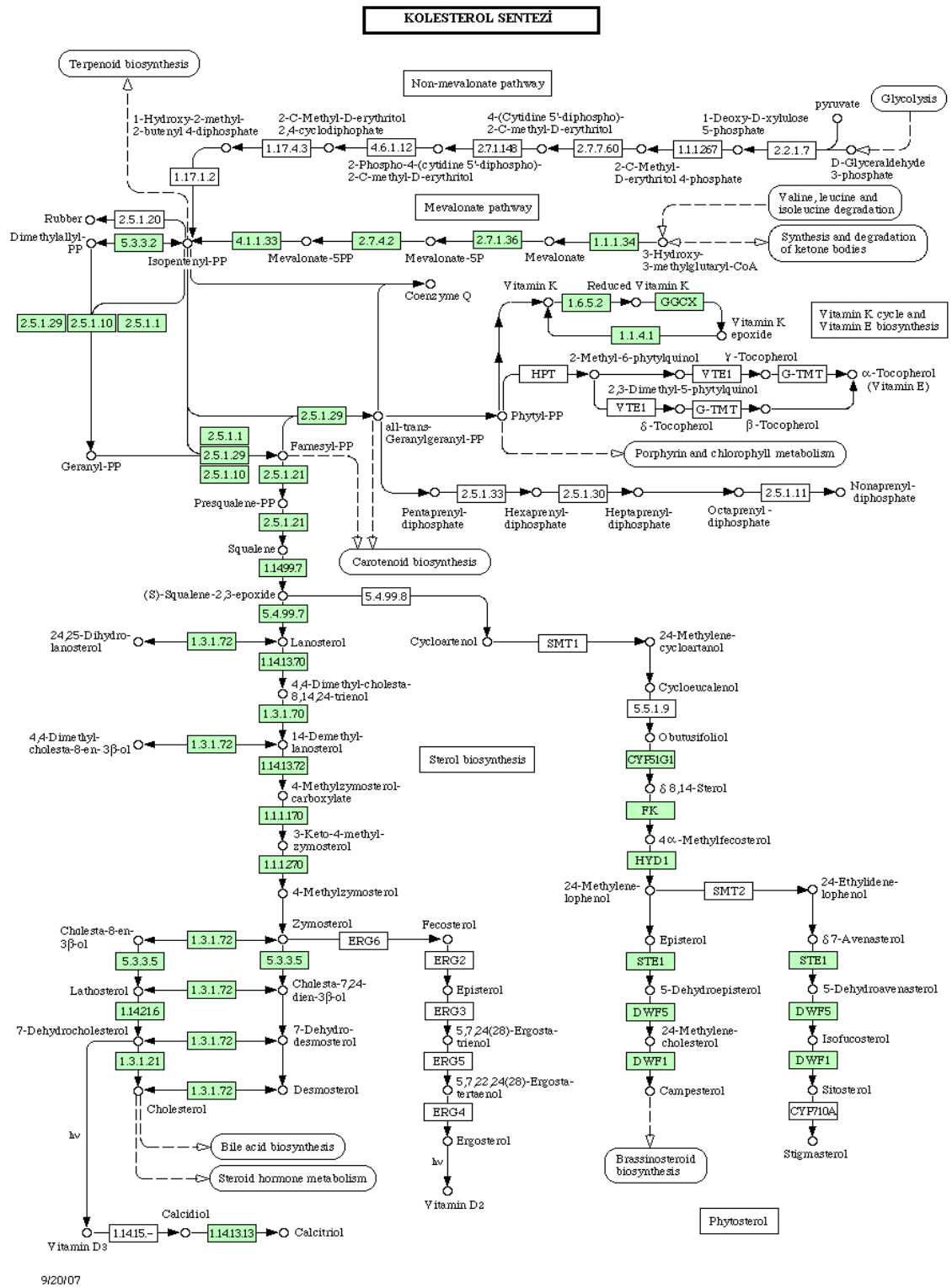
**20.** %4'lük Sheep Serum: 250 ml bu çözültiden hazırlamak için 1xTNT çözültisinden 240 ml alındı ve bu çözelti içinde 10 ml'de sheep serum alınarak karıştırıldı ve daha sonra filtreden geçirildi.

**21.** Renklendirme çözültisi: 200 ml hazırlamak için önceden hazırlanmış TMN çözültisini ilk önce filtreden geçirildi, daha sonra çözültinin her 1 ml'sinde 0,5 mg levamizol [(-)-tetramizol hidroklorür] olacak şekilde 100 mg bu maddeden alınıp çözüldü ve 1 ml NBT (Nitroblue tetrazolium klorid) (5 µl/ml), 0,75 ml BCIP (5-bromo-4-kloro-3-indolil-fosfat,4-toluidine tuzu) (3,75 µl/ml) şeklinde ilaveler yapıldıktan sonra hemen kullanıldı.

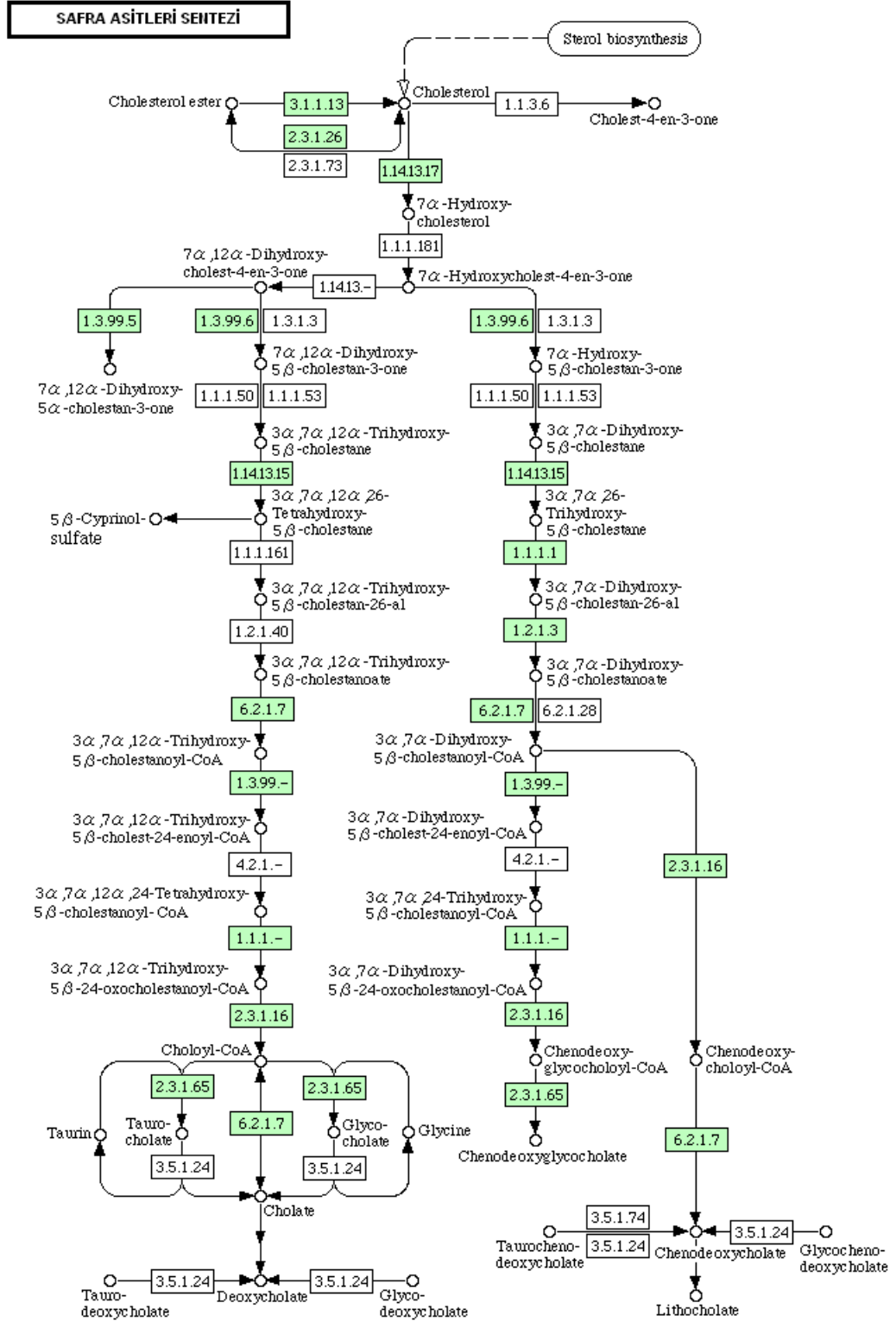
**22.** Blocking reaktifi (maleat tamponu içinde): Bu hazırladığımız çözültide blocking reaktifinin konsantrasyonu %1'dir. 100 ml maleat tamponu alındı ve içine 1g blocking reaktifi koyup 1,5 saat 100°C'de karıştırıcı üzerinde karıştırdıktan sonra soğutuldu ve 4°C'de saklandı. Kullanılacağı zaman filtreden geçirilerek kullanıldı.

### 3.4. Kolesterol ve Safra Asitleri Sentezi için Gen Seçimi

Bu tez çalışması kapsamında 35 genin ekspresyon analizi fareler üzerinde yapıldı. Fare genomu içinde bulunan kolesterol ve safra asitleri sentezi enzim genleri <http://www.genome.ad.jp> web sayfasından bakılarak belirlendi. Web sayfası açıldıktan sonra “KEGG PATHWAY” butonuna basıldı. <http://www.genome.ad.jp/kegg/pathway.html> web sayfası açıldı. Bu sayfadan ilgili metabolik yol seçildi. Database’de bulunan bütün organizmalara ait ortak pathway görüldü. Daha sonra “Pathway menü”den “Mus musculus (mouse)” seçildi, “Go” tuşuna basıldı. Fareye ait genler yeşil kutucuklar içinde ekranda görüldü. Çalışma kapsamına alınan metabolik yollar Şekil 3.1–3.2’de verildi.



Şekil 3.1. Kolesterol sentezi ve ilişkili metabolik yollar



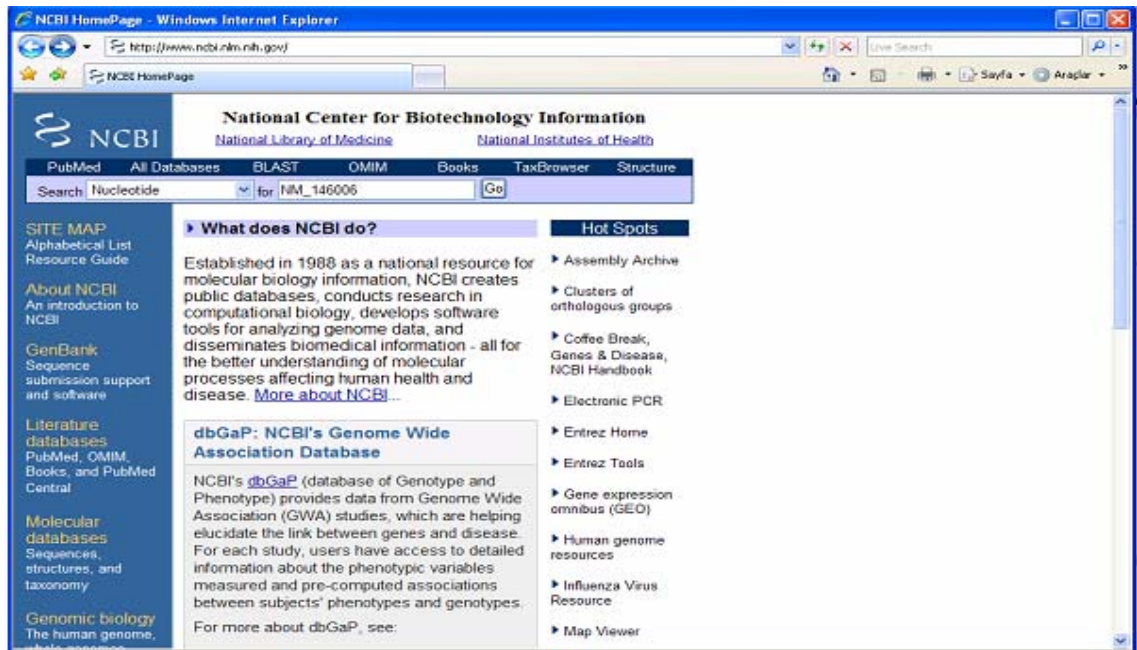
Şekil 3.2. Safra asitleri sentezi ve ilişkili metabolik yollar

### 3.5. Spesifik Genler İçin İnternet Kullanılarak Primer Dizaynı

Araştırılan genlerin primer dizaynı için aşağıdaki işlemler sırayla yapıldı. Burada örnek olarak sadece lanosterol sentaz geni (Lss) için yapılan işlemler verilmiştir.

#### 3.5.1. cDNA probu yapılacak gen sekansına ulaşılması

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ web sayfası açıldı, “Search” karşısına “Nucleotide” seçildi, “for” karşısına araştırılacak genin Accession number’ı (NM\_146006) yazıldı ve daha sonra “go” tuşuna basıldı (Şekil 3.3). Şekil 3.4’de sorgu sonucu görülebilir. Burada aradığımız gen karşımıza çıktı. NM\_146006 üzerine tıklandı ve bu genin cDNA’sına ulaşıldı (Şekil 3.5 ve 3.6). Bu sekans kopyalandı ve Mus musculus database’a karşı blastlandı.



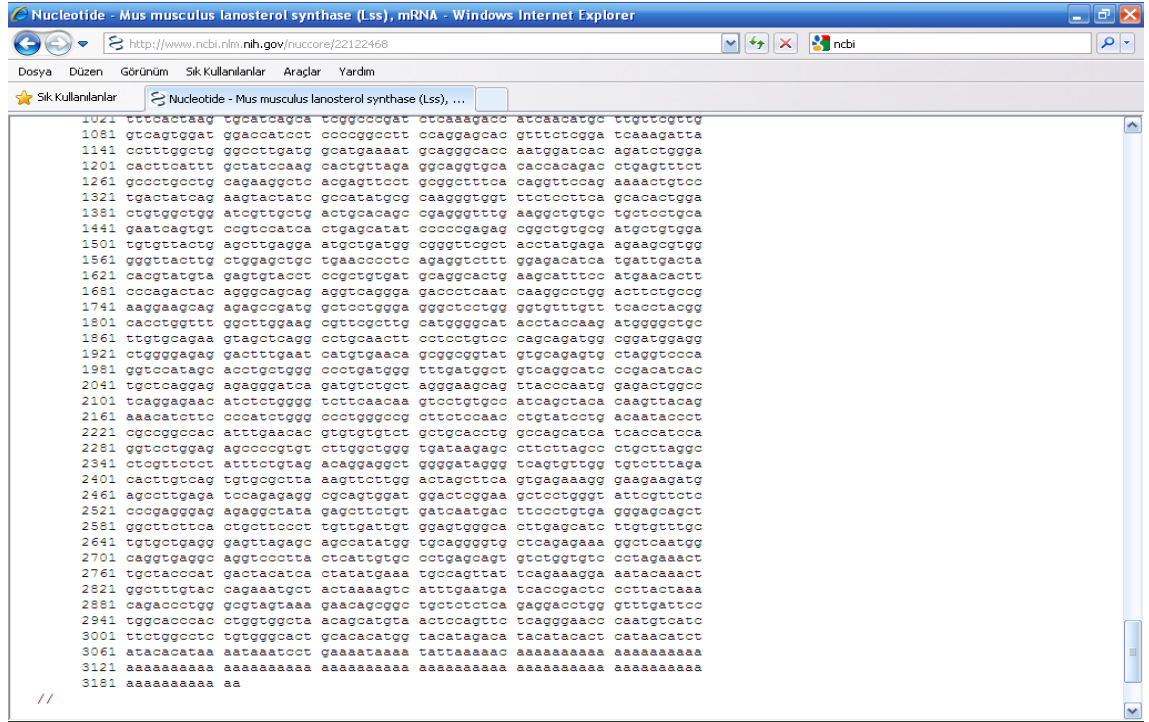
Şekil 3.3. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ web sayfası. “Search” karşısına “Nucleotide” seçildi, “for” karşısına araştırılacak genin Accession number’ı (NM\_146006) yazıldı ve daha sonra “go” tuşuna basıldı.

The screenshot shows the NCBI Nucleotide search results for the accession number NM\_146006. The search was performed in the Nucleotide database. The results show one nucleotide sequence found. The sequence is identified as Mus musculus lanosterol synthase (Lss), mRNA. The gene is located on Chromosome 10, 10 41.1 cM, NC\_000076.5 (75994371..76016678). The gene ID is 16987, and other aliases include 2810025N20Rik, BC029082, D10Etd116e, and MGC27893. The sequence is available in RefSeq and mRNA formats.

Şekil 3.4. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> web sayfasından bulunan mus musculus lanosterol sentaz geni (Lss) için sorgu sonucu

The screenshot shows the NCBI Nucleotide search results for the accession number NM\_146006. The search was performed in the Nucleotide database. The results show one nucleotide sequence found. The sequence is identified as Mus musculus lanosterol synthase (Lss), mRNA. The gene is located on Chromosome 10, 10 41.1 cM, NC\_000076.5 (75994371..76016678). The gene ID is 16987, and other aliases include 2810025N20Rik, BC029082, D10Etd116e, and MGC27893. The sequence is available in RefSeq and mRNA formats. The page also displays the NCBI Reference Sequence, the sequence in FASTA format, and various analysis tools like BLAST and Primer Pick.

Şekil 3.5. Mus musculus lanosterol sentaz (Lss) geninin sekansının olduğu sayfanın üst tarafı



Şekil 3.6. Mus musculus lanosterol sentaz (Lss) geninin sekansının olduğu sayfanın alt tarafı

### 3.5.2. cDNA probu yapılacak gen sekansının blastlanması

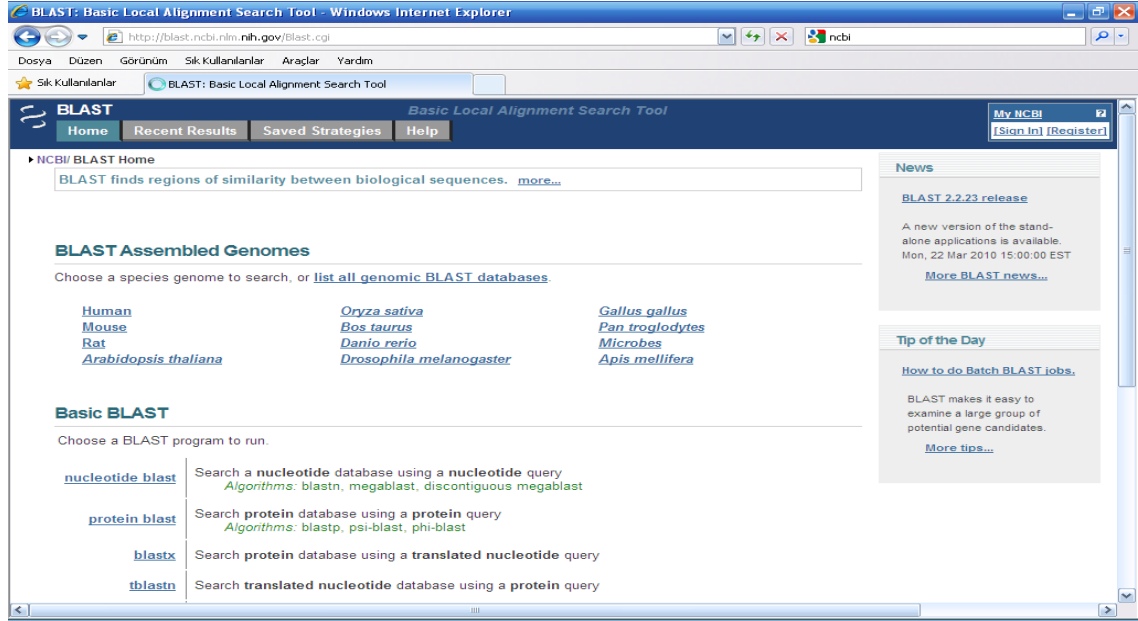
Gen sekansının blastlanmasının amacı, aranan genin diğer genlerle homolojisinin araştırılması ve diğer genlerle en az homoloji gösteren kısımdan cDNA probu üretilmesinin sağlanmasıdır. Bu yapıldığı takdirde hemen işin başında diğer birçok genin interferansı giderilmiş olur.

Blastlama için <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi> web sayfasına girildi (Şekil 3.7). “Nucleotide blast” tuşuna basıldı. Şekil 3.8’deki web sayfası açıldı. Şekil 3.6’de seçilen ilgili genin sekansı, “Enter Query Sequence” altındaki kutu içine yapıştırıldı.

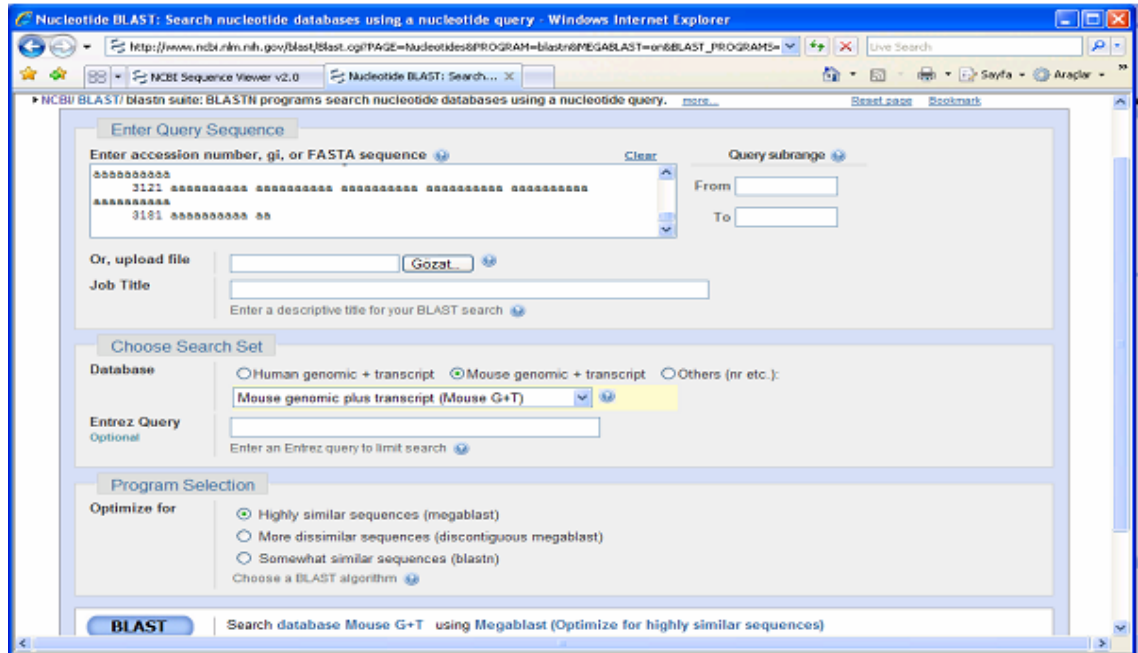
**Database** : Mouse genomic + transcript

**Optimize for** : Highly similar sequences (megablast)

seçildi. “BLAST” tuşuna basılarak sorgu başlatıldı. Daha sonra homolojinin olup olmadığı anlaşıldı (Şekil 3.9 ve Şekil 3.10).



Şekil 3.7. Blastlamanın yapıldığı web sayfasının girişi. “Nucleotide blast” tuşuna basılarak işlem başlatıldı.



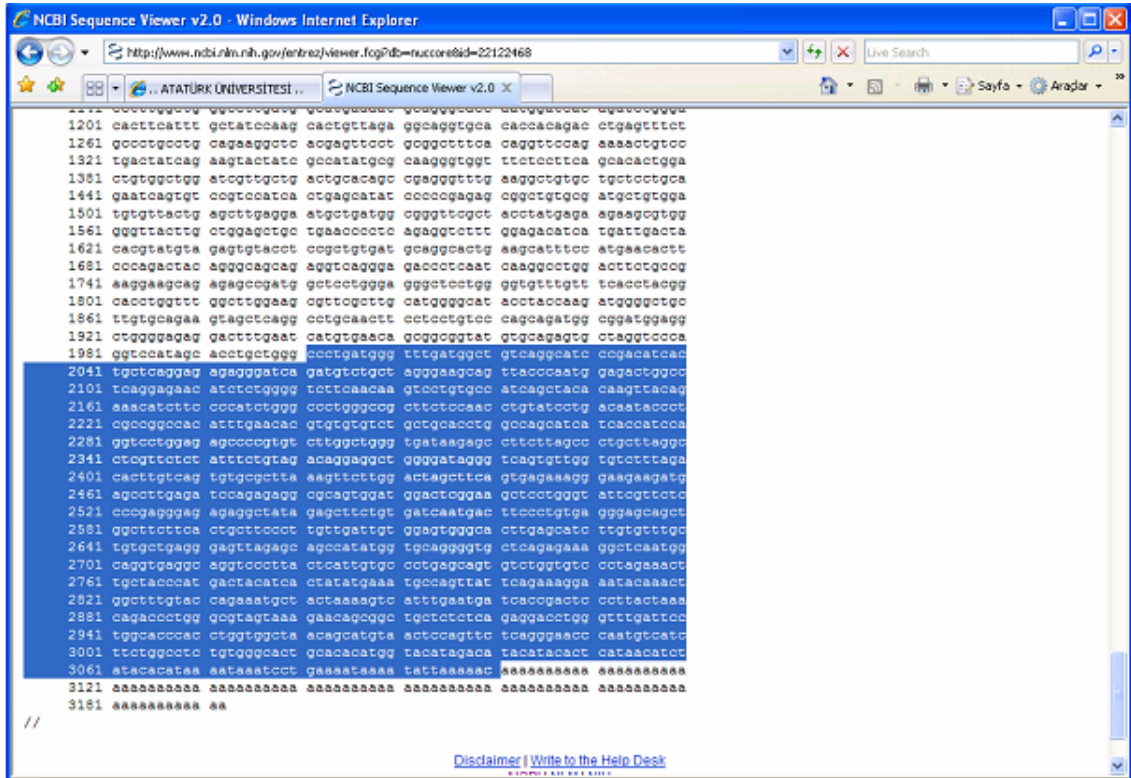
Şekil 3.8. Blastlamanın yapıldığı web sayfasının açılmış hali. İlgili yerler dolduruldu ve “BLAST” tuşuna basıldı.





Bu sonuca göre genin spesifik probunu elde etmek için gen sekansında en iyi bölge seçimi yapılmalıdır. Bunun için Şekil 3.9'a göre 2000–3100 arasındaki bölgede, bu bölgenin tamamına karşılık olarak diğer genlerle homolojinin daha az bulunduğu anlaşılmaktadır. Bu yüzden bu bölge içinde spesifik cDNA probunun hazırlanması idealdir ve bu bölge seçilmiştir (Şekil 3.11). Bu sekans kopyalanarak primer programında ilgili yere kopyalandı.

Genelde prob hazırlamada belirli bir genin tüm cDNA'sı yerine, cDNA'nın belirli bir kısmının elde edilmesi ve çoğaltılması istenir. Ancak bu cDNA'nın büyüklüğü amaca uygun olarak ayarlanmalıdır. Örnek olarak, *in situ* hibridizasyon yöntemiyle gen ekspresyon analizi için cDNA probu, yaklaşık 1000 nükleotid uzunluğunda olmalıdır. 500 nükleotidin altındaki problarla sonuç alınması çok zordur.



Şekil 3.11. Mus musculus lanosterol sentaz (Lss) geni için, diğer genlerle en az homolojinin olduğu ve baz sıralamasında 2000–3100 arasındaki bölgeden seçilen cDNA parçası

### 3.5.3. cDNA probu için primer dizaynı

Primer dizaynı için [http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3\\_www.cgi](http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi) web sayfasına girildi. Şekil 3.11’de kopyalanan gen sekansı, kaynak sekans kutusuna yapıştırıldı ve aşağıdaki bilgiler girildi (Şekil 3.12):

Sequence ID	: NM_146006
Product Size Ranges	: 851–1000
Primer Size	: Min: 19 Opt: 20 Max: 21
Primer Tm	: Min: 57.0 Opt: 60.0 Max: 61.0 Max Tm Dif: 100
Primer GC%	: Min: 20.0 Opt: 50 Max: 80.0

“Pick primers” tuşuna basıldı. Seçilen primerler ekrana geldi (Şekil 3.13 ve Şekil 3.14). Primer seçiminde bu yöntem için, primerin A veya T ile başlaması G ve C ile sonlanması idealdir. Yine 4 veya daha fazla nükleotidin peş peşe gelmesi nonspesifik bağlanmaya yol açabilir. Bundan kaçınılmalıdır. Bu nedenlerle programın verdiği primerler her zaman uygun olmayabilir. Bu durumda programın verdiği bölgenin civarında primer dizaynı yapıldı. Bu örnekte primerler aşağıdaki gibi seçildi:

**Left (forward) primer (20 baz): TCCTGTGCCATCAGCTACAC**

**Right (revers) primer (20 baz): AGGCCAGAAGATGACATTGG**

Son kontrol olarak iki işlem yapıldı:

a) Seçilen her iki primer için ayrı ayrı olarak, başka genlerle homolojinin olup olmadığının belirlenmesi amacıyla blastlama yapıldı. Bu işlem aynen bölüm 3.5.2’de açıklandığı gibi uygulandı. Sonuçlar Şekil 3.15–3.18’de verildi.

b) Left ve right primerlerin başlangıç noktaları belirlendi. cDNA probu olan bu bölge seçilerek blastlandı (Şekil 3.19) ve diğer genlerle homoloji olup olmadığı belirlendi (2132–3009 nolu bazlar) (Şekil 3.20).

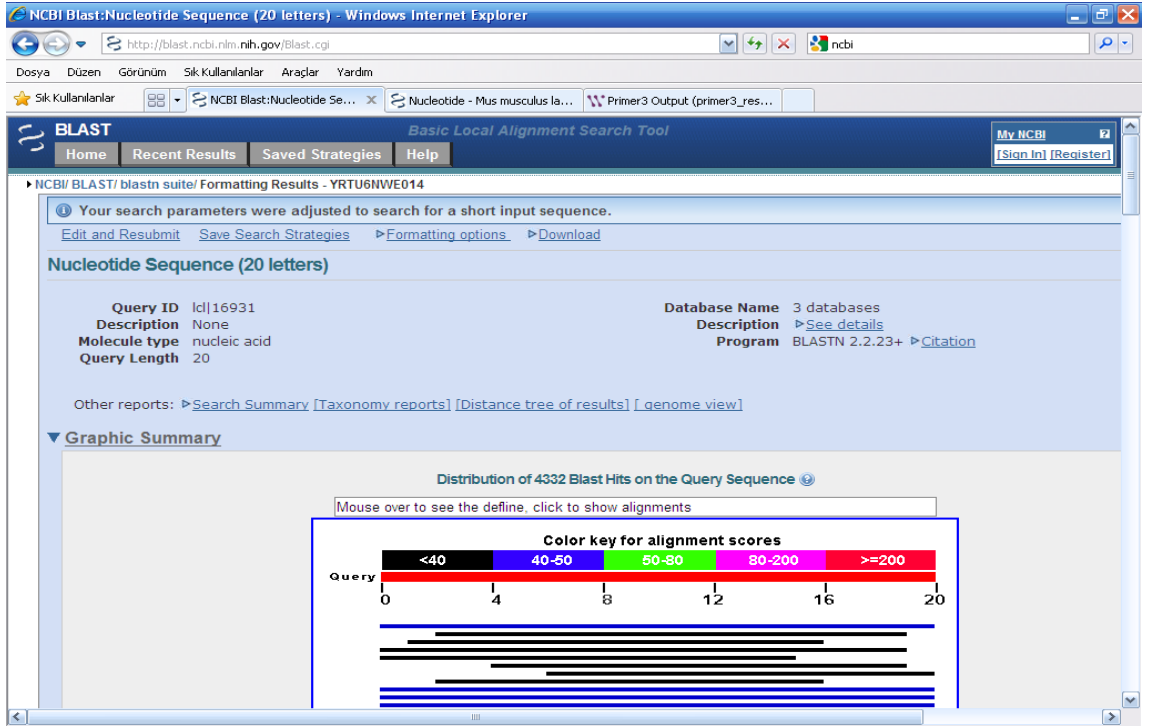
Bu iki kontrol beraberce yapılabilir. Başka genlerle homoloji göstermediği anlaşılırsa bu

primerler emniyetle kullanılabilir. Şekil 3.20’den görüleceği gibi bu cDNA probu için aranan gene ait blastlama sonucu vardır. Oldukça güzel bir sonuç olarak görünmektedir. Nitekim cDNA prob üretimi de sorunsuz yapılmıştır.

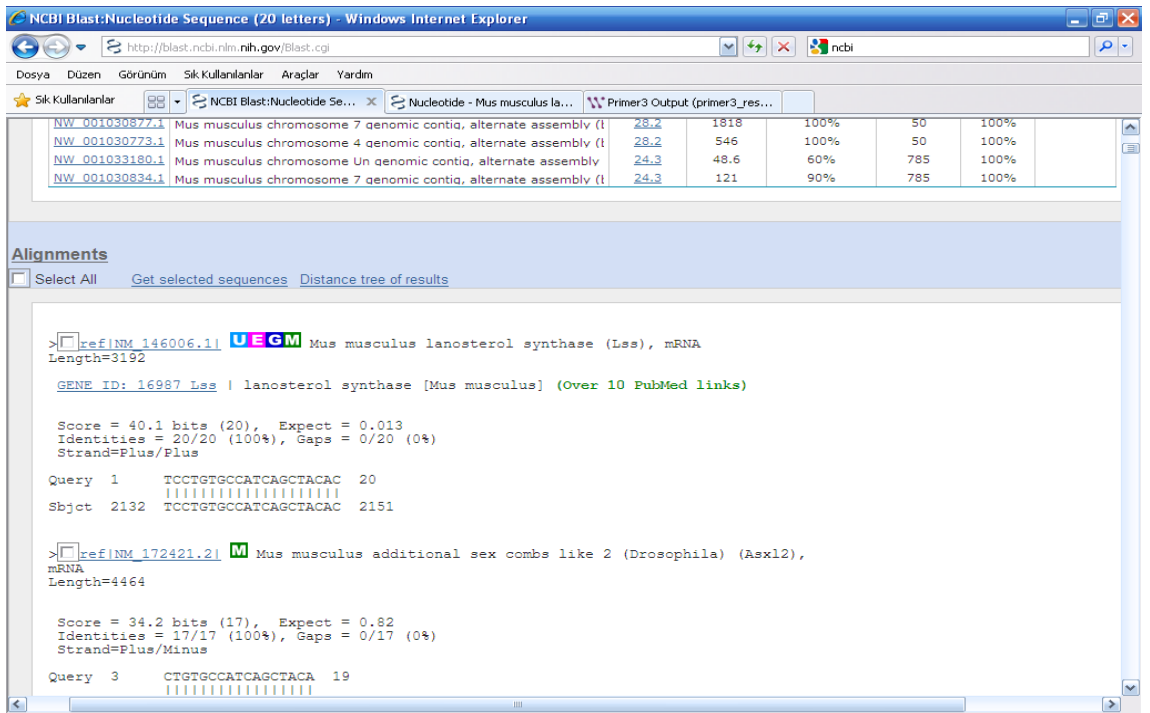
The image shows a screenshot of the Primer3 web interface in a Windows Internet Explorer browser. The browser title is "Primer3 Input (version 0.4.0) - Windows Internet Explorer". The address bar shows "http://frodo.wi.mit.edu/primer3/". The page content includes a navigation menu with links like "Checks for mispriming in template.", "disclaimer", "Primer3 Home", "Primer3plus interface", "cautions", and "FAQ/WIKI". The main heading is "Primer3 (v. 0.4.0) Pick primers from a DNA sequence." Below this, there is a text area for pasting the source sequence, which contains a DNA sequence with line numbers 2041 to 2281. There are three checkboxes: "Pick left primer, or use left primer below:" (checked), "Pick hybridization probe (internal oligo), or use oligo below:" (unchecked), and "Pick right primer, or use right primer below (5' to 3' on opposite strand):" (checked). Below these are three empty text input fields. There are "Pick Primers" and "Reset Form" buttons. At the bottom, there are several input fields: "Sequence Id" (Lss), "Targets" (empty), "Excluded Regions" (empty), "Product Size Ranges" (851-1000), "Number To Return" (5), "Max 3' Stability" (9.0), "Max Repeat Mispriming" (12.00), and "Pair Max Repeat Mispriming" (24.00).

**Şekil 3.12.** Primer belirlemek için kullanılan site: Gen sekansı yukarıdaki kutucuğa yapıştırıldı. Genin kısa adı, istenen cDNA boyutu, primer büyüklüğü vb. bilgiler girildi.





Şekil 3.15. Left (forward) primerin blastlama sonucunun üst tarafı



Şekil 3.16. Left (forward) primerin blastlama sonucunda ortaya çıkan ve ilgili primerlerle homolojisi olan genler. Query: Verilen primerin baz sırası, Sbjt: Homoloji gösteren genin ilgili bölgesi







### 3.6. RNA-İzolasyonu

cDNA kütüphanesi oluşturmak için, genin cinsine göre fare embriyosu veya yavru farelerden önce mRNA saflaştırıldı; revers transkriptaz enzimi ve diğer kimyasallar vasıtası ile cDNA kütüphanesi elde edildi. Fare beyni (P0) ve 14,5 günlük fare embriyosundan RNazol kiti ile izole edilen total RNA, cDNA kütüphanesi üretilmesinde kullanıldı.

Hazırlanmış olan dokudan 1,5 ml'lik bir ependorf tüpüne 40 mg alındı. Sırası ile şu işlemler yapıldı:

1. Tüpün içindeki doku üzerine 800 µl RNazol B eklendi ve tamamen homojenize oluncaya kadar karıştırıldı. Karıştırma işleminden sonra 80 µl kloroform eklenerek 20 s karıştırıcıda karıştırıldı, daha sonra 5 dakika buz içinde bekletildi.
2. Bekleme işleminin ardından 15 dakika 4°C'de 15.000 rpm'de santrifüj edildi ve süpernatant atıldı ve 1 ml %75'lik etanol ile tekrar çökelek çözümlenerek 5 dakika 4°C'de 15.000 rpm'de santrifüj edildi. Süpernatant tekrar atılarak çökelek 5 dakika vakum kurutucusunda kurutuldu. Daha sonra 87 µl DEPC su ile 60°C 10 dakika bekletilerek çözüldü.
3. Bu işlemin ardından 99 µl su ve 1 µl hazırladığımız çözeltiden alınıp 260 nm'de konsantrasyon ölçüldü ve hesaplama aşağıdaki şekilde yapıldı.

$$\mu\text{g} = \text{OD}_{260} \times 310$$

4. Konsantrasyona bakıldıktan sonra DNase kullanılarak ortamdaki DNA'lar parçalandı. Bunun için aşağıdaki karışım hazırlandı.

RNA ekstraktı	86 µl
10x PCR2 tamponu	10 µl
RNase inhibitörü	2 µl
DNase I (RNase'sız)	2 µl

5. Hazırlanan karışım 37°C'de 30 dakika inkübe edildi. 150 µl DEPC'li su ve 250 µl PIC (fenol: kloroform: izoamil alkol: 25:24:1 şeklinde) alındı ve 30 dakika bekletilen karışım üzerine eklendi. 5 dakika 4°C'de 15.000 rpm'de santrifüj edildi. Süpernatant başka bir tüpe alınıp 250 µl kloroform eklendi. Tekrardan 5 dakika 4°C'de 15.000 rpm'de santrifüj edildi. Süpernatant yine başka bir tüpe aktarıldı ve 750 µl etanol ile 6,25 µl 3 M sodyum asetat eklendi. 30 dakika 4°C'de 15.000 rpm'de santrifüj edildi ve süpernatant atıldı. 1ml etanol çökelek üzerine eklendi ve 5 dakika 4°C'de 15.000 rpm'de santrifüj edildi. Süpernatant atıldı ve vakum kurutucusunda 10 dakika kurutuldu. Son olarakta µl'de 0,5 µg olacak şekilde hesaplama yapıldı ve bulunan miktarda DEPC'li su alınarak 60°C'de 10 dakika bekletilerek çözüldü ve kullanılıncaya kadar -80°C'de saklandı.

### 3.7. cDNA Kütüphanesi Hazırlanması (RT PCR)

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

Karışım 1:

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

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

Karışım 2 (Her bir cDNA stoku için):

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

Karışım 1'de hazırlanan tüp üzerine karışım 2 eklendi ve vortekslendi. Karıştırma işlemini takiben 60 dakika 50°C'de ve daha sonra 85°C'de 5 dakika PCR cihazı içinde inkübe edildi. İnkübasyon sonunda 1 µl RNaseH ilave edildi. PCR cihazıda 20 dakika 37°C'de bekletilerek reaksiyon durduruldu. Hazırlanan ürün -80°C'de saklandı.

### 3.8. Spesifik Genler İçin cDNA Problarının Hazırlanması

Bölüm 3.5'de anlatıldığı şekilde tespit edilen primerlerden, forward primerine T7 promotor sekansı (GCGTAATACGACTCACTATAGGG) ve revers primerine SP6 promotor sekansı (GCGATTTAGGTGACACTATAG) 5' uçlarına eklendi ve sipariş edildi (Krieg and Melton 1987).

Yukarıdaki örnekte lanosterol sentaz geni için primer dizilimleri aşağıdaki gibidir:

**T7 promotor- Left (forward) primer (43 baz):**

GCGTAATACGACTCACTATAGGG TCCTGTGCCATCAGCTACAC

**SP6 promotor Right (revers) primer (41 baz):**

GCGATTTAGGTGACACTATAG AGGCCAGAAGATGACATTGG

cDNA kütüphaneleri ve her gen için spesifik primerler (T7 promotor- forward primer, SP6 promotor-revers primer) kullanılarak, PCR cihazında ilgili cDNA'lar çoğaltıldı. Böylece klonlamaya gerek duymadan; PCR işlemi sonunda çoğaltılan cDNA problemleri ile daha sonraki safhada direkt olarak, antisens mRNA üretilirdi. PCR işleminden sonra agaroz jel elektroforeziyle genin sentezlenip sentezlenmediğı kontrol edildi. Sırası ile yapılan işlemler aşağıda gösterilmiştir.

#### PCR PROGRAMI

LID 105°C WAIT AUTO

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

Reaksiyon için küçük eppendorf PCR (200 µl) tüpü kullanıldı. PCR işleminde ilk önce PCR cihazının kapak sıcaklığı 105°C'ye ayarlandı; daha sonra çalışılan reaksiyon karışımının denatürasyonu için 2 dk 95°C'de bekletildi. Bu işlemin ardından 35 kez tekrarlanacak olan reaksiyon işlemlerine geçildi. Burada birinci olarak 94°C'de 25 sn denatürasyon, 57°C'de 25 sn primerin yapışması ve 72°C'de 1.15 dakika cDNA'nın uzaması yapıldı. Bu işlemlerden sonra son basamak olan 72°C'de 9 dk bekletildi.

**Çizelge 3.2** Belirli bir cDNA için yapılan PCR reaksiyon karışımı;

H <sub>2</sub> O	14 µl
10x Tampon	2,5 µl
Q (enhancer)	5 µl
dNTP'ler (2mM, roche)	0,5 µl
Primer for. (10 pmol/ µl)	1 µl
Primer rev. (10 pmol/ µl)	1 µl
Template (RT-ürünü)	1 µl
Enzim Tag-Polimeraz	0,2 µl

Hazırlanan bu karışım (Çizelge 3.2) yukarıda yapılan PCR programı çalıştırılarak PCR cihazına yerleştirildi. PCR işlemi bittikten sonra agaroz jel (%1'lik) elektroforeziyle genin sentezlenip sentezlenmediğine bakıldı. Elektroforez işleminden sonra DNA konsantrasyonunu bulmak için aşağıdaki formül kullanıldı. cDNA problemleri bu şekilde sentezlenip kontrolde yapıldıktan sonra antisens mRNA hazırlanması için -20°C'ye kaldırıldı.

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

### 3.9. Antisens mRNA Üretimi

Hazırlanan cDNA problemleri üzerinde sırası ile aşağıdaki işlemler yapıldı. Hazırlanan karışım 37°C'de 4–5 saat inkübasyona bırakıldı (Çizelge 3.3).

**Çizelge 3.3.** Antisens mRNA üretimi için ependorf tüpüne yapılan pipetlemeler

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

Daha sonra DNase ile muamele edilerek DNA'nın sindirilmesi sağlandı. Bu amaçla Çizelge 3.4'e göre karışım hazırlandı ve bir önceki basamakta hazırlanıp reaksiyon için inkübasyona bırakılan karışım üzerine eklendi. Bu şekilde reaksiyon durdurularak ortamda kalan cDNA'nın DNase ile parçalanması sağlandı.

**Çizelge 3.4.** DNase karışımının hazırlanması

DNase I (10 U/ µl)	0,1 µl
0,3 M MgCl <sub>2</sub>	0,08 µl
H <sub>2</sub> O	0,82 µl

Karışım 37°C' de 15 dakika inkübasyonda bırakıldıktan sonra RNA çöktürmesi yapıldı. RNA'yı çöktürmek için aşağıdaki işlemler uygulandı;

**a)** Ortama 72 µl 4 M NH<sub>4</sub>CH<sub>3</sub>COO katıldı. Daha sonra 470 µl -80°C'de %100 etil alkol katıldı.

**b)** Bir gece -20°C'de veya 30 dakika -80°C'de bekletildi.

**c)** 20 dakika 13000 rpm'de santrifüj (soğukta) edildi. Santrifüjun ardından süpernatant atıldı. Çökelek üzerine aşağıdaki pipetleme yapıldı.

**d)** 640 µl %70'lik etil alkol (-20°C) katıldı. 20 dakika 13000 rpm'de santrifüj (soğukta) edildi. Tekrardan süpernatant atıldı. Çökelek 22 µl DEPC'li su ile çözüldü.

**e)** Çözeltiden 1 µl alındı, 100 µl destile su ile seyreltilerek 260 nm'de absorbanans ölçüldü ve RNA miktarına bakıldı. Hesaplamaları aşağıdaki formüle göre yapıldı. Bu işlemde seyrelme faktörü 40'dır.

RNA konsantrasyonu (µg/ml)=  $A_{260} \times \text{seyrelme faktörü} \times 40$

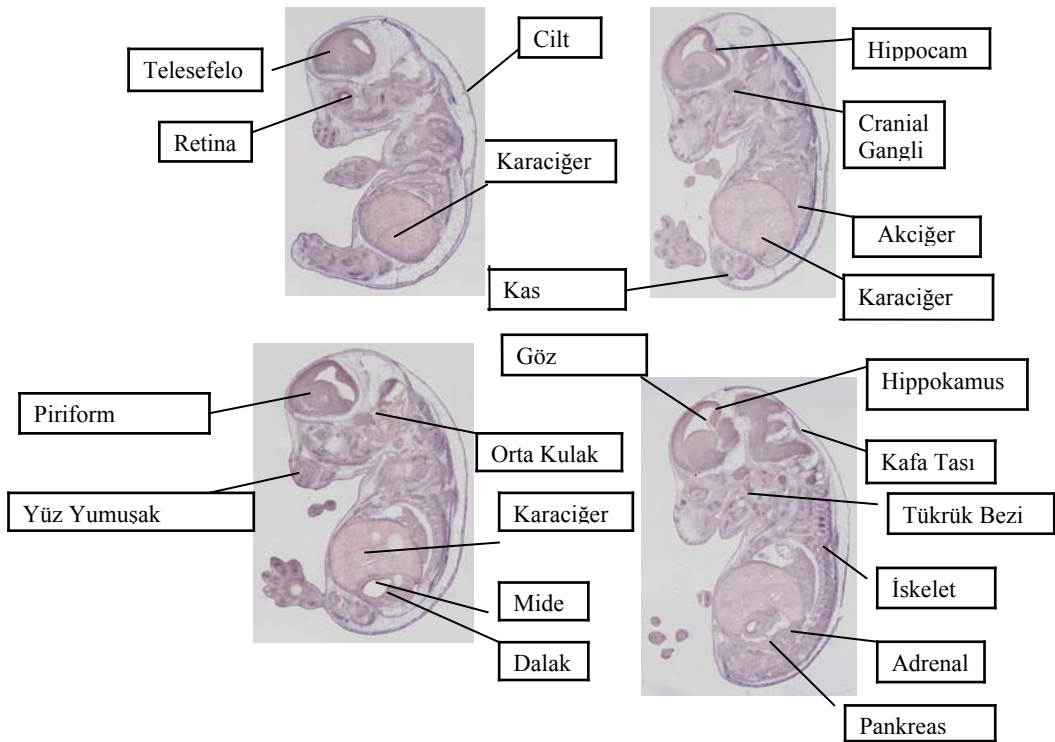
Konsantrasyon ölçme işleminden sonra 2 µl alındı ve agaroz jel elektroforezi (%1'lik) uygulandı. Jelde yürütmeden önce 6 dakika 70°C'de bekletildi ve daha sonra 2 dakika buz içine alındı. Bu işlemi takiben jele yüklenerek yürütüldü.

### **3.10. *In situ* Hibridizasyon (ISH) Yönteminin Uygulanması**

Bu metot, antisens mRNA problemleri kullanılarak; birçok aşamadan oluşan bir prosedür olan, ISH yöntemi ile mRNA'ların hazırlanan dokularla reaksiyona sokulmasıyla ekspresyonların gösterilmesi işlemidir. ISH birçok aşamadan oluşmaktadır. Bunları genel olarak sıralayacak olursak;

1. Örneklerin hazırlanması ve dokunun fiksasyonu,
2. Ön hibridizasyon işlemi, problemlerin ilavesi ve hibridizasyon işlemi,
3. Son hibridizasyon işlemi ve spesifik olmayan bağlanmaların giderilmesi, slaytların bir seri çözeltiden geçirilerek fiks edilmesi ve üzerlerinin lamelle kapatılması, örneklerin mikroskopta incelenip uygun olanlar taranarak genel kullanım için internet ortamına aktarılması.

Slaytların sandviç şeklinde hazırlanmasında kullanılan özel camlar bir gece 180°C sıcaklıktaki fırında bekletildi. Kullanılan bütün çözeltilerin büyük bir kısmı otoklavlandı veya özel şekillerde hazırlandı. RNA'ları korumak için DEPC'li su kullanıldı ve böylece RNase'a karşı korundu. 14,5 günlük fare embriyosu fareden alındıktan sonra OCT (optimal freezing medium) içine gömüldü. Bu amaçla özel alaşımlı kablolar kullanıldı. Bu özel kablolar içine konulduktan sonra ani dondurmayla dondurulan embriyo -70°C saklandı (Herzig *et al.* 2001). Mikroton cihazı kullanılarak lamalar üzerine 14,5 günlük fare embriyoları 20 µm kesitler halinde yayıldı. Alınan kesitler şekil 3.21'deki gibidir.

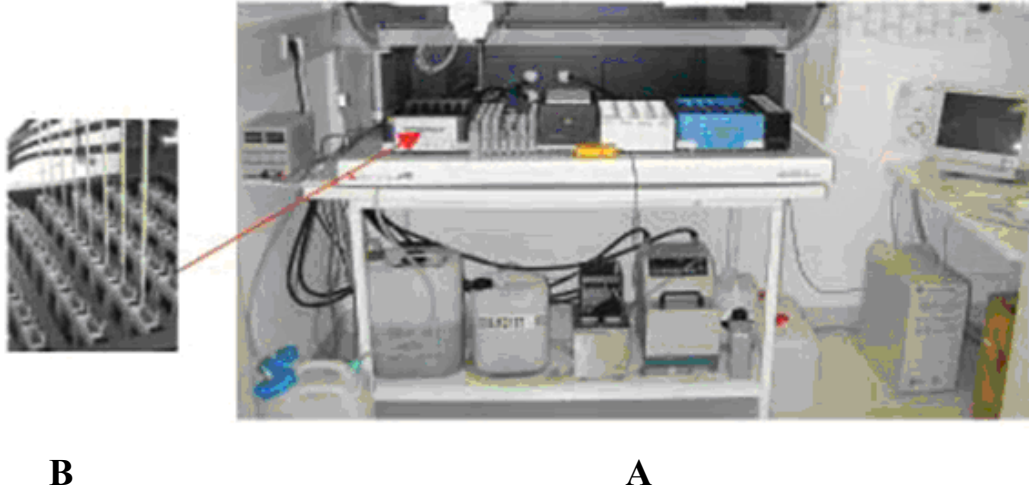


**Şekil 3.21.** 14,5 günlük fare embriyosundaki bazı organ ve yapıların yerlerinin gösterilmesi

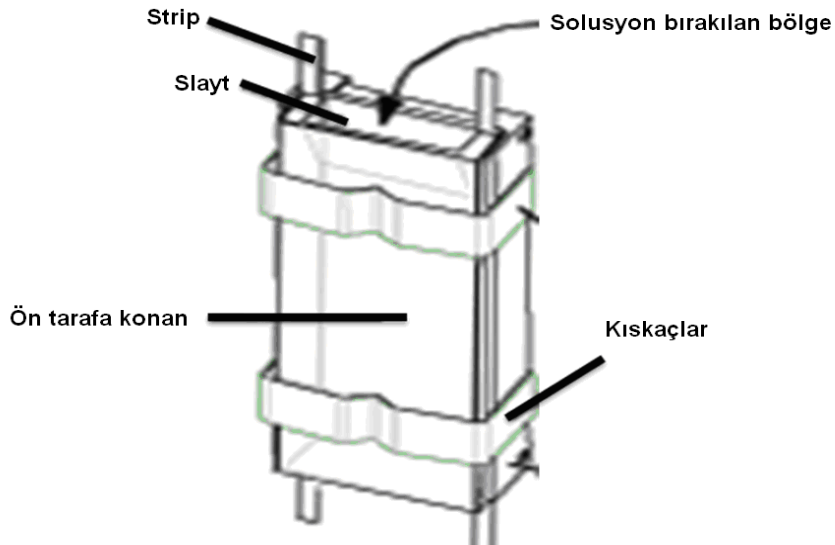
*In situ* hibridizasyon yaparken kullanılan cihazlar değişik şekillerde dizayn edilmiştir. Bunlardan bir tanesi de Tecan Genesis ISH uygun platformudur. Bahsedilen cihaz, Şekil 3.22'deki görünümünden de anlaşılacağı gibi, 2x48'lik özel bölmeden oluşur (aynı anda 96 slayt (Şekil 3.23) kullanılabilir); ön hibridizasyon, hibridizasyon, son hibridizasyon



ve prob ilavesi işlemleri otomatik şekilde yapılır. Cihaz Gemini adlı bilgisayar programı ile kontrol edilir.



**Şekil 3.22.** Tecan Genesis platformu; *in situ* hibridizasyon yapmaya uygun şekli (A) Genesis RSP 150 platformu, (B) İki özel kaptan oluşur. Kapların her birisi 6 bölme içerir, her bir bölmede 8 tane slayt yerleştirilecek kısım vardır.



**Şekil 3.23.** Slaytların hazırlanma şekli (sandviç); slayt resminde slayt ile kullanılan cam arasındaki boşluk 80  $\mu\text{m}$  ve slaytın aldığı toplam hacim ise 400  $\mu\text{L}$ 'dir.

Slaytlar hazırlanıp cihaza yerleştirildi ve sırası ile aşağıdaki işlemler yapıldı. Her bir gen için 4–6 slayt kullanıldı. Her slayta 4 embriyo aktarıldı. Böylece her bir gen için 24–32 fotoğraf elde edildi.

**Çizelge 3.5.** *In situ* hibridizasyon işlemlerinin basamaklar halinde gösterilmesi

**1. Gün:**

Tekrar sayısı	Hacim	Zaman	Kullanılan Çözelti	Sıcaklık
5	300 µl	5 dk	%0,6 H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> in MeOH	24°C
7	300 µl	5 dk	PBS 1	
2	300 µl	5 dk	0,2 M HCl	
4	300 µl	5 dk	PBS	
1	400 µl	5 dk	Proteinase K	
2	300 µl	10 dk	Proteinase K	
7	300 µl	5 dk	PBS	
1	300 µl	10 dk	%4 PFA	↓
7	300 µl	5 dk	PBS	
2	300 µl	15 dk	Hyb-Mix	64°C
1		<b>5 h</b>	Prob ekleme	set 64°C

**2. Gün:**

Tekrar sayısı	Hacim	Zaman	Kullanılan Çözelti	Sıcaklık
5	300 µl	5 dk	5 x SSC	62°C
5	350 µl	10 dk	Formamide I	↓
5	350 µl	12 dk	Formamide II	↓
3	300 µl	8 dk	0,1 x SSC	↓
1	300 µl	8 dk	0,1 x SSC	25°C
4	300 µl	5 dk	NTE 1	
6	300 µl	5 dk	20 mM iodoacetamide	
4	300 µl	5 dk	NTE 2	
2	300 µl	5 dk	TNT 1	
6	300 µl	5 dk	%4 sheep serum	↓
4	200 µl	5 dk	TNT 2	↓

Çizelge 3.5. (devam)

Tekrar sayısı	Hacim	Zaman	Kullanılan Çözelti	Sıcaklık
2	200 µl	5 dk	TNB blocking tamponu 1	
2	200 µl	5 dk	TNT 3	
2	300 µl	5 dk	Maleate yıkama tamponu 1	
2	350 µl	10 dk	Blocking tamponu	
2	300 µl	5 dk	Maleate yıkama tamponu 2	
2	250 µl	5 dk	TNT 4	
2	200 µl	5 dk	TMN 1	
4	200 µl	5 dk	TNT 5	
4	300 µl	10 dk	TNB blocking tamponu 2	
2	350 µl	30 dk	AntiDIG-POD (1:600)	
6	200 µl	5 dk	TNT 6	
1	250 µl	30 dk	Tyramide-biotin	
6	250 µl	5 dk	Maleate yıkama tamponu 3	
2	200 µl	5 dk	TMN 2	
3	200 µl	13 dk	BCIP/NBT	
4	400 µl	5 dk	H <sub>2</sub> O	
1	300 µl		NTE 3	
2	200 µl	10 dk	%4 PFA+ %1 G/A	
4	400 µl		H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	

#### A. Yıkama ve ön hibridizasyon işlemleri;

1. İlk basamakta slaytların üst kısmından 5 kez 5'er dakika %0,6 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (hidrojen peroksit) ilave edilmiş CH<sub>3</sub>OH (metanol) uygulandı ve daha sonra 8 kez %0,05 tween içeren 1xPBS ile yıkandı.

2. Yıkamadan sonra 2 kez 4'er dakika %0,05 tween içeren 0,2M'lık HCl ile muamele edildi. Tekrar 4 kez %0,05 tween içeren 1xPBS ile yıkandı.

3. Bu işlemden sonra 2 kez 10 dakika 1xPK (proteinaz K) tamponu içinde hazırlanmış PK (proteinaz K) uygulandı. Burada proteinaz K'nın konsantrasyonu dokunun türüne göre ayarlandı. 8 kez %0,05 tween içeren 1xPBS ile yıkandı.

4. Slaytlar 1 kez 10 dakika %0,05 tween içeren %4 PFA ile muamele edildi ve 8 kez %0,05 tween içeren 1xPBS ile yıkandı. Bu aşama hem RNA'nın yerini bulması için hem de hücre yapısının korunması için çok önemlidir. Çapraz bağlanmadan dolayı RNA'nın dokuya ulaşılabilirliğine dikkat edilmelidir.

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

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

**C. Spesifik olmayan bağlanmaların giderilmesi;** Prob ile muamele görmüş slaytta bulunan doku üzerine çeşitli solüsyonlar uygulandı ve bundan sonra da renklendirmeden önce çeşitli spesifik reaktifler eklenip renklendirme çözeltisi ile renklendirildi. Bu şekilde slaytın arka planında ortaya çıkan spesifik olmayan ekspresyonların önlenmesine çalışıldı (Çizelge 3.5).

1. 5 kez 6'şar dakika 5x SCC ile yıkandı. Daha sonra 5 kez 12'şer dakika formamid I çözeltisi ile yıkandı ve ardına 5'er kez 10'er dakika formamid II çözeltisi ve 4 kez 8'er dakika 0,1xSSC ile yıkandı. Bunların 3 tanesi 64°C'de ve 1 tanesi de 25°C'de olmak üzere yapıldı.

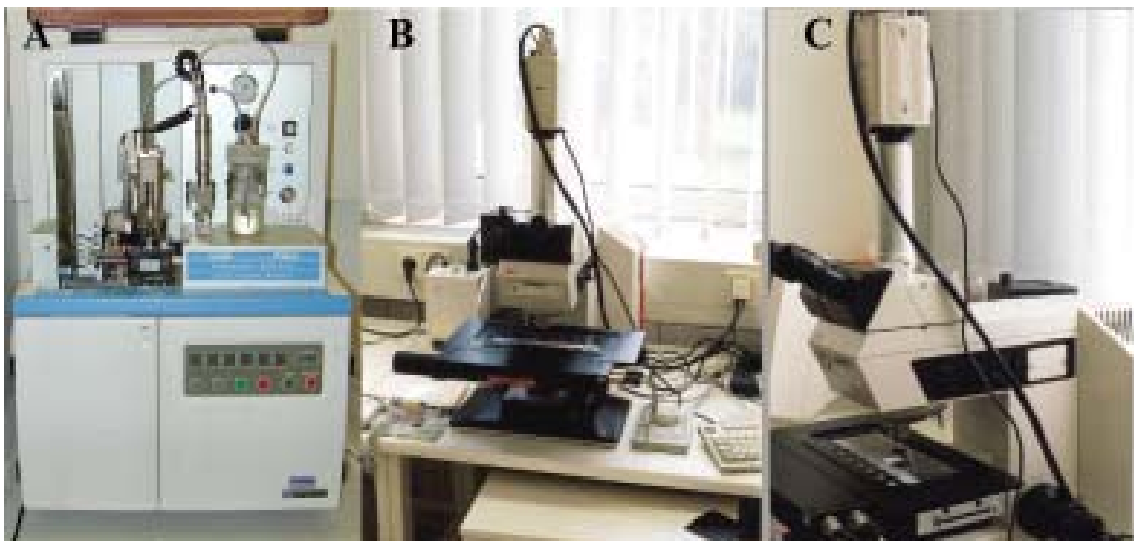
2. Yukarıdaki işlemlerden sonra 4 kez 5'er dakika %0,05 tween içeren 1xNTE ile yıkandı ve 6 kez 5'er dakika iodo asetamid ile yıkandı. Bu basamak çok önemlidir; doku üzerinde bulunan enzimler ve bazı protein rezidülerinin aktiviteleri azaltılır veya tamamen bloke edilir.

3. 4 kez 5'er dakika %0,05 tween içeren 1xNTE ile yıkayıp, 2 kez 5'er dakika %0,05 tween içeren 1xTNT ile de yıkandı ve %4 oranında sheep serum içeren çözelti 6 kez 5'er dakika uygulandı.
4. 4 kez 5'er dakika %0,05 tween içeren 1xTNT ile yıkandı ve daha sonra TNB blocking çözeltisi ile 2 kez 5'er dakika yıkandı. Bu basamakta spesifik olmayan bağlanmalar giderildi. Ardından tekrar 2 kez 5 dakika %0,05 tween içeren 1xTNT ile de yıkandı.
5. 2 kez 5'er dakika %0,05 tween içeren maleat tamponu ile yıkandı ve blocking reaktifi ile 2 kez 10'ar dakika ardından da tekrar 2 kez 5'er dakika %0,05 tween içeren maleat tamponu ile yıkandı.
6. 2 kez 5'er dakika %0,05 tween içeren 1xTNT tamponu, 2 kez 5'er dakika %0,05 tween içeren ve her 1 ml'sinde 0,5 mg levamizol içeren TMN tamponu slaytlara eklendi ve 4 kez 5'er dakika %0,05 tween içeren 1xTNT tamponu ile yıkandı.
7. TNB blocking çözeltisi ile 4 kez 10'ar dakika yıkandı ve 2 kez 30'ar dakika % 0,05 tween içeren antiDIG-POD (TNB tamponu içinde hazırlandı; dilisyon faktörü 600'dür) ile doku reaksiyona sokuldu.
8. 6 kez 5'er dakika %0,05 tween içeren 1xTNT tamponu yıkandı ve 1 kez 30 dakika %0,05 tween içeren Tiamin-Biotin reaktifi ile doku reaksiyona sokuldu. Tiamin-Biotin reaktifi kendi özel solüsyonu ile hazırlandı.
9. 6 kez 5'er dakika %0,05 tween içeren maleat tamponu ile yıkandı ve Neutravidin-alkalin fosfataz (blocking reaktifinin içine dilisyon faktörü 750 olan Neutravidin-alkalin fosfataz konarak hazırlandı) reaktifi ile 2 kez 30'ar dakika muamele edildi ve ardından tekrar 6 kez 5'er dakika %0,05 tween içeren maleat tamponu ile yıkandı. Bu işlemden sonra 4 kez 5 dakika %0,05 tween içeren 1xTNT tamponu ile yıkama yapıldı.

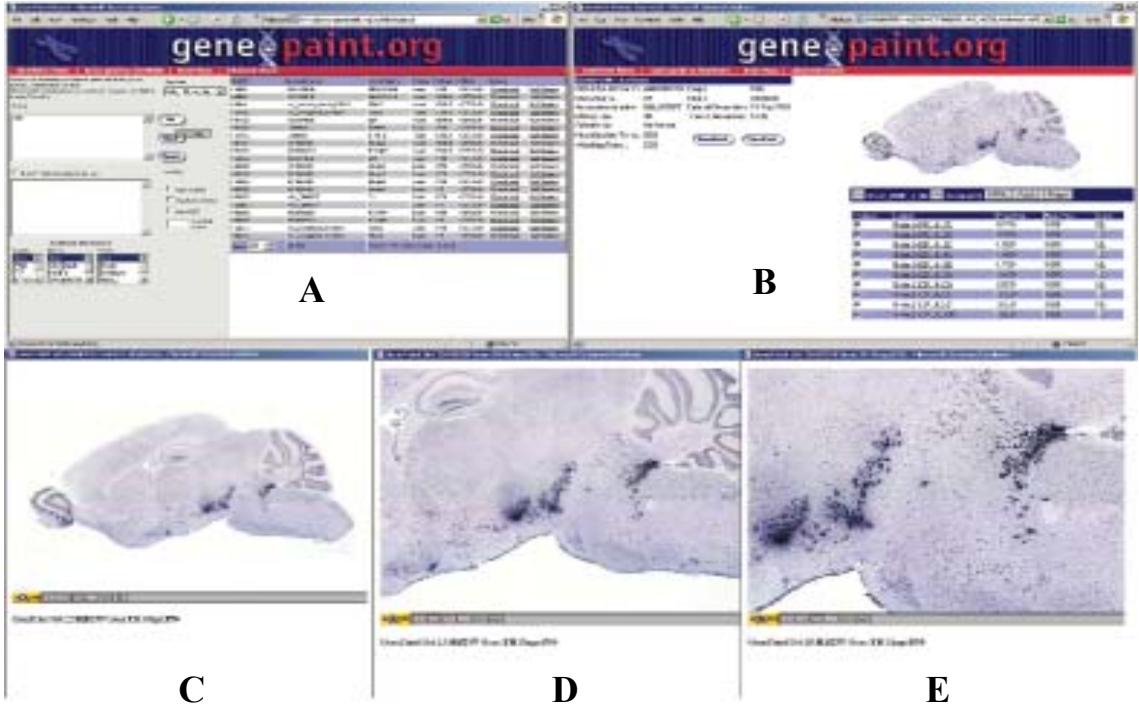
**10.** 2 kez 5'er dakika her 1 ml'sinde 0,5 mg levamizol içeren TMN tamponu ile yıkama yapıldı. 3 kez 13'er dakika renk reaktifi eklendi ve sonra dd H<sub>2</sub>O ile 4 kez 5'er dakika, 1 kez % 0,05 tween içeren 1x NTE, %1 oranında glutaraldehit içeren %4 PFA ile de 1 kez 10 dakika yıkama yapıldı ve son olarak da saf su ile 4 kez yıkama yapılarak işlemler bitmiş oldu. Bu etaptan sonra slaytlar temizlenerek bir gece kurumaya bırakıldı.

### 3.11. Gen Ekspresyon Örneklerinin Değerlendirilmesi

Slaytlar bir gece bekledikten sonra slayt kaplama makinesinde yüzeyleri kaplandı ve daha sonra slaytlar temizlenerek kuruması için 37°C'de bir gece bekletildi. Bundan sonra slaytlar mikroskopta incelendi ve sonra taranarak bilgisayar ortamına alındı (Şekil 3.24). Bu işlem; ilk önce slaytları parçalar halinde tarama yapan cihazda taranması ve daha sonra mozaik oluşturma programı ile birleştirildi. Ekspresyon için doku üzerinde oluşan mavi noktalara yani renk reaksiyonun sonucunda oluşan renge bakıldı, kullanılan reaktiflerden dolayı mavi renk oluştuğundan ona göre yorum yapıldı (Şekil 3.25). Bilgisayar ortamına aktarılan çalışmalar detaylı şekillerde incelenerek çeşitli çalışmalarda kullanıldı ve bununla beraber diğere bilim adamlarının kullanımına açıldı ([www.genepaint.org](http://www.genepaint.org)).



**Şekil 3.24.** (A): Slayt kaplama makinesi, (B): Slaytları iclemede kullanılan mikroskop, (C): Slaytların taramasının yapıldığı scanner cihazı



**Şekil 3.25.** Genepaint.org sorgu ve sonuç sayfası

\* (A) Bölümlerin hazırlandığı kısım (B) Burada seçilen gen resmi programı kullanarak büyütülüp, küçültülerek ilgilenilen kısmın incelenmesini sağlar. (C-E) Yetişkin fare beyindeki bazı ekspresyon örnekleri görülmektedir. Biyolojik verilere, internetteki yerel sayfalardan ve bu web sayfasından ulaşılabilir (Discala *et al.* 1999; Ringwald *et al.* 2000).

#### 4. ARAŞTIRMA ve BULGULAR

Fare genomu içinde bulunan kolesterol ve safra asitleri sentezi genleri <http://www.genome.ad.jp> web sayfasından bakılarak belirlendi. Kolesterol sentezi için bu enzim genleri şunlardır: 3-hidroksi-3-metilglutaril-koenzim A reduktaz (Hmgcr), fosfomevalonat kinaz (Pmvk), mevalonat (difosfo) dekarboksilaz (Mvd), izopentenil-difosfat delta izomeraz (Idi1), geranilgeranil difosfat sentaz 1 (Ggps1), farnesil difosfat sentaz (Fdps), farnesil difosfat farnesil transferaz1(Fdft1), skualen epoksidaz (Sqle), lanosterol sentaz (Lss), 24-dehidrokolesterol redüktaz (Dhcr24), sitokrom P450, 51.aile (Cyp51), transmembran 7, 2.aile üyesi (Tm7sf2), sterol-C4-metil oksidaz-like (Sc4mol), NAD(P) bağlı steroid dehidrogenaz-like (Nsdhl), hidroksisteroid (17-beta) dehidrogenaz 7 (Hsd17b7), fenilalkilamin  $Ca^{2+}$  antagonist (emopamil) bağlanma proteini (Ebp), sterol-C5-desaturaz (fungal ERG3, delta-5-desaturaz) homolog (Sc5d), 7-dehidrokolesterol redüktaz (Dhcr7), sitokrom P450, 27. aile, b alt ailesi, polipeptid 1 (Cyp27b1). Safra asitleri sentezi için enzim genleri şunlardır: Karboksil ester lipaz (Cel), lizozomal asit lipaz A (Lipa), sterol O-açıltransferaz 2 (Soat2), sitokrom P450, 7. aile, alt birim a, polipeptid 1 (Cyp7a1), steroid 5 alfa-reduktaz 2 (Srd5a2), sitokrom P450, 27.aile, alt birim a, polipeptid 1 (Cyp27a1), alkol dehidrogenaz 1 (I.sınıf) (Adh1), alkol dehidrogenaz 7 (IV. sınıf), mu ya da sigma polipeptid (Adh7), alkol dehidrogenaz 5 (III. sınıf), chi polipeptid (Adh5), aldehit dehidrogenaz 2, mitokondrial (Aldh2), aldehit dehidrogenaz 3. aile, A2 alt aile (Aldh3a2), aldehit dehidrogenaz 9, alt birim A1 (Aldh9a1), alkol dehidrogenaz 1.aile, üye B1 (Aldh1b1), çözünmüş taşıyıcı 27.aile (yağ asit taşıyıcı), üye 5 (Slc27a5), hidoksiaçıl-koenzim A dehidrogenaz/3-ketoaçıl-koenzim A tiyolaz/enoil-koenzim A hidrotaz (üçfonksiyonlu protein), beta altbirimi (Hadhb), asetil-koenzim A açıltransferaz 1B (Acaa1b). Bu çalışmada kolesterol sentezi için 19 gen, safra asitleri sentezi için 16 gen için primer dizaynları Bölüm 3.5’de açıklandığı şekilde hazırlandı. Hepsinin primer uzunlukları 20 baz olacak şekilde yapıldı. Çizelge 4.1 ve Çizelge 4.2’de gösterildiği gibi bütün genler için hazırlanan spesifik primerler verilmiştir. Right (reverse) primerin 5’ ucuna SP6 (GCGATTTAGGTGACACTATAG) promotor ile left (forward) primerin 5’ ucunda T7 (GCGTAATACGACTCACTATAGGG) promotor takılarak spesifik primerler hazırlanmış oldu.



**Çizelge 4.1.** Kolesterol sentezi genleri için primer dizayn sonuçlarına ait bilgiler

LoliD	LoliSy	LoLi Name	Accession no	FW Position	RW Position	Probe Length	T7+FP	SP6+RP
15357	Hmgcr	3-hidroksi-3-metilglutaril-koenzim A reduktaz	NM_008255	2930	3860	931	GCGTAATACGACTCACTATAGG GTGCTGTGTTCTGGAAAGATC	GCGATTTAGGTGACACTATAGT TATGGGCCCATTAAGGAG
68603	Pmvk	Fosfomevalonat kinaz	NM_026784	25	950	926	GCGTAATACGACTCACTATAGG GAGCTTTAGGCTGGTGAAGC	GCGATTTAGGTGACACTATAGA CACACAGGGAAACACCACC
192156	Mvd	Mevalonat(difosfo) dekarboksilaz	NM_138656	38	898	861	GCGTAATACGACTCACTATAGG GAGCCTCAGGACCTAATGGTC	GCGATTTAGGTGACACTATAGA GCGGTGGACTAGCTGGATG
319554	Idi1	İzopenenil -difosfat delta izomeraz	NM_145360	589	1485	897	GCGTAATACGACTCACTATAGG GTTTGAAGAAAGGCAGCCAGTG	GCGATTTAGGTGACACTATAGA GCATTACGCTGGGTTGAG
14593	Ggps1	Geranilgeranil difosfat sentaz 1	NM_010282	2	984	983	GCGTAATACGACTCACTATAGG GTGGCGTATTTTCTGCACTG	GCGATTTAGGTGACACTATAGA CCTACATCCTCCAGGACTG
110196	Fdps	Farnesil difosfat sentaz	NM_134469	35	959	925	GCGTAATACGACTCACTATAGG GTGTAAGCCGCAAACATCTTG	GCGATTTAGGTGACACTATAGT CTGGCGCTGTTGAGGAGAG
14137	Fdft1	Farnesil difosfat farnesil transferaz 1	NM_010191	1091	1976	886	GCGTAATACGACTCACTATAGG GAGCAGGTCATCTCCAAGATC	GCGATTTAGGTGACACTATAGT GACCGCACTGCCTGCTTC
20775	Sqle	Skualen epoksidaz	NM_009270	98	983	886	GCGTAATACGACTCACTATAGG GTCCGAGACAGCCATTCCTC	GCGATTTAGGTGACACTATAGA AGCCAATAAGAGGCAAAGC
16987	Lss	Lanosterol sentaz	NM_146006	2132	3009	878	GCGTAATACGACTCACTATAGG GTCCTGTGCCATCAGCTACAC	GCGATTTAGGTGACACTATAGA GGCCAGAAGATGACATTGG
74754	Dhcr24	24-dehidrokolesterol redüktaz	NM_053272	2111	2972	862	GCGTAATACGACTCACTATAGG GTGCCTTGGAGTTTCACCTGC	GCGATTTAGGTGACACTATAGT TTCAACACGAGGCTTTCCC
13121	Cyp51	Sitokrom P450, 51. aile	NM_020010	2274	3148	875	GCGTAATACGACTCACTATAGG GTCGTGTAGTTGGGCCACTTC	GCGATTTAGGTGACACTATAGG GCCATAAATGAGTGCTGCT
73166	Tm7sf2	Transmembran 7, 2. aile üyesi	NM_028454	36	948	913	GCGTAATACGACTCACTATAGG GTCCGTGTCTGATGCAGAGCC	GCGATTTAGGTGACACTATAGA GGCTGTAGGTGAATGGTAC
66234	Sc4mol	Sterol-C4-metil oksidaz-like	NM_025436	753	1660	908	GCGTAATACGACTCACTATAGG GACCATACGTTTGCTGGAAAC	CGATTTAGGTGACACTATAG ACCTGACACACAAAGACAAG
18194	Nsdhl	NAD(P) <sup>+</sup> bağlı steroid dehidrogenaz-like	NM_010941	1074	1936	863	GCGTAATACGACTCACTATAGG GTGGATGGCCTATTACCTTGC	GCGATTTAGGTGACACTATAGT GCCAAGCAGCCATCATCTC
15490	Hsd17b7	Hidroksisteroid(17-beta) dehidrogenaz 7	NM_010476	1612	2487	876	GCGTAATACGACTCACTATAGG GAATGTGTTGGGCCACAAGC	GCGATTTAGGTGACACTATAGA AGTTAAGGTTATGACTACC
13595	Ebp	Fenilalkilamin Ca <sup>2+</sup> antagonist (emopamil) bağlanma proteini	NM_007898	608	1598	991	GCGTAATACGACTCACTATAGG GAAGCGCTAGAGCTGAGCGGA	GCGATTTAGGTGACACTATAGT CACTCATATGTTGAGTG

**Çizelge 4.1. (devam)**

<b>LoliD</b>	<b>LoliSy</b>	<b>LoLi Name</b>	<b>Accession no</b>	<b>FW Position</b>	<b>RW Position</b>	<b>Probe Length</b>	<b>T7+FP</b>	<b>SP6+RP</b>
235293	Sc5d	Sterol-C5-desaturaz (fungal ERG3, delta-5-desaturaz) homolog	NM_172769	629	1570	942	<b>GCGTAATACGACTCACTATAGG</b> <b>GTGGACGGCTTCCTCAGAGTC</b>	<b>GCGATTTAGGTGACACTATAGA</b> <b>GTAAGGTGCCTCTGTATAG</b>
13360	Dhcr7	7-dehidrokolesterol redüktaz	NM_007856	1202	2196	995	<b>GCGTAATACGACTCACTATAGG</b> <b>GAGCTGTCTTCAATGGACGAC</b>	<b>GCGATTTAGGTGACACTATAGT</b> <b>TATCTAGACAGAATAGATG</b>
13115	Cyp27b1	Sitokrom P450, 27. aile, b alt ailesi, polipeptid 1	NM_010009	1423	2360	938	<b>GCGTAATACGACTCACTATAGG</b> <b>GACGGAGCTGCATCGGGAGAC</b>	<b>GCGATTTAGGTGACACTATAGA</b> <b>AGAACCAAGGTAGCGGAGG</b>

**Çizelge 4.2.** Safra asitleri sentezi genleri için primer dizaynı sonuçlarına ait bilgiler

LoliD	LoliSy	LoLi Name	Accession no	FW Position	RW Position	Probe Lenght	T7+FP	SP6+RP
12613	Cel	Karboksil ester lipaz	NM_009885	492	1379	888	CGGTAATACGACTCACTATAG GGTGTGGACCCTTGGGTTTCC	GCGATTTAGGTGACACTATAG TGGAGGTCATCAGCATGGTC
16889	Lip1	Lizozomal asit lipaz A	NM_021460	579	1546	968	CGGTAATACGACTCACTATAG GGAAGGCTGCACCATAGGTTTC	GCGATTTAGGTGACACTATAG TGCACAGCACATATGCACCG
223920	Soat2	Sterol O-açıltransferaz 2	NM_146064	333	1248	916	CGGTAATACGACTCACTATAG GGACCCAAGAGTTACACCCTGG	GCGATTTAGGTGACACTATAG AGGTGCGGTAGTAGTTGGAG
13122	Cyp7a1	Sitokrom P450, 7. aile, a alt aile, polipeptid 1	NM_007824	88	1008	921	CGGTAATACGACTCACTATAG GGATTGCTGTGGTAGTGAGCTG	GCGATTTAGGTGACACTATAG ATCACTTCTTCAGAGGCTG
94224	Srd5a2	Steroid 5 alfa-reduktaz 2	NM_053188	61	799	739	CGGTAATACGACTCACTATAG GGAGCAGCTACCAGCTGTGAAC	GCGATTTAGGTGACACTATAG TTGAGGTAGAACCCTGTGGTG
104086	Cyp27a1	Sitokrom P450, 27. aile, a alt ailesi, polipeptid 1	NM_024264	5	972	968	CGGTAATACGACTCACTATAG GGTGGATAGGGCTCATAGTCTC	GCGATTTAGGTGACACTATAG TCTGGCCAGTTTCTCTGTAG
11522	Adh1	Alkol dehidrogenaz 1 (I. sınıf)	NM_007409	493	1295	803	CGGTAATACGACTCACTATAG GGACTTTATCAGCACCAGCACC	GCGATTTAGGTGACACTATAG AAGAGCAAAGATTAAGGCTG
11529	Adh7	Alkol dehidrogenaz 7 (IV. sınıf), mu ya da sigma polipeptid	NM_009626	954	1853	900	CGGTAATACGACTCACTATAG GGATGGTTGATGCCCTCTCATC	GCGATTTAGGTGACACTATAG ATCTCCAGACATGGCTGTGC
11532	Adh5	Alkol dehidrogenaz 5 (III. sınıf), chi polipeptid	NM_007410	567	1483	917	CGGTAATACGACTCACTATAG GGTGTGAACACTGCCAAGGTGG	GCGATTTAGGTGACACTATAG TCGGCTATTCTAAACCCATG
11669	Aldh2	Aldehit dehidrogenaz 2, mitokondrial	NM_009656	670	1606	937	CGGTAATACGACTCACTATAG GGATTGGCGGATCTCATTGAAC	GCGATTTAGGTGACACTATAG TCCAAAGATCTCCTCCTTGG
11671	Aldh3a2	Aldehit dehidrogenaz 3. aile, A2 alt aile	NM_007437	1989	2868	880	CGGTAATACGACTCACTATAG GGAACCTGCAGGTGGTATGTCC	GCGATTTAGGTGACACTATAG ATTGCTATAACCGCCAATG
56752	Aldh9a1	Aldehit dehidrogenaz 9, A1 alt aile	NM_019993	379	1382	1004	CGGTAATACGACTCACTATAG GGAGACCATCAACAACGGGAAG	GCGATTTAGGTGACACTATAG TGGATGTCCCTGGTGAAGAC
72535	Aldh1b1	Aldehit dehidrogenaz 1.aile, üye B1	NM_028270	1350	2196	847	CGGTAATACGACTCACTATAG GGTCTTCATCAAACCCACAGTC	GCGATTTAGGTGACACTATAG TTGTCCAACCTGTGTCCATTG
26459	Slc27a5	Çözünmüş taşıyıcı 27.aile (yağ asit taşıyıcı), üye 5	NM_009512	1370	2231	862	CGGTAATACGACTCACTATAG GGTGGGAATTCTACGGATCCAC	GCGATTTAGGTGACACTATAG ACCCGGACAACCTTGTGAAG
231086	Hadhb	Hidoksiacil-koenzimA dehidrogenaz/3ketoacilkoenzimAtiyolaz/enoil-koenzimA hidrotaz(üçfonksiyonluprotein), beta altbirimi	NM_145558	521	1444	924	CGGTAATACGACTCACTATAG GGTGTGAGTTAATGTCTGATG	GCGATTTAGGTGACACTATAG TAAGCTCCACAATCATAGC
235674	Acaa1b	Asetil-koenzim A açıltransferaz 1B	NM_146230	579	1490	912	CGGTAATACGACTCACTATAG GGATGGGAATATTTCTTCCCGC	GCGATTTAGGTGACACTATAG ATTAAAGTGCTGTGACACAC

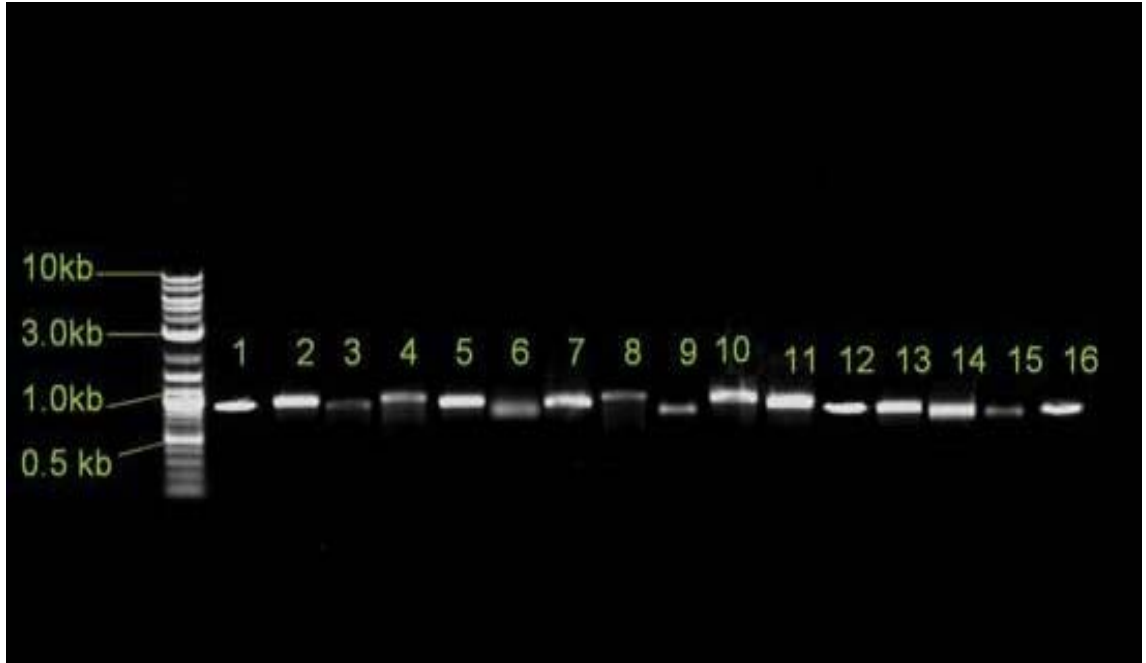
#### 4.1. Spesifik Genler için cDNA Problarının Agaroz Elektroferez Sonuçları

Primer dizaynından sonra spesifik cDNA probları yapılarak bunlardan spesifik antisens mRNA'ları üretildi. Bütün üretilen cDNA kalıplarında reverse primerin 5' ucunda SP6 ve antisens mRNA kullanıldı. Bu amaçla antisens mRNA üretiminde SP6 polimerazdan yararlandı. Şekil 4.1 ve şekil 4.2'de çalışılan genlere ait cDNA problarının jelde yürütülmesi sonucunda elde edilen jel fotoğrafları verilmiştir. Elektroferez işlemlerinde 10 kb'lık DNA markerı kullanıldı. Bu problar üretildikten sonra -80°C'ye bırakıldı. Kolesterol ve safra asitleri sentezi için ayrıca 14,5 günlük fare embriyosu alınarak medium içine gömüldü ve daha sonra kroyostat kesim cihazı ile bu doku için kesitler hazırlandı. Hazırlanan bu dokular ISH'da kullanılmak üzere -80°C'ye bırakıldı.



**Şekil 4.1.** Kolesterol sentezi için spesifik genler için yapılan cDNA problarına ait agaroz elektroferezi sonucu

\*1.) Hmgcr 2.) Ggps1 3.) Pmvk 4.) Fdps 5.) Idi1 6.) Mvd 7.) Fdft1 8.) Tm7sf2 9.) Nsdhl 10.) Sc4mol 11.) Sqle 12.) Cyp51 13.) Dher24 14.) Lss 15.) Hsd17b7 16.) Ebp 17.) Dher7 18.) Sc5d 19.) Cyp27b1



**Şekil 4.2.** Safra asitleri sentezi için spesifik genler için yapılan cDNA problemlerine ait agaroz elektroforezi sonucu

\*1.) Cel 2.) Soat2 3.) Adh7 4.) Cyp7a1 5.) Aldh3a2 6.) Adh1 7.) Hadhb 8.) Lipa 9.) Srd5a2 10.) Aldh9a1 11.) Cyp27a1 12.) Aldh2 13.) Acaa1b 14.) Slc27a5 15.) Aldh1b1 16.) Adh5

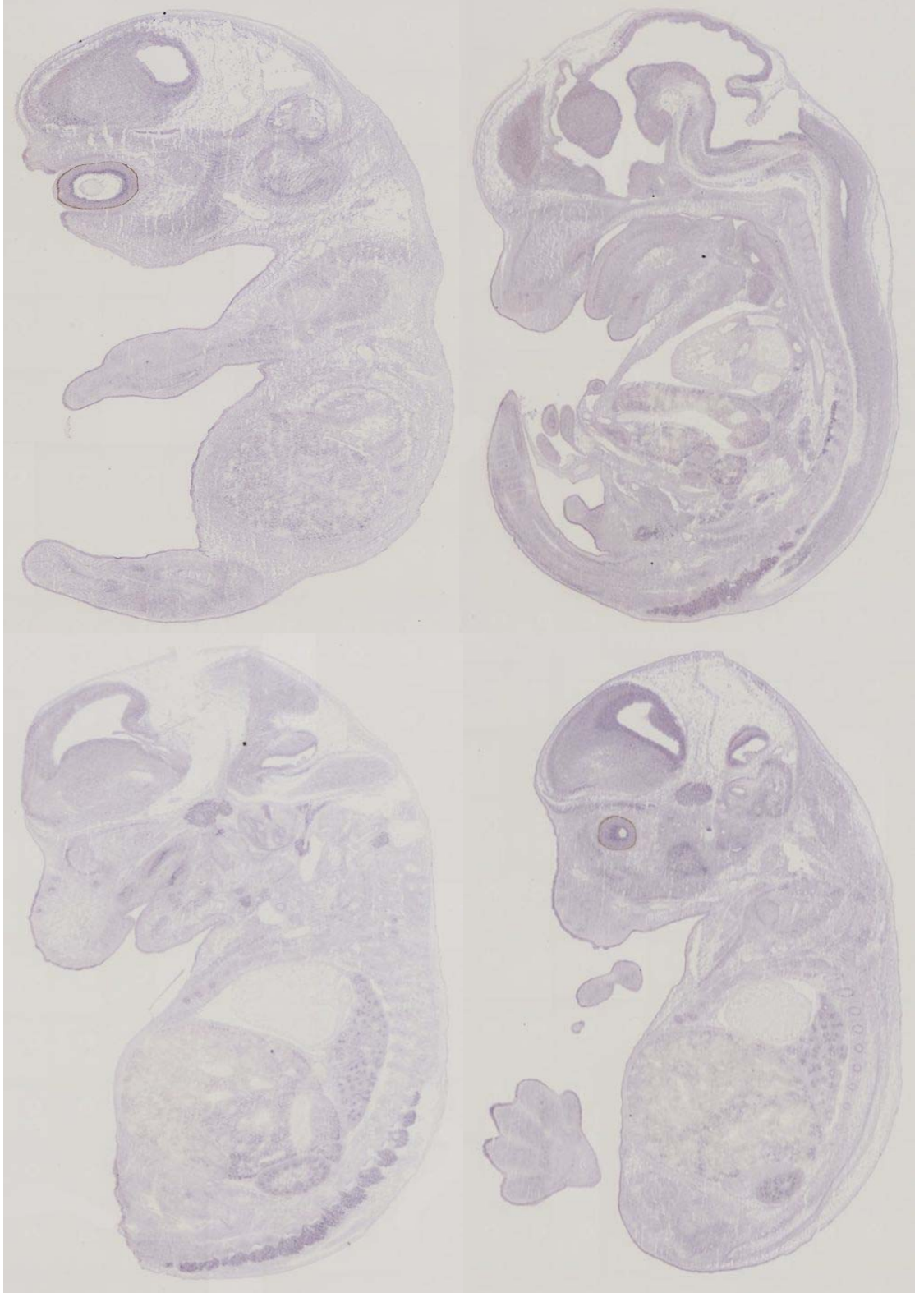
#### 4.2. *In situ* Hibridizasyon Sonuçları

Spesifik cDNA problemleri kullanılarak bunlardan Bölüm 3.9’da anlatıldığı şekilde spesifik antisens mRNA’ları üretildi. Bütün antisens mRNA problemlerinin üretilmesinde SP6 polimerazı kullanıldı. Çünkü bütün üretilen cDNA kalıplarında reverse primerin 5’ ucunda SP6 bulunmaktadır ve *in situ* hibridizasyon işlemi için antisens mRNA hazırlanmaktadır.

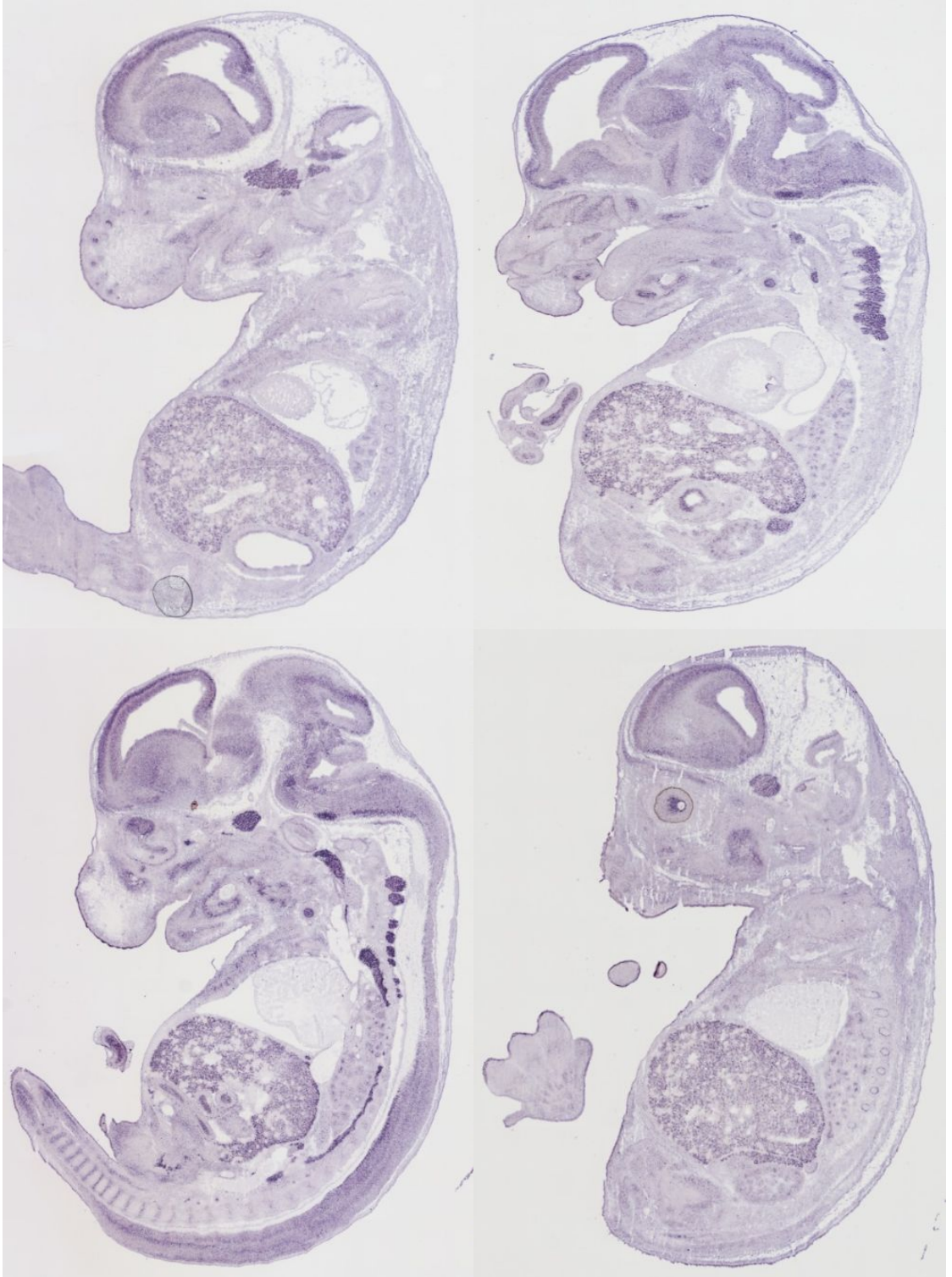
Kolesterol ve safra asitleri sentezi genleri için 14,5 günlük fare embriyosu ekspresyon yorumları ve ekspresyon çalışmaları sonucu <http://www.genepaint.org/> web sayfasına aktarılmıştır. Çalıştığımız kolesterol ve safra asitleri sentezi için tüm genlerden sadece 5’er gene ait fotoğraflar verilmiştir (Şekil 4.3-Şekil 4.12). Diğer çalışılan genlere ait ekspresyon sonuçlarına ulaşılabilecek kod numaraları Çizelge 4.3–4.4’de gösterilmiştir.



**Şekil 4.3.** Sitokrom P450, 27. aile, b alt ailesi, polipeptid 1 (Cyp27b1) geninin 14,5 günlük fare embriyosu üzerinde farklı kesimlerde yapılan *in situ* hibridizasyon işlemlerinde elde edilen sonuçlar

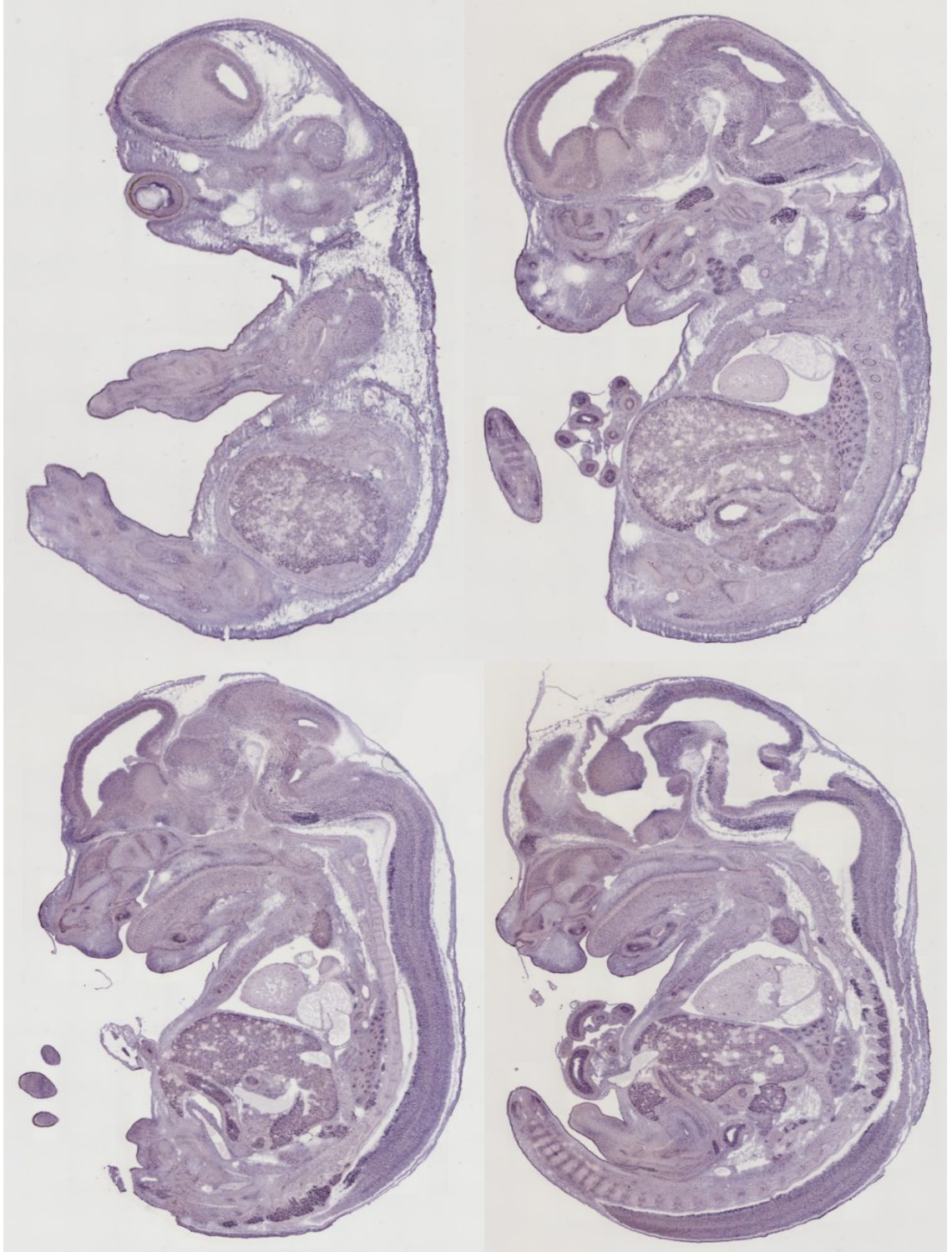


**Şekil 4.4.** Mevalonat (difosfo) dekarboksilaz (Mvd) geninin 14,5 günlük fare embriyosu üzerinde farklı kesimlerde yapılan *in situ* hibridizasyon işlemlerinde elde edilen sonuçlar

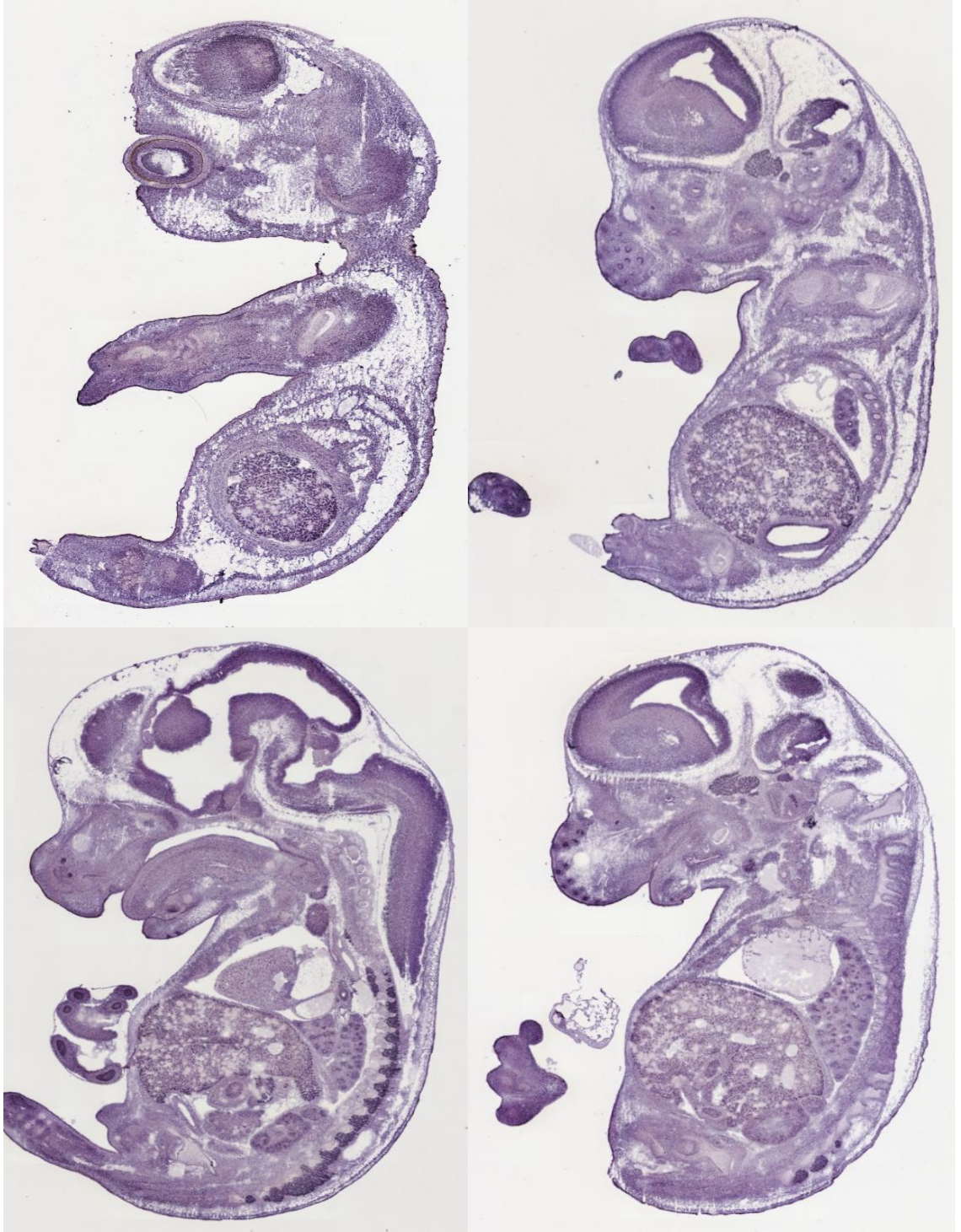


**Şekil 4.5.** Farnesil difosfat farnesil transferaz1 (Fdft1) geninin 14,5 günlük fare embriyosu üzerinde farklı kesimlerde yapılan *in situ* hibridizasyon işlemlerinde elde edilen sonuçlar

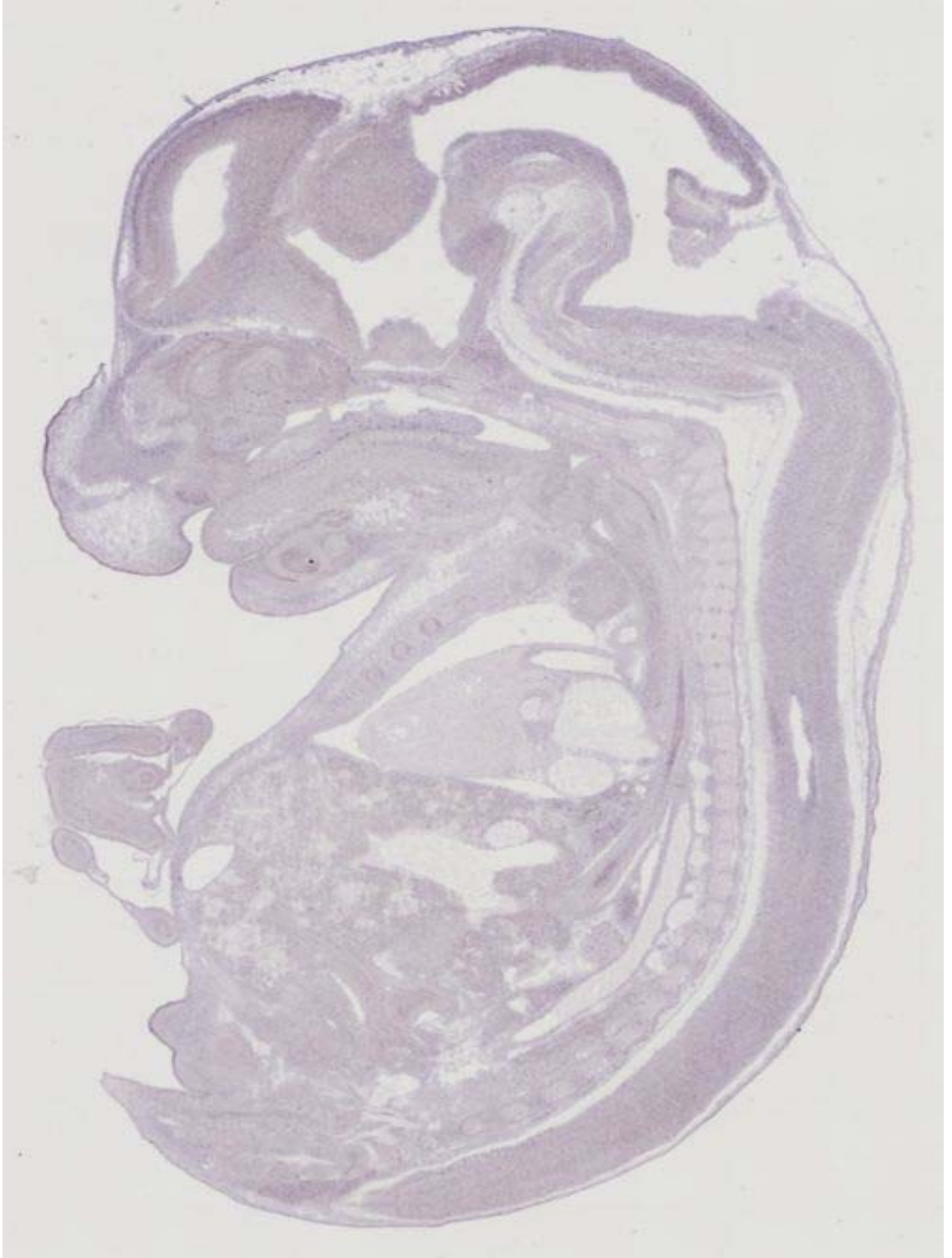




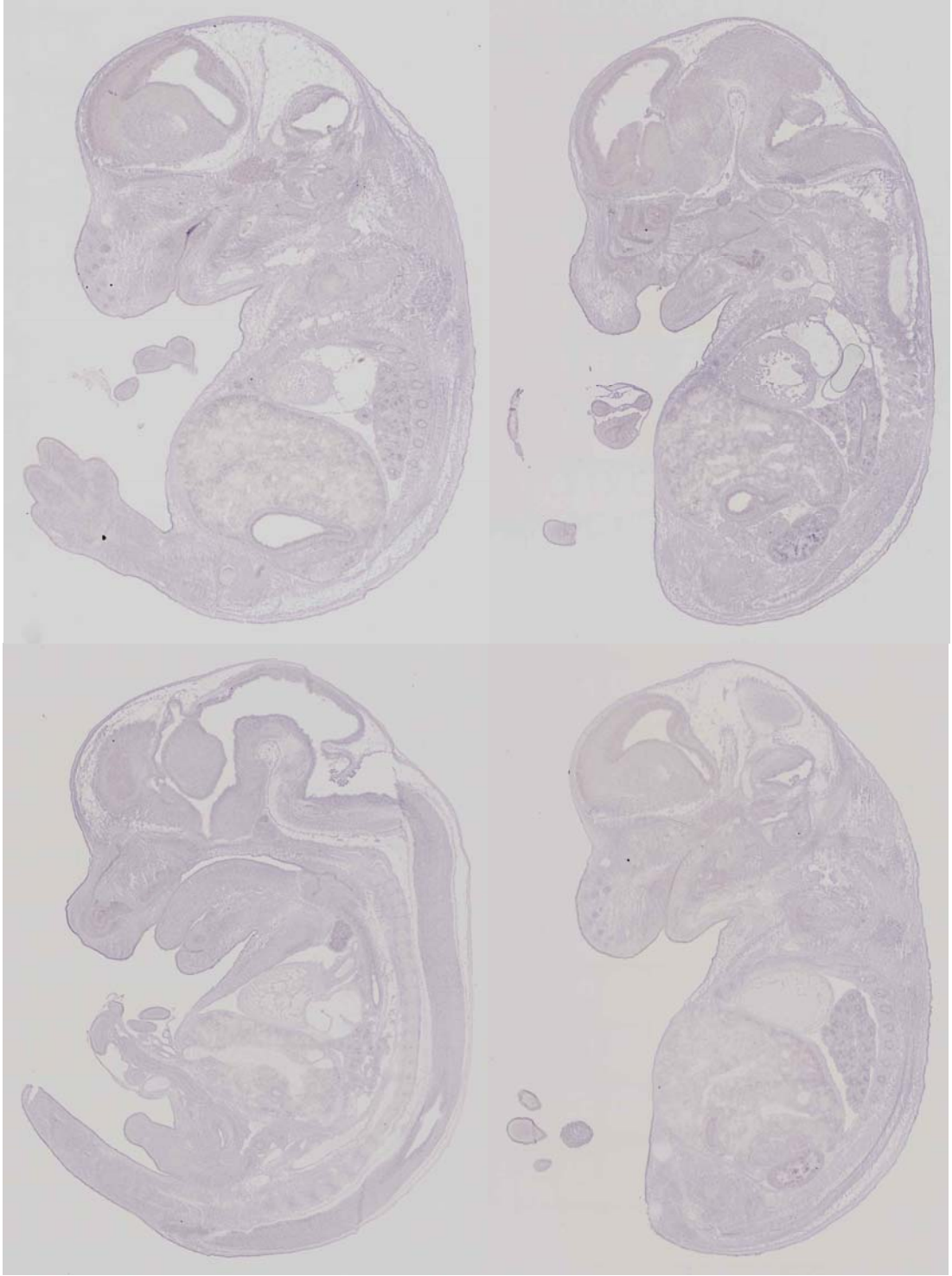
**Şekil 4.6.** Skualen epoksidaz (Sqle) geninin 14,5 günlük fare embriyosu üzerinde farklı kesimlerde yapılan *in situ* hibridizasyon işlemlerinde elde edilen sonuçlar



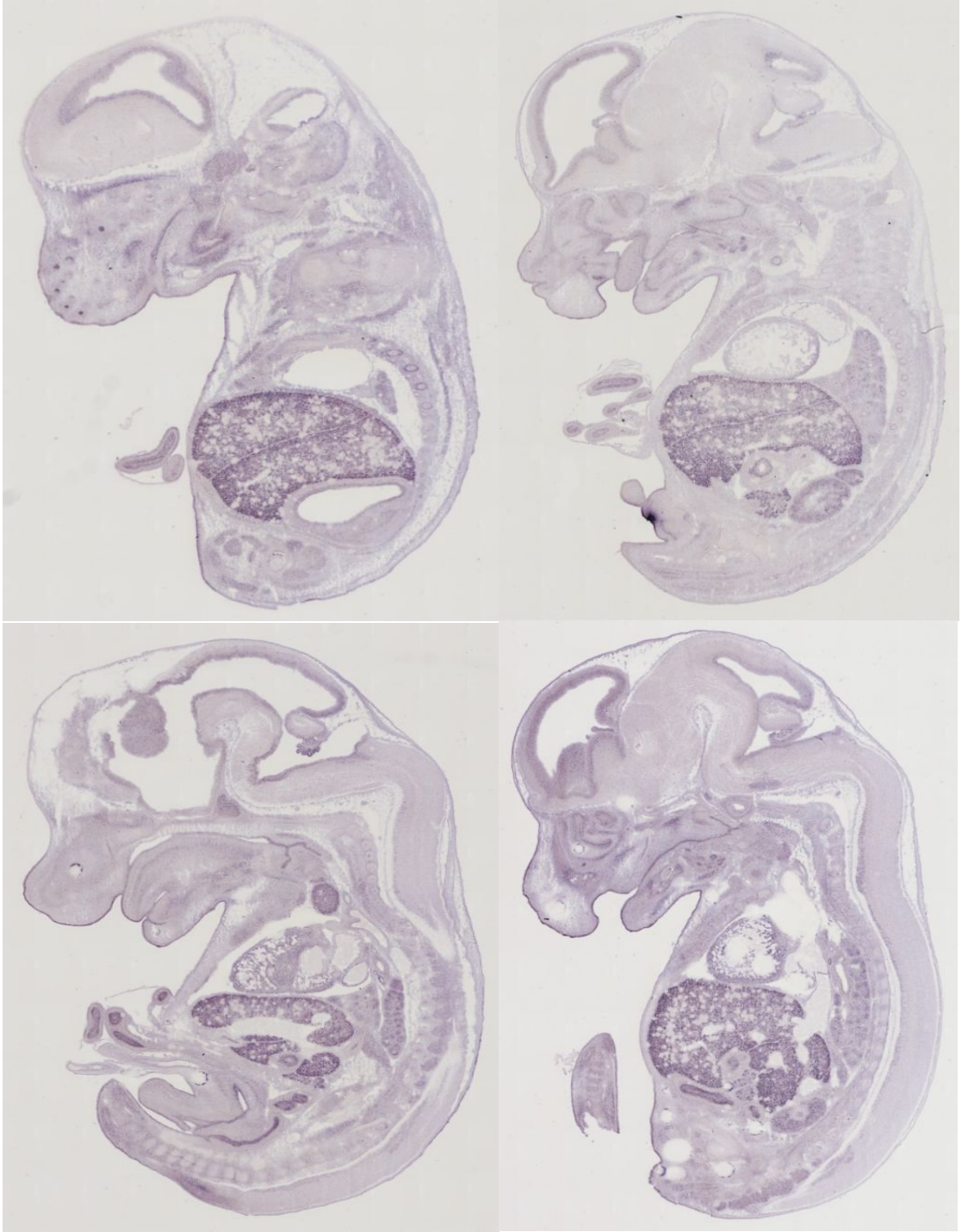
**Şekil 4.7.** 24-dehidrokolesterol redüktaz (Dchr24) geninin 14,5 günlük fare embriyosu üzerinde farklı kesimlerde yapılan *in situ* hibridizasyon işlemlerinde elde edilen sonuçlar



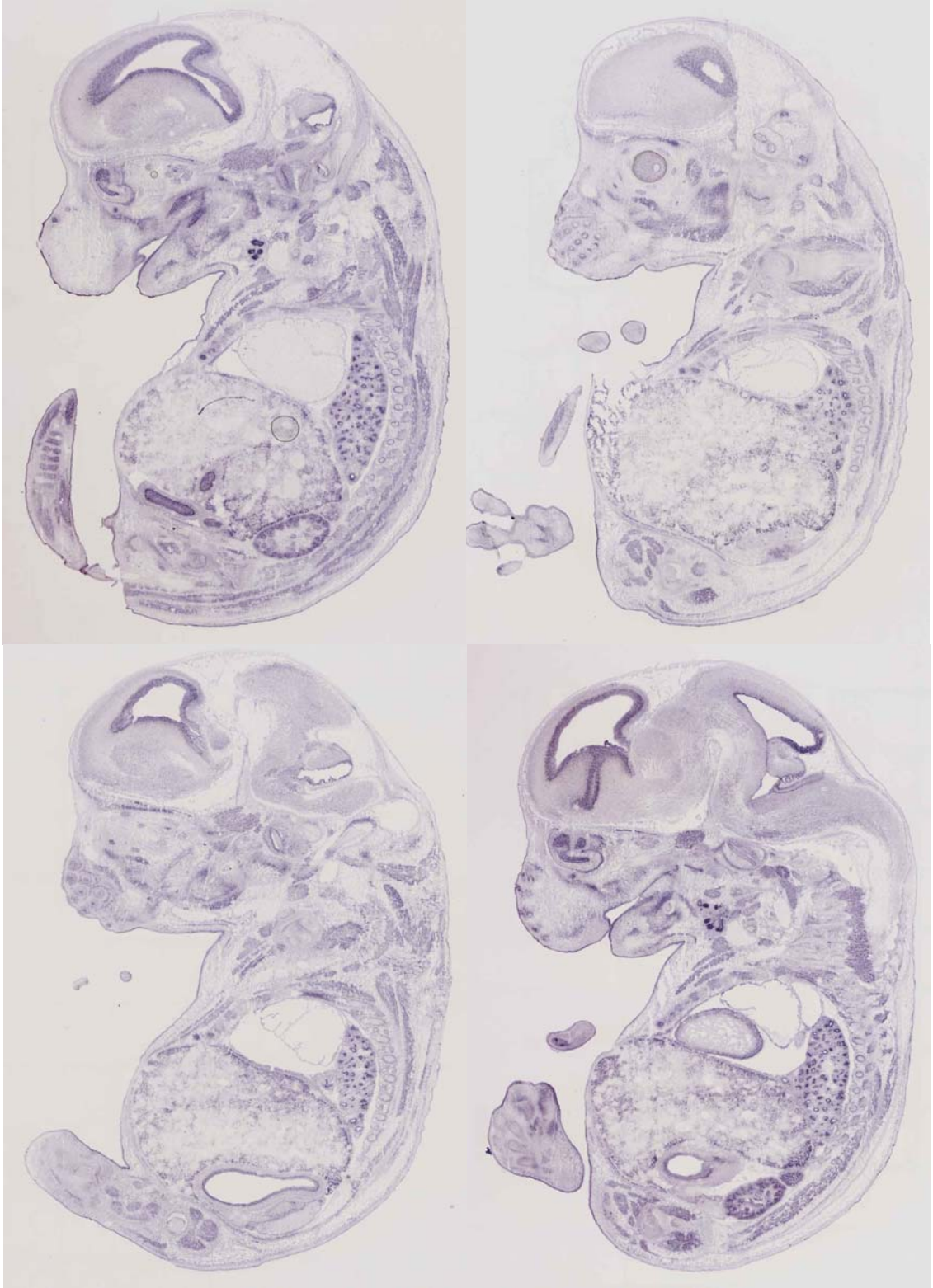
**Şekil 4.8.** Sitokrom P450, 7. aile, alt birim a, polipeptid 1 (Cyp7a1) geninin 14,5 günlük fare embriyosu üzerinde farklı kesimlerde yapılan *in situ* hibridizasyon işlemlerinde elde edilen sonuçlar



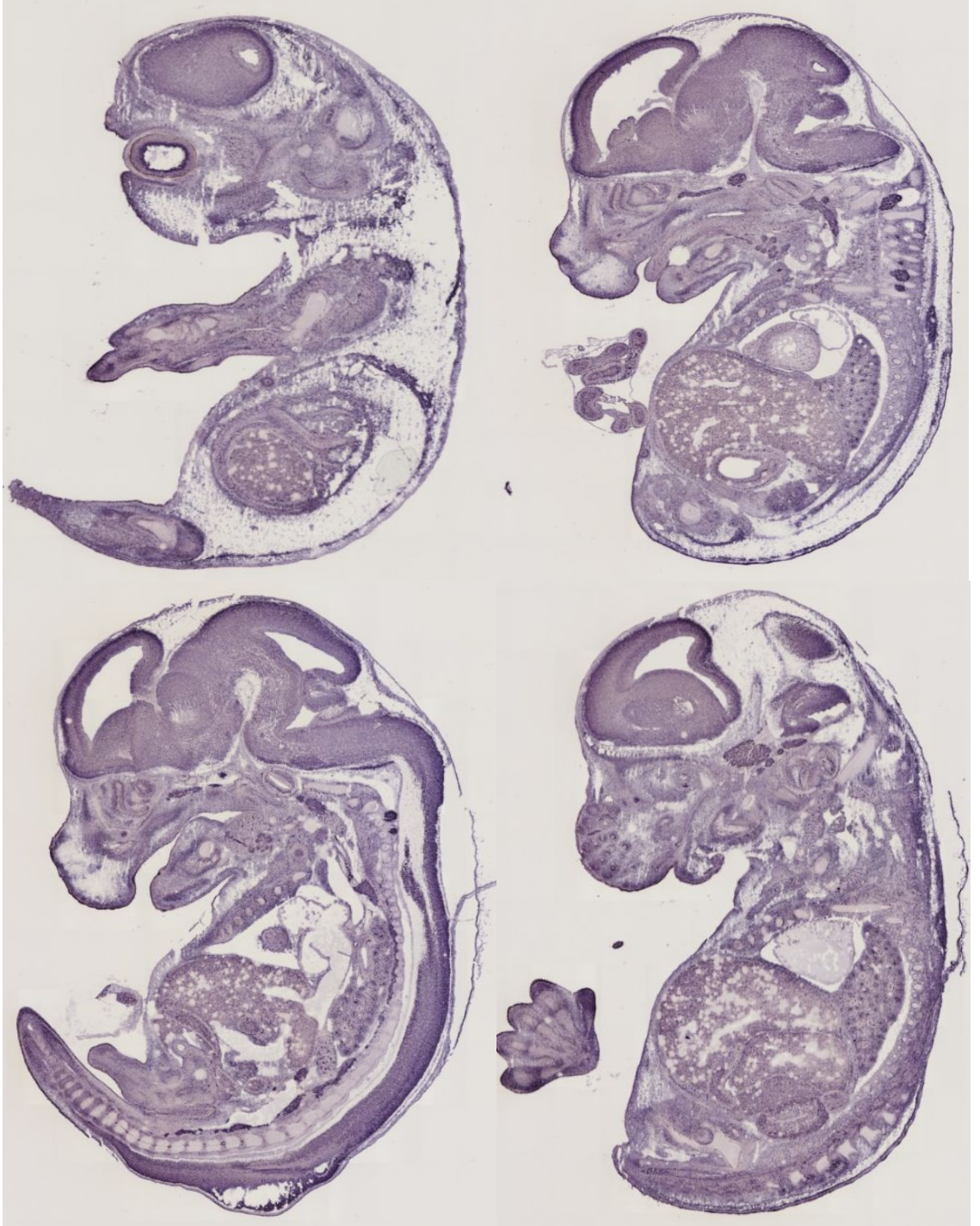
**Şekil 4.9.** Asetil-koenzim A açıltransferaz 1B (*Acaal1b*) geninin 14,5 günlük fare embriyosu üzerinde farklı kesimlerde yapılan *in situ* hibridizasyon işlemlerinde elde edilen sonuçlar



**Şekil 4.10.** Hidroksiaçil-koenzim A dehidrogenaz/3-ketoaçil-koenzim A tiyolaz/enoil-koenzim A hidrotaz (üçfonksiyonlu protein), beta altbirimi (Hadhb) geninin 14,5 günlük fare embriyosu üzerinde farklı kesimlerde yapılan *in situ* hibridizasyon işlemlerinde elde edilen sonuçlar



**Şekil 4.11.** Aldehit dehidrogenaz 9, alt birim A1 (Aldh9a1) geninin 14,5 günlük fare embriyosu üzerinde farklı kesimlerde yapılan *in situ* hibridizasyon işlemlerinde elde edilen sonuçlar



**Şekil 4.12.** Alkol dehidrogenaz 7 (IV. sınıf), sigma polipeptid (Adh7) geninin 14,5 günlük fare embriyosu üzerinde farklı kesimlerde yapılan *in situ* hibridizasyon işlemlerinde elde edilen sonuçlar

**Çizelge 4.3.** Kolesterol sentezi genleri için 14,5 günlük fare embriyosu dönemindeki ekspresyon yorumları ve ekspresyon çalışmaları sonucu <http://www.genepaint.org/> web sayfasına aktarılan gen ekspresyon fotoğraflarına ulaşılabilecek kod numaraları

No	Gen simgesi	Aksesyon numarası	E14,5 ISH için kod numaraları	Ekspresyon sonuçları (E14,5)
1	Hmgcr	NM_008255	MH2604	Merkezi sinir sistemi, bağırsaklar, karaciğer, sırt kası ve birçok dokuda yaygın ve kuvvetli olarak ekspresyon olmuştur.
2	Pmvk	NM_026784	MH2608	Sinir sistemi, kafatası bezi, karaciğer, böbrek, spinal kordda zayıf ancak belirgin bir ekspresyon olmuştur.
3	Mvd	NM_138656	MH2584	Zayıf olarak tüm dokularda ekspresyon olmuştur.
4	Idi1	NM_145360	MH2583	Merkezi sinir sistemi, bağırsaklar, karaciğer, sırt kası, böbrek, adrenal bezinde ekspresyon olmuştur.
5	Ggps1	NM_010282	MH2376	Her yerde zayıf ve yaygın bir ekspresyon vardır.
6	Fdps	NM_134469	MH2913	Yaygın ve genel olarak tüm dokularda ekspresyon olmuştur.
7	Fdft1	NM_010191	MH2909	Merkezi sinir sistemi, karaciğer ve cranial bezinde kuvvetli diğer yerlerde zayıf olarak ekspresyon olmuştur.
8	Sqle	NM_009270	MH2783	Yaygın ve genel olarak tüm dokularda ekspresyon olmuştur.
9	Lss	NM_146006	MH2915	Olfactori soğancı, bağırsaklar, merkezi sinir sistemi, karaciğer ve cranial bezinde kuvvetli, diğer yerlerde zayıf olarak ekspresyon olmuştur.
10	Dhcr24	NM_053272	MH2898	Yaygın ve kuvvetli olarak tüm dokularda ekspresyon olmuştur.
11	Cyp51	NM_020010	MH2907	Yaygın ve kuvvetli olarak tüm dokularda ekspresyon olmuştur.
12	Tm7sf2	NM_028454	MH2918	Merkezi sinir sistemi, karaciğer ve cranial bezinde kuvvetli diğer yerlerde zayıf olarak ekspresyon olmuştur.
13	Sc4mol	NM_025436	MH2917	Adrenal bezi, retina, merkezi sinir sistemi, karaciğer, böbrek, orta kulak, yüz kırkırdakları ve cranial bezinde kuvvetli, diğer yerlerde zayıf olarak ekspresyon olmuştur.
14	Nsdhl	NM_010941	MH2911	Adrenal bezi, olfactori soğancı, spinal kord, karaciğer ve cranial bezinde kuvvetli diğer yerlerde zayıf olarak ekspresyon olmuştur.
15	Hsd17b7	NM_010476	MH2919	Medulla, adrenal bezinde kuvvetli, diğer dokularda zayıf ekspresyon olmuştur.
16	Ebp	NM_007898	MH2387	Karaciğer ve yüz kırkırdak dokusunda kuvvetli diğer yerlerde zayıf bir ekspresyon vardır.
17	Sc5d	NM_172769	MH2391	Merkezi sinir sistemi ve karaciğer başta olmak üzere dokuların çoğunda zayıf olarak ekspresyon olmuştur.
18	Dhcr7	NM_007856	MH2386	Adrenal bezi, böbrek, karaciğerle beraber birçok dokuda ekspresyon olmuştur.
19	Cyp27b1	NM_010009	MH2871	Ekspresyon olmadı.



**Çizelge 4.4.** Safra asitleri sentezi genleri için 14,5 günlük fare embriyosu dönemindeki ekspresyon yorumları ve ekspresyon çalışmaları sonucu <http://www.genepaint.org/> web sayfasına aktarılan gen ekspresyon fotoğraflarına ulaşılabilinecek kod numaraları

No	Gen simgesi	Aksesyon numarası	E14,5 ISH için kod numaraları	Ekspresyon sonuçları (E14,5)
1	Cel	NM_009885	MH2774	Pankreas ve spinal kordda ekspresyon olmuştur.
2	Lipa	NM_021460	MH2838	Karaciğer ve kroid pleksusda ekspresyon olmuştur.
3	Soat2	NM_146064	MH2782	Karaciğer, akciğer ve adrenal bezinde ekspresyon olmuştur.
4	Cyp7a1	NM_007824	MH2785	Ekspresyon olmadı.
5	Srd5a2	NM_053188	MH2912	Yumurtalıkta ekspresyon olmuştur.
6	Cyp27a1	NM_024264	MH2776	Zayıf ve yaygın bir ekspresyon vardır.
7	Adh1	NM_007409	MH1744	Merkezi sinir sistemi, karaciğer ve cranial bezinde kuvvetli diğer yerlerde zayıf olarak ekspresyon olmuştur.
8	Adh7	NM_009626	MH2849	Yaygın ve genel olarak tüm dokularda kuvvetli bir şekilde ekspresyon olmuştur.
9	Adh5	NM_007410	MH2541	Ön beyin, orta beyin, pons, medulla, karaciğer, akciğer, spinal kord, timus, pankreas, böbrek, adrenal bezi, cild ve bağırsaklarda ekspresyon olmuştur.
10	Aldh2	NM_009656	MH1764	Merkezi sinir sistemi, karaciğer ve cranial bezinde kuvvetli diğer yerlerde zayıf olarak ekspresyon olmuştur.
11	Aldh3a2	NM_007437	MH1700	Adrenal bezi, retina, merkezi sinir sistemi, karaciğer, böbrek, orta kulak, yüzükürdükleri ve cranial bezinde kuvvetli, diğer yerlerde zayıf olarak ekspresyon olmuştur.
12	Aldh9a1	NM_019993	MH2600	Kaslar, akciğer, böbrek, bağırsaklar ve sinir sisteminde çok daha belirgin olmak üzere tüm dokularda ekspresyon olmuştur.
13	Aldh1b1	NM_028270	MH2289	Medulla, adrenal bezinde kuvvetli, diğer dokularda zayıf ekspresyon olmuştur.
14	Slc27a5	NM_009512	MH2031	Ekspresyon olmadı.
15	Hadhb	NM_145558	MH2837	Karaciğer, ön korteks, böbrek, yüz kasları, bağırsaklarda ekspresyon olmuştur.
16	Acaa1b	NM_146230	MH2539	Zayıf olarak akciğer, karaciğer ve sinir sisteminde ekspresyon olmuştur.

## 5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Kolesterol; ökaryotik membranların sentezi için gerekli olması, steroid hormonlarının, D vitamininin ve safra asitlerinin türetildikleri başlangıç maddesi olması ve kolesterol biyosentez yolundaki ara ürünlerin de, birçok maddenin sentezinde kullanılması nedeniyle metabolizma için çok önemli bir role sahiptir. Hidrofilik kolesterol türevleri olan safra asitleri ise; kolesterolün, lipitlerin ve yağda çözünen vitaminlerin absorpsiyonunda görev almaktadır. Kolesterol ve safra asitleri sentezinde yer alan enzimlerin genleri ile ilgili olarak RNase koruma ölçümü (RNase protection assay, RPA), RT-PCR, *in situ* hibridizasyon, Northern blot analizi, protein seviyesinde yapılan Western blot ve immunohistokimya gibi yöntemlerin kullanıldığı pek çok çalışma literatürde yer almaktadır (Champe and Harvey 1994; Küfrevioğlu 2003; Romualdi *et al.* 2003; Tiemann *et al.* 2004; Nelson and Cox 2005).

Kolesterol ve safra asitleri metabolizması sentezinde yer alan bu tez kapsamında çalışılan genler için 14,5 günlük fare embriyonik dönemi ekspresyon yorumları ve ekspresyon çalışmaları sonucu <http://www.genepaint.org/> web sayfasına aktarılan gen ekspresyon fotoğraflarına ulaşılabilecek kod numaraları Çizelge 4.3-4.4'de verilmiştir.

Kolesterol sentezi genleri için yapılan ekspresyon analizleri incelendiğinde;

3-hidroksi-3-metilglutaril-koenzim A reduktaz (Hmgcr) ile ilgili yapılmış olan çalışmalarda; RNase koruma ölçümü (RNase protection assay, RPA) yöntemi kullanılarak gelişim dönemi süresince fare beyin, karaciğer ve böbreğinde bu genin ekspresyonu araştırılmıştır. Beyinde doğumdan önceki 5 günlük (-5) ve doğumdan sonra 5 günlük dönemler arasında yetişkin fareye göre bu genin ekspresyonunun daha kuvvetli olarak gözlemlendiği, karaciğerde ise -5 günlük dönemde diğer dönemlere göre daha fazla ekspresyona uğradığı belirlenirken, böbreklerde dönemler arasında çok önemli bir değişiklik gözlemlenmediği belirtilmiştir (Hanaka *et al.* 2000). *In situ* hibridizasyon yöntemiyle yapılan başka bir çalışmada Hmgcr geninin farede (E)10,5-

14,5 günlük embriyonik gelişme dönemlerindeki ekspresyon profillerine bakılmıştır. Hmgcr geninin 10,5 günlükte dorsal kök bezleri ve sinir bezlerinde kuvvetli ekspresyon; 12,5 günlükte n ve arka ayaklarda ekspresyon; sonraki gelişme dönemlerinde (13,5–14,5) interdigital (parmakarası) bölgelere doğru ekspresyon; 13,5 günlükte sa ve bıyık foliküllerinde ekspresyon grldği rapor edilmektedir (Marijanovic *et al.* 2003). Çizelge 4-3'den grldği gibi, 14,5 günlük fare embriyosunda merkezi sinir sistemi, bağırsaklar, karaciğer, sırt kası ve birçok dokuda yaygın ve kuvvetli olarak ekspresyon olduğu tespit edildi.

Mevalonat kinaz (Mvk) geni için Visel *et al.* (2004) ve grubu tarafından yapılan *in situ* hibridizasyon çalışmasında 14,5 günlük fare embriyosunda her yerde zayıf ve yaygın olarak ekspresyona uğradığı görülmüştür.

Fosfomevalonat kinaz (Pmvk) ile ilgili yapılan bir çalışmada RT-PCR analizi ve microarray yöntemi kullanılarak faredeki four-cell, morula ve blastosist embriyonik dönemlerinde gen ekspresyon profilleri karşılaştırılmıştır ve çalışmanın sonucunda Pmvk enzimi geninin mRNA ekspresyonunun blastosist (BL) döneminde diğer iki döneme göre daha yüksek seviyede olduğu belirtilmiştir (Cui *et al.* 2007). Bizim ISH sonuçlarımıza göre; sinir sistemi, kafatası bezi, karaciğer, böbrek, spinal kordda zayıf ancak belirgin bir ekspresyon olduğu görüldü.

Mevalonat (difosfo) dekarboksilaz (Mvd) enziminin ekspresyonu hakkında herhangi bir detaylı çalışmaya literatürde rastlanmadı. Elde ettiğimiz bulgulara göre ise zayıf olarak tüm dokularda ekspresyon olduğu tespit edildi.

İzopentenil-difosfat deltaizomeraz (Idi1) geninin hemen her yerde ekspresyona uğradığı belirtilmiştir (Breitling *et al.* 2003). Bunun dışında literatürde ekspresyonla ilgili herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bizim sonuçlarımızı incelediğimizde bu sonuçlarla örtüşmekle beraber merkezi sinir sistemi, bağırsaklar, karaciğer, sırt kası böbrek ve adrenal bezinde de ekspresyon olduğu görüldü.

Geranilgeranil difosfat sentaz 1 (Ggps1; EC:2.5.1.1) enziminin insan da kalpte yüksek seviyede; dalak, testis, beyin, plasenta, karaciğer, akciğer, iskelet kası, böbrek ve pankreasta da kısmi olarak ekspresyona uğradığı belirtilmiştir (Zhao *et al.* 2000). Western Blot analizi yapılmış olan başka bir çalışmada farede beyin dalak, akciğer, testis ve böbreklerde kuvvetli ekspresyon; iskelet kası ve kalpte orta seviyede ekspresyon; karaciğerde zayıf ekspresyon olduğu rapor edilmiştir (Vicent *et al.* 2000). Ancak bizim ISH sonuçlarımızda ise her yerde zayıf ve yaygın bir ekspresyon olduğu gözlemlendi.

Farnesil difosfat sentaz (Fdps) geni hakkında herhangi bir literatüre rastlanmamıştır. Elde ettiğimiz bulgulara göre tüm dokularda yaygın ve genel olarak ekspresyon tespit edildi.

Farnesil difosfat farnesil transferaz 1 (Fdft1) ile ilgili literatürde herhangi bir ekspresyon çalışmasına rastlanmamıştır. ISH sonuçlarımızı incelediğimizde merkezi sinir sistemi, karaciğer ve cranial bezinde kuvvetli diğer yerlerde zayıf olarak ekspresyon olduğu görüldü.

Skualen epoksidaz (Sqle) hakkında literatürde ekspresyonla ilgili herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bizim sonuçlarımızda ise yaygın ve genel olarak tüm dokularda ekspresyon gözlemlendi.

Literatürde lanosterol sentaz (Lss) için yapılan *in situ* hibridizasyon çalışmasında farede 14,5 günlük embriyonik dönemde merkezi sinir sistemi, karaciğer, adrenal gland, spinal kord ve dorsal kök bezinde kuvvetli diğer yerlerde zayıf olarak ekspresyona uğradığı belirtilmiştir (Visel *et al.* 2004). Bu gen için yapılan başka bir çalışmada ise 14,5 günlük embriyonik dönemde spinal kord, merkezi sinir sistemi, over, dorsal kök bezi ve karaciğerde orta seviyede, diğer yerlerde zayıf olarak ekspresyon olduğu; 10,5 günlük embriyonik dönemde ise beyin, göz, dorsal kök bezi ve kalpte ekspresyona uğradığı rapor edilmiştir (Reymond *et al.* 2002). Elde ettiğimiz bulgulara göre olfactori

soğancığı, bağırsaklar, merkezi sinir sistemi, karaciğer ve cranial bezinde kuvvetli, diğer yerlerde zayıf olarak ekspresyon olduğu tespit edildi.

24-dehidrokolesterol redüktaz (Dhcr24) geninin ekspresyonunun mutant farelerle yapılan bir çalışmada elde edilen sonuçlardan normal cilt gelişimi için çok önemli olduğu belirtilmiştir (Mirza *et al.* 2006). Bunun dışında literatürde ekspresyonla ilgili herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Çizelge 4-3'den görüldüğu gibi Dhcr24 geninin yaygın ve kuvvetli olarak tüm dokularda ekspresyon gösterdiği belirlendi.

Sitokrom P450, 51.aile (Cyp51) enzimi için RT- PCR yöntemi kullanılarak yapılan çalışmada E7, E11, E15 ve E17 olmak üzere dört farklı embriyonik gelişme dönemi ile karaciğer, akciğer, kalp, dalak, iskelet kasları, testis ve böbreğin de yer aldığı 8 farklı yetişkin fare dokusu için ekspresyon profilleri incelenmiş ve bu genin dört gelişme döneminin her birinde ve çalışılan bütün fare dokularında ekspresyona uğradığı belirtilmiştir (Choudhary *et al.* 2003). Bizim ISH sonuçlarımızda ise tüm dokularda yaygın ve kuvvetli olarak ekspresyon olduğu görüldü.

Transmembran 7, 2.aile üyesi (Tm7sf2) için yapılmış olan Northern blot çalışmasında yetişkin insan kalp, beyin, pankreas, akciğer, karaciğer, iskelet kası ve böbreklerde değişik seviyelerde ekspresyon olduğu; plasenta, dalak, timus, bağırsaklarda ekspresyon olmadığı görülmüştür (Lemmens *et al.* 1998). Yaptığımız alışmalar incelendiğinde merkezi sinir sistemi, karaciğer ve cranial bezinde kuvvetli diğer yerlerde zayıf olarak ekspresyon olduğu tespit edildi.

Sterol-C4-metil oksidaz-like (Sc4mol) geni hakkında herhangi bir literatüre rastlanmamıştır. Çizelge 4-3'den görüldüğu gibi bizim sonuçlarımızda ise adrenal bezi, retina, merkezi sinir sistemi, karaciğer, böbrek, orta kulak, yüz kıkırdakları ve cranial bezinde kuvvetli, diğer yerlerde zayıf olarak ekspresyon olduğu belirlendi.

NAD(P) bağılı steroid dehidrogenaz-like (Nsdhl) geninin farede gestasyon süresince embriyo gelişiminde ekspresyona uğradığı, 16,5 günlük embriyonik gelişme döneminde kuvvetli ekspresyona uğradığı Northern blot analizi yöntemi kullanılarak belirlenmiştir (Caldas *et al.* 2005). Bu gen için *in situ* hibridizasyon yöntemiyle yapılan başka bir çalışmada Nsdhl geninin farede (E)10,5–14,5 günlük embriyonik gelişme dönemlerindeki ekspresyon profilleri karşılaştırılmış ve 11,5 günlükte 10,5 günlüğe göre dorsal kök bezinde daha fazla ekspresyona uğradığı gözlemlenmiştir (Marijanovic *et al.* 2003). *In situ* hibridizasyon sonuçlarımızda ise adrenal bezi, olfactori soğancığı, spinal kord, karaciğer ve cranial bezinde kuvvetli diğer yerlerde zayıf olarak ekspresyon olduğu tespit edildi.

Hidroksisteroid (17-beta) dehidrogenaz 7 (Hsd17b7) enzimi incelendiğinde; *in situ* hibridizasyon yöntemiyle yapılan bir çalışmada Hsd17b7 geninin farede (E)10,5–14,5 günlük embriyonik gelişme dönemlerindeki ekspresyon profilleri araştırılmıştır. Hsd17b7 geni 10,5 günlükte dorsal kök bezleri ve sinir bezlerinde kuvvetli ekspresyon, 12,5 günlükte ön ve arka ayaklarda ekspresyon, sonraki gelişme dönemlerinde (13,5–14,5) İnterdigital (parmaklararası) bölgelere doğru ekspresyon, 13,5 günlükte de saç ve bıyık foliküllerinde ekspresyon görüldüğü belirtilmiştir (Marijanovic *et al.* 2003). Elde ettiğimiz bulgular incelendiğinde medulla, adrenal bezinde kuvvetli, diğer dokularda zayıf ekspresyon olduğu görüldü.

Fenilalkilamin  $Ca^{2+}$  antagonist (emopamil) bağlanma proteini (Ebp) enzim geninin memelilerde çoğu dokuda ekspresyona uğradığı, özellikle karaciğerde kuvvetli ekspresyona uğradığı belirlenmiştir (Silve *et al.* 1996). Bizim *in situ* hibridizasyon sonuçlarımızda ise bu sonuçlarda olduğu gibi karaciğerde ve ayrıca yüz kıkırdak dokusunda kuvvetli diğer yerlerde zayıf bir ekspresyon olduğu görüldü.

Sterol-C5-desaturaz (fungal ERG3, delta–5-desaturaz) homolog (Sc5d) enzimi hakkında literatürde ekspresyonla ilgili herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. ISH sonuçlarımızda merkezi sinir sistemi ve karaciğer başta olmak üzere dokuların çoğunda zayıf olarak ekspresyon olduğu tespit edildi.

7-dehidrokolesterol redüktaz (Dhcr7) geninin insanda en fazla ekspresyona böbrek üstü bezi, karaciğer, testis ve beyin dokularında uğradığı belirtilmiştir (Correa-Cerro and Porter 2005). Dhcr7 için *in situ* hibridizasyon yöntemiyle yapılan bir çalışmada Dhcr7 geninin farede (E)10,5–14,5 günlük embriyonik gelişme dönemlerindeki ekspresyon profilleri karşılaştırıldığında dorsal kök bezlerinde 11,5 günde 10,5 güne göre daha fazla ekspresyon olduğu görülmüştür. (Marijanovic *et al.* 2003). Elde ettiğimiz bulgulara göre adrenal bezi, böbrek, karaciğerle beraber birçok dokuda ekspresyon olduğu görüldü.

Sitokrom P450, 27. aile, b alt ailesi, polipeptid 1(Cyp27b1) geni ile ilgili RT-PCR yöntemi kullanılarak farede hem yetişkin dokularında hem de dört farklı embriyonik dönemdeki (E7, E11, E15, E17) ekspresyon profillerinin incelendiği çalışmada Cyp27b1 geninin sadece E7 embriyonik gelişme döneminde, yetişkin fare dokularında da böbrek ve testislerde ekspresyona uğradığı rapor edilmiştir (Choudhary *et al.* 2003). Bizim yaptığımız çalışmalar incelendiğinde 14,5 günlük fare embriyosunda ekspresyon gözlemlenmedi.

Safra asitleri sentezi genleri için ekspresyon analizleri incelendiğinde;

Karboksil ester lipaz (Cel) geni için Northern blot analizi ile farede yapılan bir çalışmada Cel geninin pankreasta sürekli, süt bezlerinde de hamilelik süresince özellikle hamilelik döneminin 14. gününde olmak üzere iki dokuda ekspresyona uğradığı rapor edilmektedir. (Kannius-Janson *et al.* 1998). Çizelge 4-4'den görüldüğü gibi yaptığımız çalışmalar incelendiğinde bu çalışma ile paralel bir şekilde pankreas ve ayrıca spinal kordda ekspresyon olduğu tespit edildi.

Lizozomal asit lipaz A (Lipa) geni için yapılmış olan ekspresyon analizleri incelendiğinde 11–16 günlük fare embriyosunda *in situ* hibridizasyon yöntemiyle yapılan çalışmada Lipa geninin kalp, over, testis, tükürük bezi, dil, seminal gland gibi çoğu dokuda zayıf ekspresyona uğradığı, hepatositler, dalak ve timus hücrelerinde kuvvetli ekspresyona uğradığı, çok daha kuvvetli ekspresyonun bağırsak, adrenal

korteks, pankreas, böbrek epitelyum hücrelerinde görüldüğü belirtilmiştir. Ayrıca belirgin seviyede ekspresyonun 12 günlük fare embriyosunda kroid pleksusun epitelyum hücrelerinde; 14 günlükte karaciğer ve akciğerde; 16 günlükte bağırsak ve böbrekte görüldüğü rapor edilmiştir (Du *et al.* 1996). Çalışmamızda ortaya çıkan ekspresyon sonuçlarında benzer şekilde karaciğer ve kroid pleksusta ekspresyon oldu. Bu nedenle bu çalışmalarla örtüşmektedir.

Sterol O-açıltransferaz (Soat2)'nin ekspresyonun bağırsak ve karaciğer ile sınırlı olduğu yapılan bir çalışmada belirtilmiştir (Buhman *et al.* 2000). Soat2'nin RT-PCR yöntemiyle yapılan başka bir çalışmasında çeşitli fare dokularındaki analizinde karaciğer, küçük bağırsak ve embriyo karaciğerinde yüksek ekspresyona sahip olduğu tespit edilmiştir. Yine aynı çalışmada yapılan Northern blot analizi ile de karaciğer ve küçük bağırsakta ekspresyona uğradığı belirtilmiştir (Cases *et al.* 1998). Elde ettiğimiz verilere göre ise bu genin bu çalışmalarla benzer şekilde karaciğerde, ayrıca akciğer ve adrenal bezinde de ekspresyona uğradığı tespit edildi.

Steroid 5 alfa-reduktaz 2 (Srd5a2) geni ile ilgili literatürde herhangi bir ekspresyon çalışmasına rastlanmadı. Bizim sonuçlarımızda ise yumurtalıkta ekspresyon olduğu görüldü.

7 $\alpha$ -hidroksilaz (Sitokrom P450, 7. aile, a alt aile, polipeptid 1, Cyp7a1) ekspresyonu hakkında herhangi bir detaylı çalışmaya da literatürde rastlanmamıştır. Bizim sonuçlarımızda ise 14,5 günlük fare embriyosunda ekspresyon gözlemlenmedi.

Sitokrom P450, 27. aile, a alt ailesi, polipeptid 1 (Cyp27a1) enzimi için RT-PCR yöntemi kullanılarak yapılan bir çalışmada 7, 11, 15 ve 17 günlük olmak üzere dört farklı embriyonik gelişme dönemi; karaciğer, akciğer, kalp, dalak, iskelet kasları, testis ve böbreğin de yer aldığı 8 farklı yetişkin fare dokusu için ekspresyon profilleri incelenmiştir. Cyp27a1 enzim geninin ise sadece E7 embriyonik gelişme döneminde ekspresyona uğradığı tespit edilmiştir (Choudhary *et al.* 2003). Çizelge 4-4'den görüldüğü gibi zayıf ve yaygın bir ekspresyon olduğu belirlendi.



Alkol dehidrogenaz 1 (I. sınıf) (Adh1) için yapılmış olan yetişkin ve embriyonik farede *in situ* hibridizasyon yöntemiyle yapılan ekspresyon analizleri incelendiğinde; 8,5 ve 9,5 günlük embriyoda ekspresyon görülmemiştir. 10,5 ve 11,5 günlükte primitive böbreklerde, ön ve arka ayaklarda (forelimb-hindlimb) güçlü ekspresyon; 12,5 günlükte servikal prevertebral de; 13,5 günlükte para vertebral kas hücrelerinde; 14,5 günlükte sonraki gelişme dönemlerinde kahverengi yağ dokusu olacak olan latero servikal mezenkim bölgesinde ekspresyon tespit edilmiştir. Adh1 transkriptinin fetal iç organların çoğunda ekspresyona uğradığı belirlenmiştir. Akciğerde 11,5 günlük gibi erken bir dönemde başlayan ekspresyonun 13,5–15,5 günlük dönemlerde çok kuvvetli bir şekilde devam ettiği belirlenmiştir. 15,5–16,5 günlük dönemlerde fetal gut epitelyumda kuvvetli ekspresyon; bağırsak villuslarında ekspresyon tespit edilmiş ancak mide epitelyumunda ve ince bağırsakta ekspresyonun gerçekleşmediği tespit edilmiştir. 14,5–16,5 günlük dönemlerde uriner bladder (mesane) epitelyumunda; 12,5 günlükte adrenal glandda çok yoğun ekspresyon belirlenmiştir. Fetal gelişim dönemi boyunca medulla hücrelerinde, 16,5 günlükte böbrek tubüllerinde, 15,5–16,5 günlükte karaciğerde çok zayıf ekspresyon belirlenmiştir. Yetişkin farede mide, bağırsak, böbrek özellikle bazı nefronlarda daha kuvvetli bir şekilde, kuvvetli seviyede gonadlarda, karaciğer ve adrenal glandda ekspresyon belirlenmiştir. Akciğerlerde fetal gelişim dönemi boyunca güçlü ekspresyon olmasına karşın yetişkin akciğerinde çok zayıf bir ekspresyon belirlenmiştir (Vonesch *et al.* 1994). RT-PCR yöntemi kullanılarak yapılan başka bir çalışmada ise yetişkin fare karaciğerinde Adh1 geninin ekspresyona uğradığı tespit edilmiştir (Rout and Armant 2002). Oligonukleotid *in situ* hibridizasyon yöntemi kullanılarak yapılan çalışmada da farede Adh1'in gastrik mukoza, rektum, mide ve gastrik salgı bezinde ekspresyonu belirlenmiştir (Westerlund *et al.* 2007). Northern blot analizi yöntemi kullanılarak 14 farklı yetişkin fare dokusunda yapılan çalışmada Adh1 için karaciğer, bağırsak ve gözde yüksek ekspresyon; böbrek, over ve uterusu orta seviyede ekspresyon; spinal kord, timus, kalp, mide mukozası, cilt ve testislerde düşük seviyede ekspresyon görülürken; beyin ve dalakta ise ekspresyon görülmemiştir (Zgombic-Knight *et al.* 1995). Radyoaktif oligonukleotid *in situ* hibridizasyon yöntemi kullanılarak yetişkin ve embriyo dönemindeki (E9,5-E19,5) farede Adh1 geninin ekspresyon çalışmaları yapılmıştır. Bu çalışmanın sonucunda Adh1 13,5 günlükte adrenal gland da; 15,5 günlükte karaciğer ve bağırsakta; 19,5 günlükte olfaktori

epitelyumda; aynı zamanda adrenal korteks de kuvvetli ve yaygın bir ekspresyon göstermiştir. Yetişkin farede ise olfaktori epitelyumda ekspresyon belirlenirken, epidermiste ise ekspresyon görülmemiştir (Westerlund *et al.* 2005). Fare embriyo ve yetişkin dokularında yapılan başka bir *in situ* hibridizasyon çalışmasında ise Adh1 geninin embriyoda bağırsak, üriner sistem, adrenal gland, konjunktival kese, epidermis, nazal epitelyum ve akciğerde; yetişkin farede uterus, böbrek, bağırsak, adrenal korteks, testis ve karaciğerde ekspresyona uğradığı belirlenmiştir (Ang *et al.* 1996). Yapılan bir çalışmada embriyonik ve yetişkin fare adrenal gland (böbreküstü bezi) bölgesinde *in situ* hibridizasyon yöntemiyle Adh genlerinin ekspresyon çalışmaları yapılmıştır. Adh1 geninin 16,5 günlük embriyonik gelişme döneminde adrenal gland ve hemen yanında bulunan böbrek tübüllerinde; yetişkin farede ise sadece adrenal glandda ekspresyona uğradığı belirtilmiştir (Haselbeck *et al.* 1997). Farede Adh1 geni için yapılan immunohistokimya çalışmasında şu sonuçlar elde edilmiştir: 11,5 ve 12,5 günlük embriyonik gelişme döneminde Adh1 adrenal hücrelerinde kuvvetli ve yaygın bir şekilde ekspresyon göstermiştir. Bu dönemlerde Adh1 geni bu hücrelerin yanı sıra böbrek hücrelerinde de ekspresyona uğramıştır. 14,5, 15,5 ve 16,5 günlük embriyonik gelişme dönemlerinde adrenal gland da ekspresyon görülmüştür (Haselbeck and Duester 1998). RNA *in situ* hibridizasyon yöntemiyle farede 12,5 ve 15,5 günlük embriyonik gelişme dönemleri ve P75 postnatal dönemde yapılan çalışmada Adh1 geni için ureterde 12,5 günlükte zayıf, 15,5 günlükte kuvvetli ekspresyon, aynı zamanda bladderde (mesane) kuvvetli ekspresyon görülmüştür (Mitchell *et al.* 2006). *In situ* hibridizasyon yöntemiyle 14,5 günlük farede yapılan başka bir çalışmada Adh1'in adrenal gland, akciğer mezenkimi ve nazal epitelyumda ekspresyona uğradığı tespit edilmiştir (Cankaya *et al.* 2007). Adh1'in Cankaya *et al.* (2007) ve grubu tarafından yapılan 14,5 günlük fare embriyosu sonucu çalışmalarımızda kullanıldı ve bu çalışmada merkezi sinir sistemi, karaciğer ve cranial bezinde kuvvetli diğer yerlerde zayıf olarak ekspresyon olduğu tespit edilmiştir.

Alkol dehidrogenaz 7 (IV. sınıf), sigma polipeptid (Adh7) enzimi incelendiğinde; RT-PCR yöntemi kullanılarak yapılan bir çalışmada yetişkin fare karaciğerinde Adh7'nin ekspresyonu belirlenirken beyinde tespit edilmemiştir (Rout and Armant 2002).

Northern blot analizi yöntemi kullanılarak 14 farklı yetişkin fare dokusunda yapılan çalışmada ise Adh7 için yüksek seviyede mide mukozasında; orta seviyede göz, timus, cilt, overde; çok düşük seviyede de beyin, spinal kord, dalak, kalp, böbrek ve testislerde ekspresyon belirlenmiştir. Farede Adh7 için *in situ* hibridizasyon çalışması yapılarak over, cilt, timüs, göz ve midede yüksek seviyede ekspresyon gösterdiği belirlenmiştir (Zgombic-Knight *et al.* 1995). *In situ* hibridizasyon yöntemiyle yapılan başka bir çalışmada fare embriyo ve yetişkin dokularındaki Adh izoenzimlerinin ekspresyon çalışması yapılmış ve Adh7 geninin embriyoda adrenal gland, nazal epitelyumda; yetişkin farede özafagus epitelyum hücrelerinde, epididim, testis, adrenal korteks ve midede ekspresyona uğradığı belirlenmiştir. Ayrıca Adh7'nin, 10,5, 11,5, 14,5, 16,5 günlük embriyo döneminde ekspresyona uğradığı tespit edilmiştir (Ang *et al.* 1996). Yapılan başka bir çalışmada ise embriyonik ve yetişkin fare adrenal gland (böbreküstü bezi) bölgesinde *in situ* hibridizasyon yöntemiyle Adh genlerinin ekspresyon çalışmaları yapılmıştır. Adh7 geninin 16,5 günlük embriyonik gelişme döneminde ve yetişkin farede adrenal glandda ekspresyonu görülürken, böbrek tübüllerinde ekspresyonu görülmemiştir (Haselbeck *et al.* 1997). Farede Adh7 geni için yapılan immünohistokimya çalışmasında da 11,5 ve 12,5 günlük embriyonik gelişme döneminde adrenal hücrelerinde zayıf ekspresyon gösterdiği belirtilmiştir (Haselbeck and Duester 1998). Radyoaktif oligonükleotid *in situ* hibridizasyon yöntemi kullanılarak yetişkin ve embriyo dönemindeki (E9,5-E19,5) Adh7 enzim geni için yapılan ekspresyon çalışmalarında Adh7 geninin 15,5 günlükte olfaktori epitelyumda; 19,5 günlükte adrenal gland, olfaktori epitelyum, konjunktival epitelyum, epidermis ve saç foliküllerinde; orta seviyede de korteks hücrelerinde ekspresyona uğradığı görülmüştür. Yetişkin farede de olfaktori epitelyumda ve epidermiste zayıf ekspresyon rapor edilmiştir (Westerlund *et al.* 2005). Yaptığımız çalışmalar incelendiğinde, yaygın ve genel olarak tüm dokularda kuvvetli bir şekilde ekspresyon olduğu tespit edildi.

Alkol dehidrogenaz 4 (II. sınıf), pi polipeptid (Adh4) ile yapılmış olan oligonükleotid *in situ* hibridizasyon çalışmasında farede dil epitelyumu, özafagus ve midede gastrik mukozada ekspresyon olduğu belirtilmiştir (Westerlund *et al.* 2007). Farede yapılan başka bir *in situ* hibridizasyon çalışmasında 6,5-8,5 günlük embriyonik gelişme

dönemindeki ekspresyon profilleri karşılaştırılmış ve Adh4 enziminin 6,5 günde ekspresyona uğramadığı, 7,5 günde primitif mezoderm, 8,5 günde primitif mezoderm ve granial (kafatası) mezodermde ekspresyona uğradığı belirtilmiştir (Ang and Duester 1997). Adh4 ile yapılmış olan diğer bir *in situ* hibridizasyon çalışmasında da 14,5 günlük fare embriyosunda olfactori soğancığı, bağırsaklar, merkezi sinir sistemi, karaciğer ve cranial bezinde kuvvetli, diğer yerlerde zayıf olarak ekspresyon olduğu görülmüştür (Visel *et al.* 2004).

Alkol dehidrogenaz 5 (III. sınıf), chi polipeptid (Adh5) enzimi incelendiğinde, *in situ* hibridizasyon yöntemiyle fare embriyo ve yetişkin dokularında yapılan ekspresyon çalışmasında Adh5'in embriyo ve yetişkin fare dokularında düşük seviyede, 10,5, 11,5, 14,5, 16,5 günlük embriyo döneminde ekspresyona uğradığı rapor edilmiştir (Ang *et al.* 1996). Radyoaktif oligonükleotid *in situ* hibridizasyon yöntemi kullanılarak yetişkin ve embriyo dönemindeki (E9,5-E19,5) farede Adh5 geni için yapılan ekspresyon çalışmasında 13,5 günlük dönemde zayıf ve her yerde yaygın ekspresyon gösterdiği tespit edilmiştir (Westerlund *et al.* 2005). Çalışmamızda ortaya çıkan ekspresyon sonuçlarında ise ön beyin, orta beyin, pons, medulla, karaciğer, akciğer, spinal kord, timus, pankreas, böbrek, adrenal bezi, cilt ve bağırsaklarda ekspresyona uğradığı tespit edildi.

Aldehit dehidrogenaz 2, mitokondrial (Aldh2) enzimi için Northern blot analizi ile yapılan çalışmada farede karaciğerde yüksek seviyede, böbrekte düşük seviyede olduğu belirtilmiştir (Chang and Yoshida 1994). Aldh2 geni için RT-PCR yöntemi kullanılarak yapılan diğer bir çalışmada ise yetişkin fare karaciğerinde ekspresyona uğradığı rapor edilmektedir (Rout and Armant 2002). Elde edilen bulgular incelendiğinde bu genin karaciğer ile beraber merkezi sinir sistemi ve cranial bezinde kuvvetli diğer yerlerde zayıf olarak ekspresyona uğradığı tespit edildi.

Aldehit dehidrogenaz 3. aile, A2 alt aile (Aldh3a2) geni için yapılmış olan ekspresyon analizleri incelendiğinde, RT-PCR yöntemi kullanılarak yapılan çalışmada yetişkin fare karaciğerinde ve beyinde korneal Aldh (Aldh3) geninin ekspresyona uğradığı tespit

edilmiştir (Rout and Armant 2002). Çalışmamızda ortaya çıkan ekspresyon sonuçlarında ise adrenal bezi, retina, merkezi sinir sistemi, karaciğer, böbrek, orta kulak, yüz kıkırdakları ve cranial bezinde kuvvetli, diğer yerlerde zayıf olarak ekspresyon olduğu görüldü.

Aldehit dehidrogenaz 9, A1 alt aile (Aldh9a1) için bu enzimin aktivitesinin insanda karaciğer, adrenal gland ve böbreklerde çoğunlukta olduğu, bu gen için yapılmış olan Northern blot çalışmasında da karaciğer, böbrek, iskelet kası, kalp, beyin, pankreas, akciğer, plasentada ekspresyon olduğu rapor edilmiştir (Vaz *et al.* 2000). ISH sonuçlarımızı incelediğimizde kaslar, akciğer, böbrek, bağırsaklar ve sinir sisteminde çok daha belirgin olmak üzere tüm dokularda ekspresyon olduğu görüldü. Görüldüğü gibi sonuçlar bu çalışmayla örtüşmektedir.

Alkol dehidrogenaz 1.aile, üye B1 (Aldh1b1) geni için radyoaktif oligonükleotid *in situ* hibridizasyon yöntemi kullanılarak yetişkin ve embriyo dönemindeki (E9,5-E19,5) farede yapılan çalışmada Aldh1 geninin mezensefalik (orta beyine ait) dopamin nöron hücrelerinde kuvvetli ekspresyona uğradığı rapor edilmektedir (Westerlund *et al.* 2005). RT-PCR yöntemi kullanılarak yapılan başka bir çalışmada da yetişkin fare karaciğerinde; Aldh1 geninin ekspresyona uğradığı tespit edilmiştir (Rout and Armant 2002). Elde edilen verilere göre medulla, adrenal bezinde kuvvetli, diğer dokularda zayıf ekspresyon olduğu görüldü.

Visel *et al.* (2004) ve grubu tarafından aldehit dehidrogenaz 7.aile, üye A1 (Aldh7a1) geninin RNA *in situ* hibridizasyon yöntemiyle yapılan analizinde 14,5 günlük fare embriyosunda yaygın ve kuvvetli olarak tüm dokularda ekspresyona uğradığı belirtilmiştir.

Çözünmüş taşıyıcı 27.aile (yağ asit taşıyıcı), üye 5 (Slc27a5) için yapılmış olan ekspresyon analizleri incelendiğinde; Western blot tekniği kullanılarak yapılan bir çalışmada E18,5 ve yetişkin fare de FATP ailesi üyelerinin ekspresyonlarına bakılmış ve bu protein ailesinin bir üyesi olan FATP5/Slc27a5 geninin her iki evrede de

ekspresyon göstermediği belirtilmiştir (Schmuth *et al.* 2005). RT-PCR yöntemi kullanılarak 10,5–18,5 günlük fare embriyosunda yapılan başka bir çalışmada ise FATP5/Slc27a5 geninin ekspresyona uğramadığı rapor edilmiştir (Schaff *et al.* 2007). Bizim sonuçlarımızda da aynı şekilde ekspresyonun olmadığı tespit edildi ve bu sonuç yapılmış olan çalışmalar ile örtüşmektedir.

Hidoksiasil-koenzim A dehidrogenaz/3-ketoasil-koenzim A tiyolaz/enoil-koenzim A hidrotaz (üçfonksiyonlu protein), beta altbirimi (Hadhb) geni hakkında her hangi bir literatüre rastlanmamıştır. ISH sonuçlarımızda ise karaciğer, ön korteks, böbrek, yüz kasları, bağırsaklarda ekspresyon olduğu görüldü.

Asetil-koenzim A açiltransferaz 1B (Acaa1b) literatürde ekspresyonla ilgili herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. ISH sonuçlarımızı incelediğimizde zayıf olarak akciğer, karaciğer ve sinir sisteminde ekspresyon olduğu tespit edildi.

Asetil-koenzim A açiltransferaz 2 (mitokondrial 3-oksoasil-koenzimA tiyolaz) (Acaa2), geninin RNA *in situ* hibridizasyon yöntemiyle yapılan analizinde 14,5 günlük fare embriyosunda merkezi sinir sistemi, mide, karaciğer, özafagus, kroid pleksusda çok daha belirgin olmak üzere tüm dokularda ekspresyona uğradığı belirtilmiştir (Visel *et al.*2004).

Visel *et al.* (2004) ve grubu tarafından retinol dehidrogenaz 14 (Rdh14; EC:1.1.1.-]) geninin RNA *in situ* hibridizasyon yöntemiyle yapılan analizinde 14,5 günlük fare embriyosunda ekspresyona uğramadığı görülmüştür (Visel *et al.*2004).

Tinol dehidrogenaz 13 (Rdh13; EC:1.1.1.-]) geni ile yapılmış olan *in situ* hibridizasyon çalışmasında 14,5 günlük fare embriyosunda merkezi sinir sistemi, dorsal kök bezi ve cranial bezinde ekspresyon olduğu tespit edilmiştir (Visel *et al.*2004).

**Sonuç olarak;** bu tez kapsamında aşağıdaki bulgular elde edilmiştir:

1. Kolesterol ve safra asitleri metabolizması sentezinde görev alan bazı enzimlere ait genler gen bankasından bulunarak, bu genler için spesifik primerleri dizayn edildi.
2. Bu primerler ile cDNA problemleri ve bu problemler ile antisens mRNA'lar üretildi.
3. *In situ* hibridizasyon tekniğı ile bu genler için ekspresyon analizi yapıldı.
4. Ekspresyon sonuçları taranarak bilgisayar ortamına ([www.genpaint.org](http://www.genpaint.org)) aktarıldı.
5. 14,5 günlük fare embriyosunda bulunan kolesterol ve safra asitleri metabolizması sentezinde yer alan bazı enzim genlerinin mRNA düzeyinde nerede ekspresyon oldukları tespit edildi.
6. Kolesterol sentezinde yer alan Mvd, Fdps, Fdft1, Sqle, Sc4mol, Sc5d genleri; safra asitleri sentezinde yer alan Srd5a2, Cyp7a1, Hadhb, Acaa1b genlerinin ekspresyonları hakkında literatürde detaylı bir çalışmaya rastlanmadı ve bu genlerin 14,5 günlük fare embriyo dokularında *in situ* hibridizasyon çalışmaları ilk kez tarafımızdan gerçekleştirildi.
7. Kolesterol sentezinde yer alan Hmgcr, Pmvk, Ggps1, Lss, Cyp51, Tm7sf2, Hsd17b7, Ebp, Dhcr7 genleri ve safra asitleri sentezinde yer alan Cel, Lipa, Soat2, Cyp27a1, Adh1, Adh7, Adh5, Aldh2, Aldh3a2, Aldh9a1, Slc27a5 genlerinin ekspresyon sonuçları literatürde yer alan ekspresyon çalışmaları ile örtüşmektedir.

**KAYNAKLAR**

- Albrecht, U., Lu, H.C., Revelli, J.P., Xu, X.C., Lotan, R., Eichele, G., 1998. Studying Gene Expression on Tissue Sections Using *In Situ* Hybridization (ed. Adolph, K.W. in Human Genome Methods), CRC Press, p. 93-120.
- Ang, H.L., Deltour L., Hayamizu T.F., Zgombic'-Knight M., Duester G., 1996. Retinoic Acid Synthesis in Mouse Embryos during Gastrulation and Craniofacial Development Linked to Class IV Alcohol Dehydrogenase Gene Expression. *The Journal Of Biological Chemistry*, 271(16), 9526–9534.
- Ang, H.L. and Duester G., 1997. Initiation of retinoid signaling in primitive streak mouse embryos: spatiotemporal expression patterns of receptors and metabolic enzymes for ligand synthesis. *Dev Dyn.*, 208(4), 536–43.
- Arnon, R., Yoshimura T., Reiss A., Budai K., Lefkowitz J.H., Javitt N.B., 1998. Cholesterol 7-hydroxylase knockout mouse: a model for monohydroxy bile acid-related neonatal cholestasis. *Gastroenterology*, 115(5), 1223–8.
- Bae, S., Seong J., Paik Y., 2001. Cholesterol biosynthesis from lanosterol: molecular cloning, chromosomal localization, functional expression and liver-specific gene regulation of rat sterol delta8-isomerase, a cholesterologenic enzyme with multiple functions. *Biochem J.*, 353, 689–99.
- Becker, K., Csikos M., Horvath A., Karpati S., 2001. Identification of a novel mutation in 3beta-hydroxysteroid-Delta8-Delta7-isomerase in a case of Conradi-Hünemann-Happle syndrome. *Exp Dermatol.*, 10(4), 286–9.
- Belgacem, Y.H. and Martin J.R., 2007. Hmgcr in the corpus allatum controls sexual dimorphism of locomotor activity and body size via the insulin pathway in *Drosophila*. *PLoS ONE*, 2(1):e187.
- Bell, T.A. 3rd., Kelley K., Wilson M.D., Sawyer J.K., Rudel L.L., 2007. Dietary fat-induced alterations in atherosclerosis are abolished by ACAT2-Deficiency in ApoB100 only, LDLr<sup>-/-</sup> mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, 27(6), 1396–402.
- Berg, J.M., Tymoczko J.L., Stryer L., 2002. *Biochemistry* (5th edition). W.H. Freeman, New York.
- Breitling, R., Laubner D., Clizbe D., Adamski J., Krisans S.K., 2003. Isopentenyl-diphosphate isomerases in human and mouse: evolutionary analysis of a mammalian gene duplication. *J Mol Evol.*, 57(3), 282–91.
- Buhman, K.K., Accad M., Novak S., Choi R.S., Wong J.S., Hamilton R.L., Turley S., Farese R.V. Jr., 2000. Resistance to diet-induced hypercholesterolemia and gallstone formation in ACAT2-deficient mice. *Nature Medicine*, 6(12), 1341–1347.
- Caldas, H., Cunningham D., Wang X., Jiang F., Humphries L., Kelley R.I., Herman G.E., 2005. Placental defects are associated with male lethality in bare patches and striated embryos deficient in the NAD(P)H Steroid Dehydrogenase-like (NSDHL) Enzyme. *Mol Genet Metab.*, 84(1),48–60.
- Camarota, L.M., Chapman J.M., Hui D.Y., Howles P.N., 2004. Carboxyl ester lipase cofractionates with scavenger receptor-BI in hepatocyte lipid rafts and enhances selective uptake and hydrolysis of cholesteryl esters from HDL. *J. Biol. Chem.*, 279(26), 27599–27606.



- Cankaya, M., Hernandez A.M., Ciftci M., Beydemir S., Ozdemir H., Budak H., Gulcin I., Comakli V., Emircupani T., Ekinci D., Kuzu M., Jiang Q., Eichele G., Kufrevioglu O.I., 2007. An analysis of expression patterns of genes encoding proteins with catalytic activities. *BMC Genomics*, 8, 232.
- Cases, S., Novak S., Zheng Y.W., Myers H.M., Lear S.R., Sande E., Welch C.B., Lusis A.J., Spencer T.A., Krause B.R., Erickson S.K., Farese R.V. Jr., 1998. ACAT-2, A Second Mammalian Acyl-CoA:Cholesterol Acyltransferase Its Cloning, Expression, And Characterization. *Biol Chem*, 273(41), 26755–26764.
- Champe C. and Harvey R. A., 1997. Lippincott Biyokimya Çeviri Editörleri: Prof. Dr.Asuman Tokullugil, Uzm. Dr. Melehat Dirican, Uzm. Dr. Engin Ulukaya, Nobel Tıp Kitabevi, 2. Baskı
- Chang, C. and Yoshida A., 1994. Cloning and characterization of the gene encoding mouse mitochondrial aldehyde dehydrogenase. *Gene.*, 148(2), 331–336.
- Chen, J.Y., Levy-Wilson B., Goodart S., Cooper A.D., 2002. Mice Expressing the Human CYP7A1 Gene in the Mouse CYP7A1 Knock-out Background Lack Induction of CYP7A1 Expression by Cholesterol Feeding and Have Increased Hypercholesterolemia When Fed a High Fat Diet. *J. Biol. Chem.*, 277(45), 42588-42595.
- Choudhary, D., Jansson I., Schenkman J.B., Sarfarazi M., Stoilov I., 2003. Comparative expression profiling of 40 mouse cytochrome P450 genes in embryonic and adult tissues. *Arch Biochem Biophys.*, 414(1), 91–100.
- Chu, X., Yu W., Wu L., Liu X., Li N., Li D., 2007. Effect of a disulfide bond on mevalonate kinase. *Biochim Biophys Acta.*, 1774(12), 1571–81.
- Collins, B.S., Tansey T.R., Shechter I., 2001. Comparative squalene synthase gene expression in mouse liver and testis. *Arch Biochem Biophys.*, 395(2), 253–8.
- Correa-Cerro, L.S. and Porter F.D., 2005. 3 $\beta$ -Hydroxysterol  $\Delta^7$ -reductase and the Smith–Lemli–Opitz syndrome. *Molecular Genetics and Metabolism*, 84(2), 112–126.
- Cotman, M., Jezek D., Fon Tacer K., Frangez R., Rozman D., 2004. A functional cytochrome P450 lanosterol 14 alpha-demethylase CYP51 enzyme in the acrosome: transport through the Golgi and synthesis of meiosis-activating sterols. *Endocrinology*, 145(3), 1419–26.
- Cui, X.S., Li X.Y., Shen X.H., Bae Y.J., Kang J.J., Kim N.H., 2007. Transcription profile in mouse four-cell, morula, and blastocyst: Genes implicated in compaction and blastocoel formation. *Mol Reprod Dev.*, 74(2), 133–43.
- Debeljak, N., Horvat S., Vouk K., Lee M., Rozman D., 2000. Characterization of the mouse lanosterol 14alpha-demethylase (CYP51), a new member of the evolutionarily most conserved cytochrome P450 family. *Arch Biochem Biophys.*, 379(1), 37–45.
- Discala, C., Ninnin, M., Achard, F., Barillot, E., Vaysseix, G., 1999. DBcat: a catalog of biological databases. *Nucleic Acids Research*, 27(1), 10-11.
- Di Stasi, D., Vallacchi V., Campi V., Ranzani T., Daniotti M., Chiodini E., Fiorentini S., Greeve I., Prinetti A., Rivoltini L., Pierotti M.A., Rodolfo M., 2005. DHCR24 gene expression is upregulated in melanoma metastases and associated to resistance to oxidative stress-induced apoptosis. *Int J Cancer.*, 115(2), 224–30.
- Du, H., Witte D.P., Grabowski G.A., 1996. Tissue and cellular specific expression of murine lysosomal acid lipase mRNA and protein. *J Lipid Res*, 37(5), 937–49.

- Du, H., Duanmu M., Witte D., Grabowski G.A., 1998. Targeted disruption of the mouse lysosomal acid lipase gene: long-term survival with massive cholesteryl ester and triglyceride storage. *Hum Mol Genet*, 7(9), 1347–54.
- Dubrac, S., Lear S.R., Ananthanarayanan M., Balasubramaniyan N., Bollineni J., Shefer S., Hyogo H., Cohen D.E., Blanche P.J., Krauss R.M., Batta A.K., Salen G., Suchy F.J., Maeda N., Erickson S.K., 2005. Role of CYP27A in cholesterol and bile acid metabolism. *Journal of Lipid Research*, 46(1), 76–85.
- Gondre-Lewis, M.C., Petrache H.I., Wassif C.A., Harries D., Parsegian A., Porter F.D., Loh Y.P., 2006. Abnormal sterols in cholesterol-deficiency diseases cause secretory granule malformation and decreased membrane curvature. *Journal of Cell Science*, 119(Pt 9), 1876–1885.
- Gümüştaş, M.K., 2008. Lipoprotein ve Kolesterol Metabolizması, (Editörler: Telefoncu A., Değer, O., Kılınç, A., Çolak, A.) *Metabolizmanın Regülasyonu ve Metabolik Bozukluklar*, S.111-128.
- Hanaka, S., Abe T., Itakura H., Matsumoto A., 2000. Gene expression related to cholesterol metabolism in mouse brain during development. *Brain and Development*, 22(5), 321–326.
- Haselbeck, R.J., Ang H.L., Deltour L., Duester G., 1997. Retinoic acid and alcohol/retinol dehydrogenase in the mouse adrenal gland: a potential endocrine source of retinoic acid during development. *Endocrinology*, 138(7), 3035–3041.
- Haselbeck, R.J. and Duester G., 1998. ADH1 and ADH4 alcohol/retinol dehydrogenases in the developing adrenal blastema provide evidence for embryonic retinoid endocrine function. *Dev Dyn*, 213(1), 114–1120.
- Herzig, U., Cadenas C., Sieckmann F., Sierralta W., Thaller C., Visel A., Eichele G., 2001. Development of high-throughput tools to unravel the complexity of gene expression patterns in the mammalian brain. In: *Complexity in Biological Information Processing*. Bock G. and Goode J., eds. Novartis Foundation Symposium 239 (John Wiley & Sons, Chicester), pp. 129-149.
- Hewitt, K.N., Boon W.C., Murata Y., Jones M.E., Simpson E.R., 2003. The aromatase knockout mouse presents with a sexually dimorphic disruption to cholesterol homeostasis. *Endocrinology*, 144(9), 3895–3903.
- Hogenboom, S., Romeijn G.J., Houten S.M., Baes M., Wanders R.J.A., Waterham H.R., 2002. Absence of functional peroxisomes does not lead to deficiency of enzymes involved in cholesterol biosynthesis. *Journal of Lipid Research*, 43, 90–98.
- Hosfield, D.J., Zhang Y., Dougan D.R., Broun A., Tari L.W., Swanson R.V., Finn J., 2004. Structural basis for bisphosphonate-mediated inhibition of isoprenoid biosynthesis. *J Biol Chem.*, 279(10), 8526–8529.
- Houten, S.M., Koster J., Romeijn G.J., Frenkel J., Di Rocco M., Caruso U., Landrieu P., Kelley R.I., Kuis W., Poll-The B.T., Gibson K.M., Wanders R.J., Waterham H.R., 2001. Organization of the mevalonate kinase (MVK) gene and identification of novel mutations causing mevalonic aciduria and hyperimmunoglobulinaemia D and periodic fever syndrome. *Eur J Hum Genet.*, 9(4), 253–259.

- Hubbard, B., Doege H., Punreddy S., Wu H., Huang X., Kaushik V.K., Mozell R.L., Byrnes J.J., Stricker-Krongrad A., Chou C.J., Tartaglia L.A., Lodish H.F., Stahl A., Gimeno R.E., 2006. Mice deleted for fatty acid transport protein 5 have defective bile acid conjugation and are protected from obesity. *Gastroenterology*, 130(4), 1259-1269.
- Ibdah, J.A., Paul H., Zhao Y., Binford S., Salleng K., Cline M., Matern D., Bennett M.J., Rinaldo P., Strauss A.W., 2001. Lack of mitochondrial trifunctional protein in mice causes neonatal hypoglycemia and sudden death. *J Clin Invest.*, 107(11), 1403-1409.
- Jagalur, M., Pal C., Lea med-Miller E., Zoeller R.T., Kulp D., 2007. Analyzing *in situ* gene expression in the mouse brain with image registration, feature extraction and block clustering. *BMC Bioinformatics*, 8 (Suppl 10):S5
- Jiang, F. and Herman G.E., 2006. Analysis of *Nsdhl*-deficient embryos reveals a role for Hedgehog signaling in early placental development. *Hum Mol Genet.*, 15(22), 3293–3305.
- Kannius-Janson, M., Lidberg U., Hulten K., Gritli-Linde A., Bjursell G., Nilsson J., 1998. Studies of the regulation of the mouse carboxyl ester lipase gene in mammary gland. *Biochem J.*, 336 (3), 577-585.
- Keha, E.E. ve Küfrevioğlu, Ö.İ., 2007. *Biyokimya, Aktif Yayınevi, Erzurum.*
- Klug, W.S., Cummings R.M. et al. 2002. *Genetik Kavramalar (Çeviri: C. Öner) Palme yayıncılık.*
- Kovacs, W.J., Olivier L.M., Krisans S.K., 2002. Central role of peroxisomes in isoprenoid biosynthesis. *Prog Lipid Res.*, 41(5), 369–391.
- Krakowiak, P.A., Wassif C.A., Kratz L., Cozma D., Kovarova M., Harris G., Grinberg A., Yang Y., Hunter A.G., Tsokos M., Kelley R.I., Porter F.D., 2003. Lathosterolosis: an inborn error of human and murine cholesterol synthesis due to lathosterol 5-desaturase deficiency. *Hum Mol Genet.*, 12(13), 1631–1641.
- Krepkiy, D. and Miziorko H.M., 2004. Identification of active site residues in mevalonate diphosphate decarboxylase: implications for a family of phosphotransferases. *Protein Sci.*, 13(7), 1875–1881.
- Krieg, P.A., Melton, D.A., 1987. *In vitro* RNA synthesis with SP6 RNA polymerase. *Methods Enzymol.*, 155, 397-415.
- Küfrevioğlu, Ö.İ., 2003. *Gen Ekspresyon Analizi Ve Mikroarrayler (Editörler: Telefoncu A., Küfrevioğlu, Ö.İ., Pazarlıoğlu N.) Biyoinformatik-1 S.167-175 .*
- Küfrevioğlu, Ö.İ., 2005. *Gen Ekspresyonu Analizi Yüksek Lisans Ders Notları.*
- Küfrevioğlu, Ö.İ., 2008. *Metabolizmanın Genetik Regülasyonu (Editörler: Telefoncu A., Değer, O., Kılınç, A., Çolak, A.) Metabolizmanın Regülasyonu ve Metabolik Bozukluklar S.31-39.*
- Lee, R.G., Kelley K.L., Sawyer J.K., Farese R.V. Jr., Parks J.S., Rudel L.L., 2004. Plasma Cholesteryl Esters Provided by Lecithin:Cholesterol Acyltransferase and Acyl-Coenzyme A:Cholesterol Acyltransferase 2 Have Opposite Atherosclerotic Potential. *Circ. Res.*, 95(10), 998-1004.
- Lemmens, I.H., Kas K., Merregaert J., Van de Ven W.J., 1998. Identification and molecular characterization of TM7SF2 in the FAUNA gene cluster on human chromosome 11q13. *Genomics*, 49(3), 437–442.
- Lewin B., *Genes VIII*, (2004) pearson Education inc. S. 1–545

- Lian, X., Yan C., Yang L., Xu Y., Du H., 2004. Lysosomal acid lipase deficiency causes respiratory inflammation and destruction in the lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 286(4), L801–807.
- Lu, X., Kambe F., Cao X., Yoshida T., Ohmori S., Murakami K., Kaji T., Ishii T., Zadworny D., Seo H., 2006. DHCR24-knockout embryonic fibroblasts are susceptible to serum withdrawal-induced apoptosis because of dysfunction of caveolae and insulin-Akt-Bad signaling. *Endocrinology*, 147(6), 3123–3132.
- McCaffery, P., Tempst P., Lara G., Drager U.C., 1991. Aldehyde dehydrogenase is a positional marker in the retina. *Development*, 112(3), 693–702.
- Marijanovic, Z., Laubner D., Moller G., Gege C., Husen B., Adamski J., Breitling R., 2003. Closing the gap: identification of human 3-ketosteroid reductase, the last unknown enzyme of mammalian cholesterol biosynthesis. *Mol Endocrinol.*, 17(9), 1715–1725.
- Martin, D., Piulachs M.D., Cunillera N., Ferrer A., Belles X., 2007. Mitochondrial targeting of farnesyl diphosphate synthase is a widespread phenomenon in eukaryotes. *Biochim Biophys Acta.*, 1773(3), 419–426.
- Mirza, R., Hayasaka S., Takagishi Y., Kambe F., Ohmori S., Maki K., Yamamoto M., Murakami K., Kaji T., Zadworny D., Murata Y., Seo H., 2006. DHCR24 gene knockout mice demonstrate lethal dermopathy with differentiation and maturation defects in the epidermis. *Journal of Investigative Dermatology*, 126(3), 638–647.
- Mitchell, E.K., Taylor D.F., Woods K., Davis M.J., Nelson A.L., Teasdale R.D., Grimmond S.M., Little M.H., Bertram J.F., Caruana G., 2006. Differential gene expression in the developing mouse ureter. *Gene Expr Patterns*, 6(5), 519–538.
- Nagai, M., Sakakibara J., Nakamura Y., Gejyo F., Ono T., 2002. SREBP-2 and NF-Y are involved in the transcriptional regulation of squalene epoxidase. *Biochem Biophys Res Commun.*, 295(1), 74–80.
- Nelson, D.L., Cox M.M., 2005. *Lehninger Biyokimyanın İlkeleri*, Çeviri Editörü: Prof.Dr. Nedret Kılıç, Üçüncü Baskıdan Çeviri, Palme Yayıncılık.
- Ohashi, K., Osuga J., Tozawa R., Kitamine T., Yagyu H., Sekiya M., Tomita S., Okazaki H., Tamura Y., Yahagi N., Iizuka Y., Harada K., Gotoda T., Shimano H., Yamada N., Ishibashi S., 2003a. Early embryonic lethality caused by targeted disruption of the 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase gene. *J Biol Chem.*, 278(44), 42936–42941.
- Ohashi, M., Mizushima N., Kabeya Y., Yoshimori T., 2003b. Localization of mammalian NAD(P)H steroid dehydrogenase-like protein on lipid droplets. *J Biol Chem.*, 278(38), 36819–36829.
- Ohnesorg, T. and Adamski J., 2006. Analysis of the 5' flanking regions of human and murine HSD17B7: identification of a cholesterol dependent enhancer region. *Mol Cell Endocrinol.*, 248(1–2), 164–167.
- Ohsawa, I., Nishimaki K., Yasuda C., Kamino K., Ohta S., 2003. Deficiency in a mitochondrial aldehyde dehydrogenase increases vulnerability to oxidative stress in PC12 cells. *Journal of Neurochemistry*, 84(5), 1110–1117.
- Olivier, L.M., Chambliss K.L., Gibson K.M., Krisans S.K., 1999. Characterization of phosphomevalonate kinase: chromosomal localization, regulation, and subcellular targeting. *The Journal of Lipid Research*, 40(4), 672–679.

- Paton, V.G., Shackelford J.E., Krisans S.K., 1997. Cloning and subcellular localization of hamster and rat isopentenyl diphosphate dimethylallyl diphosphate isomerase. A PTS1 motif targets the enzyme to peroxisomes. *J Biol Chem.*, 272(30), 18945–18950.
- Pedretti, A., Bocci E., Maggi R., Vistoli G., 2008. Homology modelling of human DHCR24 (seladin-1) and analysis of its binding properties through molecular docking and dynamics simulations. *Steroids*, 73(7), 708–719.
- Porcellini, E., Calabrese E., Guerini F., Govoni M., Chiappelli M., Tumini E., Morgan K., Chappell S., Kalsheker N., Franceschi M., Licastro F., 2007. The hydroxymethyl-glutaryl CoA reductase promoter polymorphism is associated with Alzheimer's risk and cognitive deterioration. *Neurosci Lett.*, 416(1), 66–70.
- Post, S.M., Groenendijk M., Solaas K., Rensen P.C., Princen H.M., 2004. Cholesterol 7-Hydroxylase Deficiency in Mice on an APOE\*3-Leiden Background Impairs Very-Low-Density Lipoprotein Production. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, 24(4), 768-774.
- Refolo, L.M., Pappolla M.A., LaFrancois J., Malester B., Schmidt S.D., Thomas-Bryant T., Tint G.S., Wang R., Mercken M., Petanceska S.S., Duff K.E., 2001. A cholesterol-lowering drug reduces beta-amyloid pathology in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis.*, 8(5), 890–899.
- Reymond, A., Marigo V., Yaylaoglu M.B., Leoni A., Ucla C., Scamuffa N., Caccioppoli C., Dermitzakis E.T., Lyle R., Banfi S., Eichele G., Antonarakis S.E., Ballabio A., 2002. Human chromosome 21 gene expression atlas in the mouse. *Nature*, 420(6915), 582–586.
- Ringwald, M., Eppig, J.T., Richardson, J.E., 2000. GXD: integrated access to gene expression data for the laboratory mouse. *Trends Genetic*, 16(4), 188-90.
- Romualdi, C., Campanaro S., Campagna D., Celegato B., Cannata N., Toppo S., Vale G. Lanfranchi G., 2003. *Human Molecular Genetics*, 12(8), 823-836, 10.1093/hmg/ddg093.
- Rosen, H., Reshef A., Maeda N., Lippoldt A., Shpizen S., Triger L., Eggertsen G., Björkhem I., Leitersdorf E., 1998. Markedly Reduced Bile Acid Synthesis but Maintained Levels of Cholesterol and Vitamin D Metabolites in Mice with Disrupted Sterol 27-Hydroxylase Gene. *Biol Chem*, 273(24), 14805–14812.
- Rout, U.K. and Armant D.R., 2002. Expression of genes for alcohol and aldehyde metabolizing enzymes in mouse oocytes and preimplantation embryos. *Reproductive Toxicology*, 16(3), 253-258.
- Ruf, A., Müller F., D'Arcy B., Stihle M., Kusznir E., Handschin C., Morand O.H., Thoma R., 2004. The monotopic membrane protein human oxidosqualene cyclase is active as monomer. *Biochem Biophys Res Commun.*, 315(2), 247–254.
- Schaiff, W.T., Knapp F.F. Jr., Barak Y., Biron-Shental T., Nelson D.M., Sadovsky Y., 2007. Ligand-activated peroxisome proliferator activated receptor alters placental morphology and placental fatty acid uptake in mice. *Endocrinology*, 148(8), 3625–3634.
- Schmuth, M., Ortegon A.M., Mao-Qiang M., Elias P.M., Feingold K.R., Stahl A., 2005. Differential expression of fatty acid transport proteins in epidermis and skin appendages. *Journal of Investigative Dermatology*, 125(6), 1174–1181.

- Silve, S., Dupuy P.H., Labit-Lebouteiller C., Kaghad M., Chalon P., Rahier A., Taton M., Lupker J., Shire D., Loison G., 1996. Emopamil-binding protein, a mammalian protein that binds a series of structurally diverse neuroprotective agents, exhibits delta8-delta7 sterol isomerase activity in yeast. *J Biol Chem.*, 271(37), 22434–22440.
- Solca, C., Pandit B., Yu H., Tint G.S., Patel S.B., 2007. Loss of apolipoprotein E exacerbates the neonatal lethality of the Smith-Lemli-Opitz syndrome mouse. *Mol Genet Metab.*, 91(1), 7–14.
- Tanaka, R.D., Schafer B.L., Lee L.Y., Freudemberger J.S., Mosley S.T., 1990. Purification and regulation of mevalonate kinase from rat liver. *J Biol Chem.*, 265(4), 2391–2398.
- Tiemann, M., Han Z., Soccio R., Bollineni J., Shefer S., Sehayek E., Breslow J.L., 2004. Cholesterol feeding of mice expressing cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase increases bile acid pool size despite decreased enzyme activity. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 101(7), 1846–1851.
- Turner, P.C., McLennan, A.G., Bates, A.D.O., 2004. White, M.R.H., *Molecular biology instant notes*, 2<sup>nd</sup> Edition, Nobel yayın.
- Vaz, F.M., Fouchier S.W., Ofman R., Sommer M., Wanders R.J., 2000. Molecular and biochemical characterization of rat gamma-trimethylaminobutyraldehyde dehydrogenase and evidence for the involvement of human aldehyde dehydrogenase 9 in carnitine biosynthesis. *J Biol Chem*, 275(10), 7390–7394.
- Vicent, D., Maratos-Flier E., Kahn C.R., 2000. The branch point enzyme of the mevalonate pathway for protein prenylation is overexpressed in the ob/ob mouse and induced by adipogenesis. *Mol Cell Biol.*, 20(6), 2158–2166.
- Visel, A., Thaller C., Eichele G., 2004. GenePaint.org: an atlas of gene expression patterns in the mouse embryo. *Nucleic Acids Research*, 32, D552–6.
- Vonesch, J.L., Nakshatri H., Philippe M., Chambon P., Dolle P., 1994. Stage and tissue-specific expression of the alcohol dehydrogenase 1 (Adh-1) gene during mouse development. *Dev Dyn*, 199(3), 199–213.
- Weng, W., Li L., Van Bennekum A.M., Potter S.H., Harrison E.H., Blaner W.S., Breslow J.L., Fisher E.A., 1999. Intestinal absorption of dietary cholesteryl ester is decreased but retinyl ester absorption is normal in carboxyl ester lipase knockout mice. *Biochemistry*, 38(13), 4143–4149.
- Westerlund, M., Galter D., Carmine A., Olson L., 2005. Tissue- and species-specific expression patterns of class I, III, and IV Adh and Aldh 1 mRNAs in rodent embryos. *Cell Tissue Res.*, 322(2), 227–236.
- Westerlund, M., Belin A.C., Felder M.R., Olson L., Galter D., 2007. High and complementary expression patterns of alcohol and aldehyde dehydrogenases in the gastrointestinal tract: implications for Parkinson's disease. *FEBS J.*, 274(5), 1212–1223.
- [www.genome.jp](http://www.genome.jp)
- Xu, B., Wang C., Yang J., Mao G., Zhang C., Liu D., Tai P., Zhou B., Xia G., Zhang M., 2008. Silencing of mouse hepatic lanosterol 14- $\alpha$  demethylase down-regulated plasma low-density lipoprotein cholesterol levels by short-term treatment of siRNA. *Biol Pharm Bull.*, 31(6), 1182–1191.

- Zgombic-Knight, M., Ang H.L., Foglio M.H., Duester G., 1995. Cloning of the mouse class IV alcohol dehydrogenase (retinol dehydrogenase) cDNA and tissue-specific expression patterns of the murine ADH gene family. *J Biol Chem.*, 270(18), 10868–10877.
- Zhao, Y., Yu L., Gao J., Fu Q., Hua Y.M., Zhang H.L., Zhao S.Y., 2000. cDNA cloning, chromosome mapping and expression characterization of human geranylgeranyl pyrophosphate synthase. *Science In China Series C-Life Sciences*, 43(6), 613–622.

## ÖZGEÇMİŞ

1980 yılında Erzurum'da doğdu. İlk ve orta öğrenimini Erzurum'da tamamladı. 1998 yılında girdiği Atatürk Üniversitesi, Kazım Karabekir Eğitim Fakültesi, Kimya Bölümü'nden 2003 yılında mezun oldu. Ekim 2003'de Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı'nda Doktora öğrenimime başladı ve halen doktora eğitimini sürdürmektedir. Atatürk Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümünde 2005 tarihinden itibaren Araştırma Görevlisi olarak çalışmaktadır.

Melda ŞİŞECİOĞLU