

**FARE GENOMUNDA BULUNAN GLUTAMAT
METABOLİZMASI GENLERİNİN cDNA'LARININ
ÜRETİLMESİ ve *İN SİTU* HİBRİDİZASYONU ile GEN
EKSPRESYON ANALİZİ**

Murat ÇANKAYA

**Doktora Tezi
Kimya Anabilim Dalı
Danışman: Prof. Dr. Hasan ÖZDEMİR
2008
Her hakkı saklıdır**

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Doktora Tezi

**FARE GENOMUNDA BULUNAN GLUTAMAT METABOLİZMASI
GENLERİNİN cDNA'LARININ ÜRETİLMESİ VE *IN SITU*
HİBRİDİZASYONU İLE GEN EKSPRESYON ANALİZİ**

Murat ÇANKAYA

Kimya Ana Bilimi Dalı

ERZURUM
2008

Her hakkı saklıdır

Prof. Dr. Hasan ÖZDEMİR danışmanlığında, Murat ÇANKAYA tarafından hazırlanan bu çalışma 07/05/2009 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Kimya Anabilim Dalı'nda Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. Ömer İrfan KÜFREViOĞLU

İmza: 

Üye : Prof. Dr. Hasan ÖZDEMİR

İmza: 

Üye : Prof. Dr. Mehmet ÇİFTÇİ

İmza: 

Üye : Prof. Dr. Ali YILDIRIM

İmza: 

Üye : Yrd. Doç. Dr. Taha Abdulkadir ÇOBAN

İmza: 

Yukarıdaki sonucu onaylarım.



Prof. Dr. Ömer AKBULUT

Enstitü Müdürü

ÖZET

Doktora Tezi

FARE GENOMUNDA BULUNAN GLUTAMAT METABOLİZMASI GENLERİNİN cDNA'LARININ ÜRETİLMESİ VE *İN SITU* HİBRİDİZASYONU İLE GEN EKSPRESYON ANALİZİ

Murat ÇANKAYA

Atatürk Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Hasan ÖZDEMİR

Günümüzde canlıya ait genlerin çoğunluğunun sekanslarının bulunması, birçok soruyu da beraberinde getirmiştir. Bunlardan biri de canlı genomunda bulunan genlerin fonksiyonlarını nasıl gösterdikleridir. Çoklu bileşenleri ihtiva eden düzenleyici metabolik ağın anlaşılması için her bir bileşenin ekspresyon zamanının ayrıntılı bir şekilde bilinmesi ile ileri bir derecede gelişmesine sebep olduğunu göstermiştir. Genlerin ekspresyon yeri ve zamanını belirlenmesi için farklı teknikler geliştirilmiştir. Bunlardan yaygın olarak kullanılanlardan bir tanesi *in situ* hibridizasyon'dur. *In situ* hibridizasyon gen ekspresyonu için güçlü bir tekniktir ve organizma ve organlar bulunan hücreler üzerinde yapılan gen ekspresyonlarında yüksek çözünürlükte bilgi sağlar.

Bu çalışmada glutamat metabolizmasında görev alan enzim genlerinden Nagk, Gnpnat1, Gfpt1, Ppat, Nadsyn1, Qars, Cad, Cps1, Gls, Gls2, Glul, Eprs, Ears2, Aldh4a1, Glud1, Got1, Got2, Gpt2, Gpt1, Aldh5a1, Gsr, Gss, Gclm, Gclc, Gad1, Gad2, Abat ve Gmps seçildi. Bu enzim genleri için spesifik primerler yapıldı. Daha sonra bu spesifik primerler kullanılarak spesifik cDNA kalıpları hazırlandı. cDNA kalıpları ile antisens mRNA'lar üretildi. Bu antisens mRNA'lar kullanılarak; 12.5, 14.5 ve 15.5 günlük fare embriyoları ve yetişkin fare beyni (P56) üzerinde *in situ* hibridizasyon yapıldı. Ekspresyon sonuçları otomatik bir mikroskopta incelenerek değerlendirilmeler yapıldı ve internet ortamına aktarıldı.

2008, 99 sayfa

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

ABSTRACT

Doctora Thesis

cDNA'S PRODUCTION OF GLUTAMATE METABOLISM GENES IN MOUSE
GENOME AND ANALYSIS OF GEN EXPRESSION BY *IN SITU* HYBRIDIZATION

Murat ÇANKAYA

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

Supervisor: Prof. Dr. Hasan ÖZDEMİR

Nowadays, sequences analysis of numerous genes which contain different organism has been identified. These results led to arise various questions. One of these, how genes which expressed living genome exhibits functions. Many examples demonstrate that an understanding of regulatory networks consisting of multiple components is significantly advanced by a detailed knowledge of the spatiotemporal expression pattern of each of the components. Investigation of expression time and place of genes has been developed different techniques. One of the common using techniques is *in situ* hybridization. *In situ* hybridization (ISH) is one of the powerful methods for gene expression, and provides high-resolution information on gene expression in cells where is located in the organs and organisms

In this study, gene of enzymes that have function in glutamate metabolism (Nagk, Gnpnat1, Gfpt1, Ppat, Nadsyn1, Qars, Cad, Cps1, Glc, Glc2, Glul, Eprs, Ears2, Aldh4a1, Glud1, Got1, Got2, Gpt2, Gpt1, Aldh5a1, Gsr, Gss, Gclm, Gclc, Gad1, Gad2, Abat and Gmps) was selected. Specific primers were arranged for these enzymes. Then specific cDNA templates were prepared with these specific primers. Antisense mRNAs was produced with specific cDNA templates. *In situ* hybridization which was used these antisense mRNAs on 12.5, 14.5, 15.5 days mouse embryos and adult mouse brain (P56) was made. Automated microscopic scanning of gene expression data were investigate and these results were transferred in internet

2008, 99 pages

Keywords: *In situ* hybridization, mRNA, cDNA

TEŞEKKÜR

Doktora çalışması olarak sunduğum bu çalışmanın deneysel kısmı, Atatürk Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyokimya Araştırma Laboratuvarı ve Max-Planck Enstitüsü Gen ve Davranışı Bölümünde (Göttingen) gerçekleştirilmiştir.

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

Çalışmalarıma büyük yardım ve ilgilerinden dolayı Atatürk Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü Başkanı Sayın Prof.Dr. Hasan SEÇEN'e ve Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyeleri, Sayın Doç.Dr. İlhami GÜLÇİN'e ve Sayın Doç.Dr. Şükrü BEYDEMİR'e, doktora öğrencileri Sayın Melda ŞİŞECİOĞLU, Sayın Harun BUDAK, Sayın Deniz EKİNCİ, Sayın Murat ŞENTÜRK'e teşekkür ederim.

Ayrıca çalışmalarım esnasında değerli katkılarından dolayı Max-Planck Enstitüsü Gen ve Davranışı Bölümü (Göttingen) çalışanlarına ve tüm Kimya Bölümü elemanlarına ve Fen Bilimleri Enstitüsü elemanlarına ve bu uzun çalışma boyunca gördüğüm destek ve teşvikten dolayı eşim ve çocuklarıma da teşekkür ederim.

Murat ÇANKAYA

Aralık 2008

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER DİZİNİ.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xi
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Gen Ekspresyonu.....	1
1.2. Gen Ekspresyon Analizi.....	5
1.3. Gen Klonlama	8
1.4. Glutamat metabolizması.....	10
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	15
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	24
3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	24
3.2. Yararlanılan Alet ve Cihazlar.....	26
3.3. Kullanılan Çözeltiler.....	27
3.3. Glutamat Metabolizması için Gen Seçimi.....	30
3.4. Spesifik Genler İçin İnternet Kullanılarak Primer Dizaynı.....	32
3.5.1.cDNA probu yapılacak gen sekansına ulaşılması.....	32
3.5.2.cDNA probu yapılacak gen sekansının blastlanması.....	34
3.5.3.cDNA probu için primer dizaynı.....	38
3.6. RNA-İzolasyonu.....	44
3.7. cDNA Kütüphanesi Hazırlanması (RT PCR).....	45
3.8. Spesifik Genler İçin cDNA Problarının Hazırlanması.....	46
3.9. Antisens mRNA Üretimi.....	48
3.10. <i>In situ</i> Hibridizasyon (ISH) Yönteminin Uygulanması.....	50
3.11. Gen Expresion Örneklerinin Değerlendirilmesi.....	57
4.ARAŞTIRMA BULGULARI.....	59
4.1. Spesifik Genler İçin cDNA Problarının ve Spesifik Antisens mRNA'larının Agaroz Elektroforez Sonuçları.....	62

4.3. In Situ Hibridizasyon Sonuçları.....	63
5.TARTIŞMA ve SONUÇ.....	85
KAYNAKLAR.....	97
ÖZGEÇMİŞ.....	100

SİMGELER DİZİNİ

AP	Alkalen fosfataz
BCIP	5-bromo-4-kloro-3-indolilfosfat,4-toluidin tuzu
cDNA	Komplementer DNA
dd	Didestile su
DNA	Deoksiribonükleyik asit
DDT	Ditiyotreitöl
DEPC	Dietilpirokarbonat
dNTP	Deoksinükleotidtrifosfat
E.C.	Enzim kod numarası
E.coli	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Etilen diamin tetra aset asidi
HRE-	Hormon cevap elementi
ISH	<i>In situ</i> hibridizasyon
mRNA	Messenger RNA
NBT	Nitroblue tetrazolium klorür
PBS	Fosfat
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
PFA	Paraform aldehit
PK	Proteinaz K
RNA	Ribonükleik asit
RNAsin	RNAaze inhibitörü
rRNA	Ribozomal RNA
RT-PCR	Revers transkriptaz PCR
TBE	Tris Borat EDTA tamponu
TE	Transkripsiyon elementleri
Tris	Trihidroksimetil amino metan
tRNA	Ttransfer RNA

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3.1. Glutamat metabolizması ve ilişkili metabolik yollar.....	31
Şekil 3.2. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ web sayfası. “Search” karşısına “Nucleotide” seçildi, “for” karşısına araştırılacak genin Accession number’ı (NM_010344) yazılır ve “daha sonra “go” tuşuna basıldı.....	32
Şekil 3.3. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ web sayfasından bulunan mus musculus glutatyon redüktaz 1 geni (Gsr) için sorgu sonucu.....	33
Şekil 3.4. Mus musculus glutathione reductase 1 (Gsr) geninin sekansının olduğu sayfanın üst tarafı.....	33
Şekil 3.5. Mus musculus glutatyon redüktaz 1 (Gsr) geninin sekansının olduğu sayfanın alt tarafı.....	34
Şekil 3.6. Blastlamanın yapıldığı web sayfasının girişi.“Nucleotide blast” tuşuna basılarak işlem başlatıldı.....	35
Şekil 3.7. Blastlamanın yapıldığı web sayfasının açılmış hali. İlgili yerler dolduruldu ve “BLAST” tuşuna basıldı.....	35
Şekil 3.8. Mus musculus glutatyon redüktaz 1 (Gsr) geni için yapılan blastlama sonucunun üst tarafı.....	35
Şekil 3.9. Mus musculus glutatyon redüktaz 1 (Gsr) geni için yapılan blastlama sonucunun alt tarafı.....	35
Şekil 3.10. Mus musculus glutatyon redüktaz 1 (Gsr) geni için, diğer genlerle en az homolojinin olduğu ve baz sıralamasında 0-1100 arasındaki bölgeden seçilen cDNA parçası.....	37
Şekil 3.11. Primer belirlemek için kullanılan site: Gen sekansı yukarıdaki kutucuğa yapıştırıldı. Genin kısa adı, istenen cDNA boyutu, primer büyüklüğü vb. bilgiler girildi.....	39
Şekil 3.12. Primer oluşturma programının bulduğu primerlerin baz sıralarının üst tarafı ve forward primerin seçilen kısmı.....	40
Şekil 3.13. Primer oluşturma programının bulduğu primerlerin baz sıralarının alt tarafı ve revers primerin seçilen kısmı.....	40
Şekil 3.14. Left (forward) primerin blastlama sonucunun üst tarafı.....	41

Şekil 3.15. Left (forward) primerin blastlama sonucunda ortaya çıkan ve ilgili primerlerle homolojisi olan genler. Query: verilen primerin baz sırası, Sbjt: Homoloji gösteren genin ilgili bölgesi.....	41
Şekil 3.16. Right (revers) primerin blastlama sonucunun üst tarafı.....	42
Şekil 3.17. Right (revers) primerin blastlama sonucunda ortaya çıkan ve ilgili primerlerle homolojisi olan genler. Query: verilen primerin baz sırası, Sbjt: homoloji gösteren genin ilgili bölgesi.....	42
Şekil 3.18. cDNA'dan üretilecek olan DNA parçası (cDNA probu).....	43
Şekil 3.19. cDNA probu için yapılan blastlama sonucu.....	43
Şekil 3.20. 14.5 günlük fare embriyosundaki bazı organ ve yapıların yerlerinin gösterilmesi.....	51
Şekil 3.21. 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.....	52
Şekil 3.22. Slâytlerin hazırlanma şekli (sandviç); slâyt resminde slâyt ile kullanılan cam arasındaki boşluk 80 µm ve slaytın aldığı toplam hacim ise 400 µL'dir.	52
Şekil 3.23. (A): Slâyt kaplama makinesi, (B): Slâytları icemede kullanılan mikroskop, (C): Slâytlerin taramasının yapıldığı scanner cihazı.....	57
Şekil 3.24. Genepaint.org sorgu ve sonuç sayfası (A) Bölümlerin hazırladığı kısım (B), Burada seçilen gen resmi programı kullanarak büyütülüp, küçülterek ilgilenilen kısmın incelenmesini sağlar. (C-E). Yetişkin fare beyindeki bazı ekspresyon örnekleri görülmektedir. Biolojik verilere, internetdeki yerel sayfalardan ve bu web sayfasından ulaşılabilir (Discala 1999, Ringwald 2000).....	58
Şekil 4.1. Spesifik genler için yapılan cDNA problemlerine ait agaroz elektroforezi sonucu 1.)Gnpnat1 2.) Gfpt1 3.) Ppat 4.) Ears2 5.) Nadsyn1 6.) Gclc 7.) Qars 8.) Gls2 9.) Eprs 10.) Glul 11.) Aldh5a1 12.)Gsr 13.) Gpt2 14.) Aldh4a1 15.) Cad 16.)Abat 17.) Cps1.....	62
Şekil 4.2. Spesifik genler için yapılan antiens mRNA'larına yani hazırlanan mRNA problemlerine ait agaroz elektroforez sonucu. Burada ilk fotoğrafta 12 tane için görülmektedir. Diğerleri içinde aynı sonuçlar elde edildi.....	63

Şekil 4.3. Glutamil-prolil-tRNA sentetaz (Eprs) geninin 12.5 günlük fare embriyosu üzerinde farklı kesimlerde yapılan in situ hibridizasyon işlemlerinde elde edilen sonuçlar.....	64
Şekil 4.4. Glutamil-prolil-tRNA sentetaz (Eprs) geninin 14.5 günlük fare embriyosu üzerinde farklı kesimlerde yapılan in situ hibridizasyon işlemlerinde elde edilen sonuçlar.....	65
Şekil 4.5. Glutamil-prolil-tRNA sentetaz (Eprs) geninin 15.5 günlük fare embriyosu üzerinde farklı kesimlerde yapılan in situ hibridizasyon işlemlerinde elde edilen sonuçlar.....	66
Şekil 4.6. Glutamil-prolil-tRNA sentetaz (Eprs) geninin P56 yetişkin fare beyni üzerinde farklı kesimlerde yapılan in situ hibridizasyon işlemlerinde elde edilen sonuçlar.	67
Şekil 4.7. Karbamoil-fosfat sentetaz 2, aspartat transkarbamilaz (Cad) geninin E12.5 günlük fare embriyosu üzerinde farklı kesimlerde yapılan in situ hibridizasyon işlemlerinde elde edilen sonuçlar.	68
Şekil 4.8. Karbamoil-fosfat sentetaz 2, aspartat transkarbamilaz (Cad) geninin 14.5 günlük fare embriyosu üzerinde farklı kesimlerde yapılan in situ hibridizasyon işlemlerinde elde edilen sonuçlar.	69
Şekil 4.9. Karbamoil-fosfat sentetaz 2, aspartat transkarbamilaz (Cad) geninin 15.5 günlük fare embriyosu üzerinde farklı kesimlerde yapılan in situ hibridizasyon işlemlerinde elde edilen sonuçlar.	70
Şekil 4.10. Karbamoil-fosfat sentetaz 2, aspartat transkarbamilaz (Cad) geninin P56 yetişkin fare beyni üzerinde farklı kesimlerde yapılan in situ hibridizasyon işlemlerinde elde edilen sonuçlar.	71
Şekil 4.11. NAD synthetase 1 (Nadsyn1) geninin 12.5 günlük fare embriyosu üzerinde farklı kesimlerde yapılan in situ hibridizasyon işlemlerinde elde edilen sonuçlar.	72
Şekil 4.12. NAD synthetase 1 (Nadsyn1) geninin 14.5 günlük fare embriyosu üzerinde farklı kesimlerde yapılan in situ hibridizasyon işlemlerinde elde edilen sonuçlar.....	73
Şekil 4.13. NAD synthetase 1 (Nadsyn1) geninin 15.5 günlük fare embriyosu üzerinde farklı kesimlerde yapılan in situ hibridizasyon işlemlerinde elde edilen	

sonuçlar.....	74
Şekil 4.14 NAD synthetase 1 (Nadsyn1) geninin P56 yetişkin fare beyni üzerinde farklı kesimlerde yapılan in situ hibridizasyon işlemlerinde elde edilen sonuçlar.....	75

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. Kullanılan kimyasal maddeler.....	24
Çizelge 3.2 Belirli bir cDNA için yapılan PCR reaksiyon karışımı.....	48
Çizelge 3.3. Antisens mRNA üretimi için ependrof tüpüne yapılan pipetlemeler.....	49
Çizelge 3.4. Dnase karışımının hazırlanması.....	49
Çizelge 3.5 İn situ hibridizasyon işlemlerinin basamaklar halinde gösterilmesi.....	53
Çizelge 4.1. Yeni çalışılan glutamat metabolizması genleri için primer dizaynı sonuçlarına ait bilgiler	60
Çizelge 4.2. Önceden çalışılan glutamat metabolizması genleri için primer dizaynı sonuçlarına ait bilgiler.....	61
Çizelge 4.3. Glutamat metabolizmasının bütün genleri için 12,5 günlük fare embriyosu dönemindeki ekspresyon yorumları ve ekspresyon çalışmaları sonucu http://www.genepaint.org/ web sayfasına aktarılan gen ekspresyon fotoğraflarına ulaşılabilinecek kod numaraları.....	76
Çizelge 4.4. Glutamat metabolizmasının bütün 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.....	78
Çizelge 4.5. Glutamat metabolizmasının bütün genleri için 15,5 günlük fare embriyosu dönemindeki ekspresyon yorumları ve ekspresyon çalışmaları sonucu http://www.genepaint.org/ web sayfasına aktarılan gen ekspresyon fotoğraflarına ulaşılabilinecek kod numaraları.....	80
Çizelge 4.6. Glutamat metabolizmasının bütün genleri için postnatal fare beyninde (P56) günlük fare embriyosu dönemindeki ekspresyon yorumları ve ekspresyon çalışmaları sonucu http://www.genepaint.org/ web sayfasına aktarılan gen ekspresyon fotoğraflarına ulaşılabilinecek kod numaraları.....	82
Çizelge 5.1 Glutamat metabolizmasının bütün genleri için E12,5, E14,5, E15,5 günlük fare embriyonik dönemleri ve postnatal fare beyninde (P56) ekspresyon yorumları karşılaştırması.....	92

1. GİRİŞ

1.1 Gen Ekspresyonu

Gen ekspresyonu, canlılarda bulunan DNA'nın içerdiği genetik bilginin kullanılmasıdır. Gen moleküler manada, fonksiyonel bir ürün; rRNA (ribozomal RNA), tRNA (transfer RNA) ve polipeptit sentezini kodlanmasında rol alan DNA dizisi olarak tanımlanabilir. Normal hücrelerde genetik bilginin akışı



yönündedir.

Canlılarda, mRNA'dan proteinlerin sentezlenmesi basamağı yani transkripsiyon genetik ifadenin denetlenmesi ve düzenlenmesindeki en önemli basamaktır. Tek veya çok hücreli canlılarda her proteine ihtiyaçlar farklı düzeydedir. Aynı canlıda bulunan hücrelerden bir kısmı belirli proteine ihtiyaç duyarken diğerlerinin aynı proteine ihtiyacı yoktur. Bu mekanizma genetik seviyede düzenlenme ile olur bu da DNA düzeyinde ilgili genin baskılanıp veya aktif hale gelmesi ile sağlanır (Klug *et al.* 2002; Turner *et al.* 2004; Lewin 2004).

RNA polimeraz tarafından RNA sentezlenirken, RNA polimerazın sigma alt birimleri direkt olarak genin promotor bölgesine bağlanır. RNA polimeraz reaksiyona başlaması için nükleosit trifosfatlara ihtiyaç vardır. RNA polimeraz DNA polimerazlar gibi bir kalıba ihtiyacı duymazlar. RNA polimerazın bağlanmasında çeşitli faktörler vardır. Bunlar DNA'daki konsensus dizilerdir ki çeşitli genlere RNA polimerazın etkin bağlanmasını sağlayan dizilerdir. Başka bir faktör ise gen ifadesi düzeyinde önemli değişikliklere neden olan RNA polimerazın farklı promotora bağlanmasındaki farklılıklardır. Promotor dizisindeki farklılığa bağlı olan bu bağlanma farklılığı promotor gücü olarak tanımlanır (Klug *et al.* 2002; Turner *et al.* 2004; Lewin 2004).

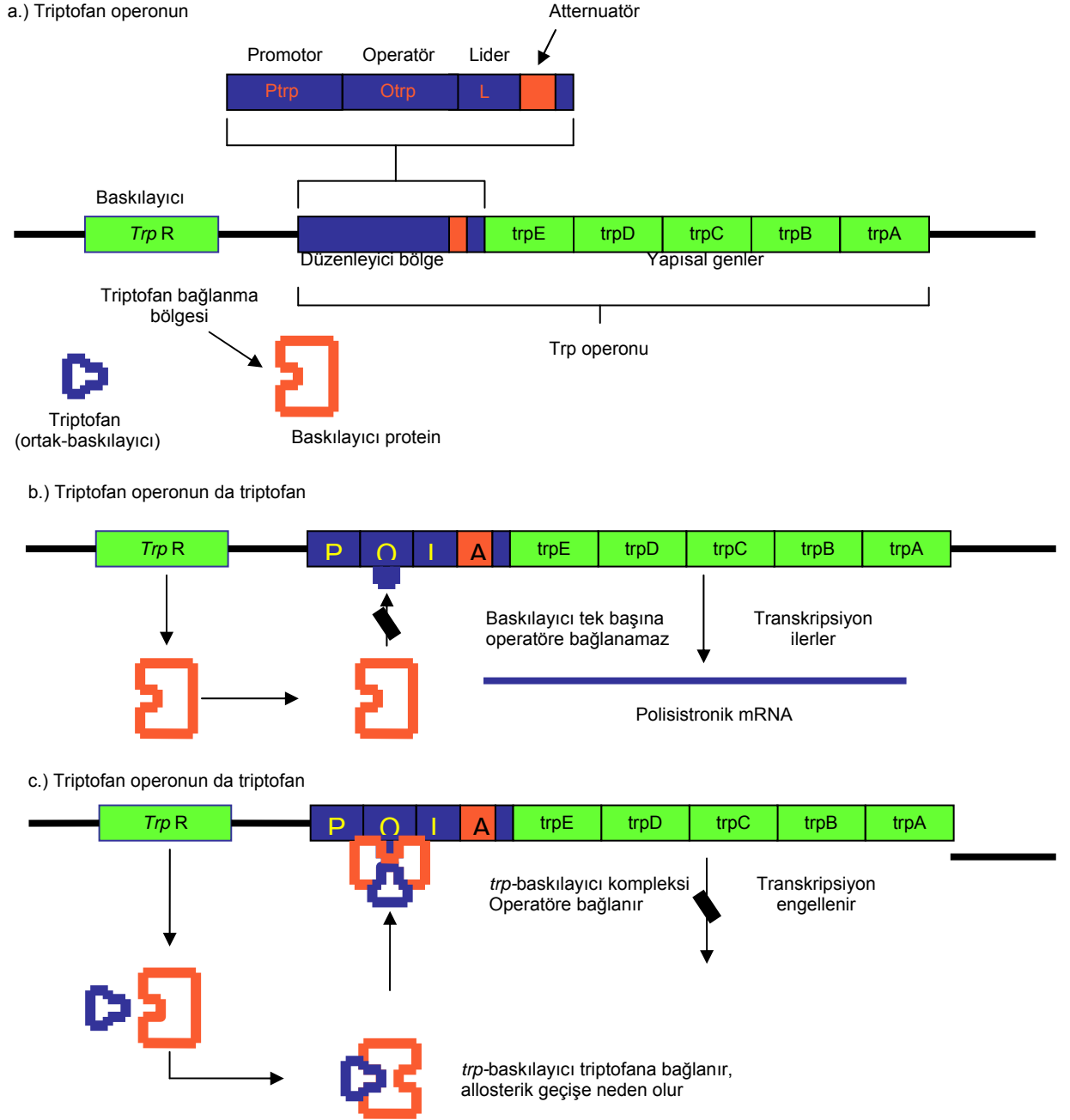
Prokaryotlarda transkripsiyonun düzenlenme mekanizması "operon" modeliyle açıklanırken, çok hücreli ökaryotlarda çok daha karmaşık ve birçok faktörün rol aldığı bir olaydır. Aslında bir gen yapısı, transkripsiyonunu düzenleyen "transkripsiyon elementlerini (TE)" de içinde bulundurur. Promoterler, RNA 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, promoter bölgeden binlerce baz ötede bulunabilir ve daha başka genlerin kontrolünde de rol oynayabilir. TE'ler; bazı hormon ve sinyallere cevabın (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 aktifleştirilen yüzlerce çeşit transkripsiyon faktörlerinden bir veya birkaçı bağlanarak, ökaryotik genetik ekspresyonu düzenler (Klug *et al.* 2002; Turner *et al.* 2004; Lewin 2004).

Prokaryotlardaki genetik ifadenin düzenlenmesi mekanizmasının operon modeliyle açıklandığı yukarıda ifade edilmişti. Operonlar bakterilerde çok sayıda genlerin kümелendiği ve bu genlerin regülasyonunu da sağlayan dizilişleri taşıyan DNA bölgeleridir. Bakterilerde açıklığa kavuşturulan ilk operon E.coli'deki laktoz operonudur (lac operon). E.coli, karbon kaynağı olarak laktozu kullanabilir. Bu şekerin metabolizmasında rol alan en önemli enzim, laktozu galaktoz ve glukozu hidrolizleyen β -galaktozidaz'dır. Laktozlu bir ortamda yaşayan bir E.coli hücresi bu enzimden binlerce molekül ihtiva eder. Karbon kaynağı olarak gliserol veya glukoz gibi başka bileşikler kullanan bakterilerde β -galaktozidaz moleküllerinin sayısı çok daha azdır. Yani β -galaktozidaz indüklenebilir bir enzimdir. Bu enzim ile birlikte, aynı gen tarafından galaktosit permeaz ve tiyogalaktoz transasetilaz enzimleri de sentezlenir. Permeaz, laktozun bakteri hücresi membranından geçişini sağlayan bir transport proteini

iken, transasetilaz farklı bir fonksiyona sahiptir (Klug *et al.* 2002; Turner *et al.* 2004; Lewin 2004).

E.coli'de bu enzimlerin fizyolojik indükleyicisi olarak laktozun transglukasyonu ile oluşan allolaktöz görev yapmaktadır. Bu bileşiğin oluşumu indüksiyon öncesi hücrede mevcut olan az miktarda β -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 regülâtör (düzenleyici) gen, bir operatör gen ve bir seri yapısal genler oluşturmaktadır. Regülâtör gen, operatör genle etkileşebilen ve protein yapısında molekül olan bir represör meydana getirir. Operatör gen kontrol ettiği yapısal genlerin bitişiğinde 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 promoter 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 (Lodish *et al.* 2001; Klug *et al.* 2002; Lehninger *et al.* 2005; Keha *et al.* 2005).

Prokaryotlardaki başka bir operon ise TRP (triptofan operonu)'dur Bu operon triptofan sentezini yapan beş yapısal geni şifreler. Beş enzimin kodlamasında kullanılan transkript, bir tane promotor (P_{trp}) ve bir operon (O_{trp}) bölgesi kullanılarak sentezlenir. Operon, *trp* promotor ve *trp* operatör yerlerine bağlı olarak sentezlenen 7 kb transkripti yapan tek transkripsiyon ünitesini şifreler. Triptofan için değişen gereksinime bakterilerin hızla yanıt vermelerini sağlayan bu transkripsiyon tarzının RNA ürünü çok kararsızdır.



(a) Triptofan operonun kontrolünde yer alan bileşenler. (b) Triptofan yokken baskılayıcı protein aktivite kazanamaz ve transkripsiyon başlar. (c) Triptofan varken baskılayıcı proteine triptofan bağlanarak operon bölgesine bu kompleks bağlanarak transkripsiyon engellenir. Trp operon gen ürünü olan *trp* baskılayıcı, özellikle *trp* operonun operatör bölgesi ile etkileşime girer. Trp baskılayıcısı bağlanma bölgesini oluşturan simetrik operatör sekansı, -21 ve +3 bazları arasında *trp* promotor sekansı ile örtüşür. Öz

bağlanma bölgesi 18 bp'lik bir palindromdur. TRP baskılayıcısına triptofan bağlanır ve sadece triptofan ile kompleks yaptığından operatöre bağlanabilir. Ortamda triptofan yoksa represör proteine bağlanıp konformasyonu değiştirecek triptofan olmadığından operatör bölgeye bağlanamaz. Represör proteinin operatör bölgeye bağlanamamasından dolayı yapısal genler şifrelenerek sonuçta triptofan sentezinden sorumlu 5 enzim sentezlenmiş olur. Ökaryotlarda ise durum prokaryotlardan tamamen farklıdır. Ökaryotlar organel yapılarını barındırdıklarından transkripsiyon ve translasyon hücrenin farklı bölgelerinde olur. Ama bu iki olay aynı zamanda olmaz. Ancak prokaryotlarda organel olmadığından transkripsiyon ve translasyon aynı yerde ve eş zamanlı gerçekleşir. Genlerin düzenlenmesinde prokaryotlar ile ökaryotlar arasındaki en önemli özelliklerden birisi de ökaryotlar ekzonlarla birlikte intronları da içermeleridir (Klug *et al.* 2002; Turner *et al.* 2004; Lewin 2004).

1.2. Gen Ekspresyon Analizi

Çok hücreli bir canlıda bulunan bütün hücreler aynı genetik metaryeli içerir. Ancak bütün hücrelerin ve o canlı için yaşamın değişik evrelerinde ihtiyaçları farklı olduğundan içerdikleri genetik bilginin sadece kendi durumlarına uygun olan kısmını kullanırlar. Yani karaciğerde piruvattan glukoz sentezlenirken, beyin ve kaslarda bu üretilen glukoz kullanılır. Başka bir örnek ise yetişme çağında olan bir çocukta büyüme ile ilgili genler kendi mRNA'ları ile proteinlerin sentezlenmesini sağlarken yetişkin bir canlıda bu genler baskılanmaktadır (Lodish *et al.* 2001; Klug *et al.* 2002; Lehninger *et al.* 2005; Keha *et al.* 2005).

Gen ekspresyonu; Northern analizi, Rnaz koruma ölçümleri, gen arrayleri, RNA *in situ* hibridizasyonu, DNA ile yapılan southern blot ile protein seviyesinde yapılan Western blot ve immunohistokimya gibi metodları ihtiva eden çok çeşitli tekniklerle incelenebilir. Bir genin ne zaman, nerede ve ne kadar ekspresyona uğraması; transkripsiyonal ve translasyonel regülasyona, mRNA ile protein transferine ve gen ürünlerinin yarılanma ömürlerine bağlıdır. Geniş bir genom skalası üzerinde ekspresyon haritalarını belirlemek için teknolojiler geliştirmek için çok gayretler sarfedilmektedir.

En yaygın bir teknolojik metot mikroarraylerdir; bu metotta DNA'ları temsil eden binlerce genler inert bir yüzey üzerinde noktalar halinde dizilirler (Klug *et al.* 2002; Turner *et al.* 2004; Lewin 2004).

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 probları ile muamele edilir. Doku içerisindeki mevcut sens mRNA, prob ile hibridizasyona uğrar; daha sonra otoradyografi veya immunohistokimya gibi belirleme reaksiyonları ile transkriptin doku ve sellüler lokalizasyonu ortaya çıkarılır. RNA *in situ* hibridizasyonu için çalışılacak dokunun veya canlının büyüklüğü çok önemlidir. Bunun için eğer kullanılacak örnek büyük ise parçalanarak veya kesilerek incelenebilir. Ayrıca incelenecek canlı içinde her bir embriyonik evrede veya dokularda da çalışılabilir. Buradaki amaç araştırma ne üzerine yapılacaksa ona göre kullanılacak kesitler ayarlanır. Örneğin, genelde fare embriyosu veya farenin belirli kısımlarından (fare beyni veya böbrek gibi) RNA *in situ* hibridizasyon yapılabilir (Klug *et al.* 2002; Turner *et al.* 2004; Lewin 2004).

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 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 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 (Klug *et al.* 2002; Turner *et al.* 2004; Lewin 2004).

Proteinlerden çok transkriptlere odaklanmamız gereken kayda değer pratik sebepler vardır. Antikor oluşturmak hem zaman israfı hem de pahalıdır. İdeal olarak doğru posttranslasyonel modifikasyonlu olan protein, immunizasyon için kullanılmak zorundadır ve ayrıca hayvanlar antiserum üretimi için gereklidir. Bununla birlikte antikorlar içerisinde sadece bir fraksiyon, immunohistokimyasal lokalizasyon prosedürü için uygundur. Antikorum bu teknik zorluklarına karşılık, RNA problemlerinin kullanımı çok kolaydır. Kısmi gen sekansı bilindiğinde, bunlar hemen *in vitro* reaksiyonlarla basitçe ve ucuz olarak sentezlenebilir. *In situ* hibridizasyon ve proteinlerin immunolokalizasyonu birçok biyolojik alanda olağanüstü bilgiler sağlar. Örneğin normal ve mutant embriyonlarda gen ekspresyon harita analizleri, embriyonik gelişmenin bütün safhalarını ortaya çıkarmaktadır. Aynı şekilde birçok bileşen ihtiva eden düzenleyici metabolik ağın anlaşılması için, her bir komponentin ekspresyon zamanının ayrıntılı bir şekilde bilinmesi önemli bir avantaj sağlar (Albrecht *et al.* 1998; Gassen *et al.* 1999; Lodish *et al.* 2001; Klug *et al.* 2002; Lehninger *et al.* 2005; Keha *et al.* 2005).

Birçok bileşen ihtiva eden düzenleyici metabolik ağın anlaşılması için, her bir komponentin ekspresyon zamanının ayrıntılı bir şekilde bilinmesi önemli bir avantaj sağlar. Gen ekspresyon örnekleri, RNA *in situ* hibridizasyonu ile kolaylıkla belirlenebilir (Albrecht 1998). Gen ekspresyonu ile hastalıkların patogenezinin daha ileri derecede anlaşılmasına ve yeni tedavi imkânlarının geliştirilmesine çok büyük katkıları olacaktır. Örneğin Down sendromu olarak bilinen trisomi 21 ile ilgili çalışmada, kromozom 21 (insan) genlerinin tüm bilgilerinin ekspresyon ile açıklanmasında bütün veya kısmi doku parçalarında RNA *in situ* hibridizasyonu kullanılmıştır. Trisomi 21 fenotiplerinin etkilerini içeren belli dokuların ekspresyonu gözlenmiştir (buradaki dokular merkezi sinir sistemi, kalp ve ayaklardır). Down

sendromunun patojenetik mekanizması ve genetik fonksiyonunun açıklanması doğrultusunda insan kromozomunun tamamının ekspresyon atlasının çözülmesi çok önemli bir adımdır (Reymond *et al.* 2002).

1.3. Gen Klonlama

Gen klonlama günümüzde birçok proteinin elde edilmesi bu proteinlerin şifrelenmesinde kullanılan genlerin bağımsız olarak kopyalanmasında kullanılmaktadır. Bu elde edilen DNA'larda rekombinant DNA teknolojisi kullanılmaktadır. Bu teknoloji ile hormonlar, pıhtılaşma faktörleri, yiyeceklerin korunmasını sağlayan enzimler ve aşılarda üretilmektedir. Ayrıca DNA'ların sekanslanması ile de protein sekanslarının elde edilmesi, mutasyonların tanımlanması, gen tedavisi ve benzeri birçok alanda yardımcı olmaktadır. Bu teknoloji bakteri ve virüslerle yapılan çalışmalarda geliştirilen genetik tekniklerle kullanılmaktadır. Normal olarak birçok organizma proteinlerinin veya diğer bileşenlerinin incelenmesi, bu bileşenlerin az bulunmasında dolayı oldukça zordur. Ayrıca bu protein veya bileşenlerin hücre içinde sentezlenmesinde kullanılan genlerden bir veya iki kopya bulunmasından dolayı klonlama günümüzde kullanılan önemli bir tekniktir (Klug *et al.* 2002; Turner *et al.* 2004; Lewin 2004).

Klonlama; spesifik bir genin veya ilgilenilen bir sekansı bulduran genoma ait bir fragmentin, uygun koşullarda kendiliğinden replike olabilen, vektörlere bu yabancı DNA parçalarının transfer edilmesi ile sekansın çoğaltılması işlemidir. Bu elde edilen yeni DNA'ya da rekombinat DNA denir, çünkü rekombinat DNA, doğal olarak bir arada bulunması mümkün olmayan DNA moleküllerinin birleştirilmesi ile elde edilen yeni kombinasyondur. Klonlamada dikkat edilmesi gereken belli kurallar ve yapılar vardır. Bular sıra ile aşağıdaki gibi açıklanabilir. Klonlanacak DNA'nın elde edilmesi, birçok metodla DNA izole edilmektedir. Bu metodlardan başlıcası cDNA'dan veya genomik DNA dan PCR yolu ile istenilen parçayı elde edilmesidir. Elde edilen bu DNA enzimlerle reaksiyona bırakılarak istenilen fragmentler elde edilir (Klug *et al.* 2002; Turner *et al.* 2004; Lewin 2004).

Enzimler; klonlamada birçok enzim türü kullanılmaktadır. Bu enzimleri belli görevlere ayrılmaktadırlar. Bunların en başında restriksiyon enzimleri gelmektedir. Yabancı DNA fragmentlerinin bir plazmid vektör içine transferinde dsDNA'nın (çift zincirli DNA) kesilmesi bu enzimlerle olur ve bunlar elimizde bulunan DNA dizilimini belli yerlerden yapışkan uçlu veya küt uçlu olarak keserler. Bu kesme işlemini fosfo diester bağları üzerinde yaparlar. Genelde bakterilerden izole edilen restriksiyon enzimleri DNA moleküllerini özgül dizilimlerinden tanıyıp keserler. Restriksiyon enzimi denilmesinin sebebi bakteriye giren yabancı DNA'ları parçalayarak enfeksiyonları önlemeleri veya azaltmalarından dolayı bu ismi almışlardır. İkinci olarak kullanılan enzimler ise polimerazlardır; bunlar ise istenilen DNA dizilimine yeni nükleotidler ekleyerek polimerleşmeyi yaparlar. Üçüncü grup ise ligazlardır. Bu enzim grubu ise lineer halde bulunan dizilimde bulunan fosfat ve OH gruplarını fosfo diester bağı ile bağlar; bu enzimlerin dışında nükleazlar ile uç değiştiricilerde vardır (Klug *et al.* 2002; Turner *et al.* 2004; Lewin 2004).

Vektörler; öncelikle vektörler klonlanacak DNA parçaların taşıyıcılarıdır. Elde edilen DNA'nın restriksiyon enzimleri ile kesilmesiyle direkt bakteriye transfer edilemezler. Bunun için bu DNA'nın bir vektör ile birleştirildikten sonra hücreye transfer edilebilir. Ama bir DNA molekülünün vektör olarak işlev yapabilmesi için kendisini ve taşıdığı DNA molekülünü bağımsız olarak çoğalta bilmelidir. Vektör üzerinde restriksiyon enzimlerinin tek bir noktadan kestiği birçok enzim olmalıdır. Kolaylıkla izole edilebilir olmalıdır. Belli markırlara karşı ayırt edebilme yeteneğine sahip olmalıdır. Genelde konak hücresi olarak da E.coli kullanılmaktadır. Burada DNA fragmenti ilk olarak sentezlenip analizi yapılır. Ancak mayalar ile de büyük fragmentler çalışılabilmektedir. Klonlamada kullanılan üç çeşit vektör vardır. İlk başta gelen plazmid vektörleridir. Plazmidler ekstrakromozomal ve halkasaldırlar. Plazmitlerle küçük DNA fragmentleri klonlanabilmektedir. Plazmid vektörleri bir tane antibiyotiğe dirençlilik sağlayan gen içermelidirler ve replikasyonun başladığı yer olan orijin bölgesini ile beraber klonlama bölgesini de içermelidir. Bu klonlama bölgesi restriksiyon endonükleazlarca kesilen bölgeleri içerirler. Mini preparasyon ile plazmidler saflaştırılabilir. İkinci olarak bakteriyofajlar gelir. Bakteriyofaj ile E.coli'nin enfeksiyona ve sonradan dizisi

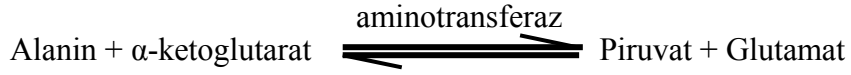
klonlanan DNA fragmentlerini çoğaltmak için kullanılabilir. Doğrusal 48.5 kb bir genomunun önemsiz kısımları 23 kb kadar yabancı DNA ile yer değiştirilebilir; lineer virüs DNA'larıdır ve çoğalmaları sonunda plaklar oluştururlar. Uçlarda 12 bp oluşan yapışkan cos (yapışkan) bölgeleri içerirler. Bu bölgeler asimetrikdir. Cos uçları DNA'ya hücrede halkasal olmasına imkân tanır. Genomun merkez bölgesinin büyük bir kısmı litik (replike olabilen) infeksiyon için gerekli değildir ve farklı bir DNA fragmenti ile yer değiştirilebilir. Lamda fajları DNA çalışmalarında çok sıklıkla kullanılmaktadırlar ve tümü tanımlanmış, tüm genom haritası çıkarılmış ve nükleotid dizisi belirtilmiştir. Lamda yer değiştirme vektörünü klonlama yapmak için faj DNA'sı, restriksiyon enzimi ile üç parçaya bölünür. Ardına klonlamak istenilen yabancı DNA ile birleştirilip, ligasyon yapıldıktan sonra oluşan rekombinant DNA bakteriye transfer edilir. Son olarakta kozmitler, YAC (maya yapay kromozom)'lar ve BAC (bakteriyel yapay kromozom)'lar vektörleridir. Bu vektörlerden kozmitler 30.45 kb, YAC'lar 1mb ve BAC'lar ise 350 kb kadarlık bir fragmenti içlerine alabilirler. Kozmitler E.coli hücrelerinin infeksiyonundan sonra plazmitler gibi replike ve sirkülerize olan, 1 cos bölgeleri ile bağlanmış büyük DNA fragmentlerini paketlemek için 1 paketleme sistemi kullanılır. Bazı kozmid vektörler iki tane cos bölgesine sahiptir (Klug *et al.* 2002; Turner *et al.* 2004; Lewin 2004).

1.4. Glutamat metabolizması

Glutamik asit doğada en çok bulunan amino asitlerdendir. İnsan ve farede esansiyel değildir. Bu amino asit karboksil grubu, amino grubu hidrojene ilaveten R grubu olarak fizyolojik pH'da negatif yüklü bir grup (COO⁻) ihtiva eder. Bundan dolayı da asidiktir ve fizyolojik pH'da amino asitler negatif yüklü olduklarından asit isimleri yerine anyon isimleri ile anılırlar. Glutamatın R grubu olan karboksil üzerinden amid türevleri ise yüksüz olup, NH₄⁺ iyonunun taşınmasında rol alır. Glutamin sentaz enzimi ile glutamat glutamine dönüşür. Vücutta sentezlenen amino asitlerin hepsi glikoliz yolu, sitrat döngüsü ve pentoz fosfat yolundaki ara ürünlerden sentezlenirler; azot bu yollara glutamat veya glutamin vasıtasıyla girer. Glutamat, α-ketoglutarat ve amonyaktan glutamat dehidrogenaz enzimi ile veya α-ketoglutarat ve bir başka amino asitten

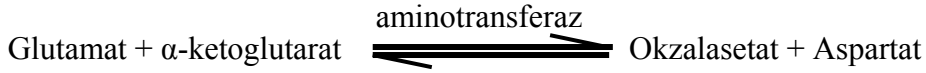
aminotransferaz (transaminaz) enzimi ile sentezlenir. Glutamat canlılarda birçok farklı metabolizma içinde yer almaktadır (Lodish *et al.* 2001, Klug *et al.* 2002, Lehninger *et al.* 2005, Keha *et al.* 2005).

Amino asitlerin transaminasyon reaksiyonu; bir amino asidin amino grubunun bir keto aside taşınması olayıdır. Transaminasyon reaksiyonlarının çoğunda reaksiyona giren substrat çiftlerindeki substratlardan biri α -ketoglutarattır ki bu; reaksiyon sonunda glutamata dönüşür. Transaminasyon reaksiyonları; prostetik grubu piridoksal fosfat (PLP) olan transaminazlar (aminotransferazlar) tarafından katalizlenirler. Bir transaminasyon reaksiyonunu katalizleyen transaminaz; substrat çifti olarak belirlenmiş amino asit ve α -ketoasit için spesifiktir ki glutamattan amino grubunun pirüvata transferiyle alanin oluşmasını katalizleyen alanin aminotransferaz önemli bir transaminazdır. Transaminasyon reaksiyonları reversibildir; denge sabiti 1'dir; reaksiyon hızı enzim ve substrat konsantrasyonuna bağlıdır.



Alanin transaminaz (Alt), (glutamate piruvat transaminaz (Gpt)) vb enzimler tarafından katalizlenen reaksiyon sonucunda oluşan ürünlerden glutamat, deaminasyon reaksiyonu için bir glutamat havuzunda toplanır. Amino asitlerin deaminasyon reaksiyonu, amino asitlerdeki amino grubunun amonyak şeklinde ayrılması olayıdır. Amino asitlerin deaminasyonu, oksidatif veya oksidatif olmayan şekillerde olabilir. Glutamatın oksidatif deaminasyonu, karaciğer hücreleri ve bütün doku hücrelerinde mitokondriyal bir enzim olan ve koenzim olarak NAD^+ veya NADP^+ gerektiren glutamat dehidrogenaz tarafından katalizlenir; reaksiyon sonunda amonyak açığa çıkarken α -ketoglutarat oluşur. Glutamat dehidrogenaz, kompleks ve allosterik bir enzimdir; ATP, GTP ve NADH tarafından inhibe edilir; ADP tarafından aktive edilir (Lodish *et al.* 2001; Klug *et al.* 2002; Lehninger *et al.* 2005; Keha *et al.* 2005).

Diğer bir amino transferaz amino asitlerin amino grubunun uzaklaştırılmasında görev alan Aspartat aminotransferaz (Ast) diğer adı ile glutamat-okzalasetat transaminaz (Got) enzimidir aşağıdaki gibi reaksiyonu katalizler,



Bu reaksiyonun katalizlediği reaksiyon diğer aminotransferazlardan farklı olarak glutamat oluşumu yönünde değil de aspartat oluşumu yönündedir. Bu enzimin katalizörlüğünde amino asit katabolizması sırasında amino gruplarını glutamattan okzalasetata transfer eder ve oluşan aspartat bir azot kaynağı olarak üre döngüsüne girer (Lodish *et al.* 2001; Klug *et al.* 2002; Lehninger *et al.* 2005; Keha *et al.* 2005).

Glutatyon (GSH), glutamat, sistein ve glisinden oluşan bir tripeptittir. Glutatyon, bütün hücrelerde yüksek miktarlarda bulunur ve bir redoks tampon türü olarak düşünülebilir. Glutatyon, gerek prokaryot gerekse ökaryot hücrelerde, hücre içi serbest sülfhidril gruplarının büyük bir bölümünü oluşturan ve en önemli (protein yapısında olmayan) tiyoldür. Okside ve redükte olmak üzere iki formda bulunur. Glutatyon, hücrede ATP gerektiren iki ardışık reaksiyon ile sentezlenir. Bu reaksiyonları (γ -glutamil sistein sentetaz (γ -GSS) ve glutatyon sentaz (GS)) enzimleri katalizler. İndirgenmiş glutatyon enzimatik ya da enzimatik olmayan yollarla okside glutatyona (GSSG) dönüşür. Glutatyon yapısında bulunan –SH grupları ile oksitleyici ajanların bozucu etkilerine karşı hücreyi korumaktadır. Dolayısıyla glutatyonun düşük konsantrasyonunda bazı metabolik olumsuzluklar meydana gelebilir. Glutatyonun belirlenen görevlerinden bazıları şunlardır: Serbest radikallerin ve reaktif oksijen ürünlerinin inaktivasyonu, hemoglobin ve sperktrin gibi membran proteinleri ve çeşitli enzim proteinlerinin tiyol gruplarının korunması, DNA ve protein sentezi, aminoasit transportu. İndirgenmiş glutatyon antioksidatif reaksiyonlarda önemli görevler yaptığı için oksidasyona sebep olan serbest radikaller ile reaktif oksijen ürünlerinin ve de metabolizmadaki rollerinin bilinmesi gerekir (Mistra *et al.* 1998; Lodish *et al.* 2001; Klug *et al.* 2002; Lehninger *et al.* 2005; Keha *et al.* 2005).

Glutatyon hayvansal dokularda amino asitlerin hücre içi taşınmasında görev alır. Burada γ -glutamat transferaz enzimi katalizörlüğünde amino asit glutatyona bağlanır ve taşıma işlemi bittikten sonra sitozolde bulunan belli enzimlerce tekrardan aktif hale getirilir.

Amino asitlerin en büyük kısmının amino grupları, en sonunda transaminasyon sonucu α -ketoglutarata taşınır ve glutamat oluşur. Sitozolde oluşan glutamat, sitozolden mitokondriye taşınır. Glutamat, mitokondride glutamat dehidrogenaz tarafından katalizlenen oksidatif deaminasyona uğrar ve böylece amonyak oluşur. Amonyak, hayvansal dokular için oldukça toksiktir. Hayvanların çoğunda amonyak, ekstrahepatik dokulardan kana ve oradan da karaciğer ve böbreklere gönderilmeden önce nontoksik bileşik haline dönüştürülür. Amonyakın organlar arasında taşınması işinde glutamin önemli rol oynar. Beyin dâhil birçok dokuda amonyak, glutamin sentetaz etkisiyle glutamat ile kombine olarak glutamin oluşturur. Glutamin, nontoksik nötral bir bileşiktir; hücre membranlarından kolayca geçebilir. Glutamin, çoğu kara hayvanında kan içinde karaciğere taşınır. Glutamin, amonyağın başlıca transport şeklidir ve kanda diğer amino asitlerden daha yüksek konsantrasyonda bulunur. Glutamin, amino gruplarının taşınmasındaki rolüne ek olarak biyosentetik reaksiyonların bir grubunda bir amino grubu kaynağı olarak işlev görür. Amonyakın kaslardan karaciğere taşınması, alanin ile olur. Amino asitlerin yakıt olarak yıkıldığı kaslarda ve bazı diğer dokularda amino grupları, transaminasyon vasıtasıyla glutamatta toplanır; glutamatın amino grupları da alanin aminotransferaz (Alt, Gpt) etkisiyle kasta glikoliz sonucu oluşan pirüvata aktarılır ve alanin oluşur, alanin de kana geçerek karaciğere taşınır. Karaciğerde alaninin amino grupları alanin aminotransferaz (Alt, Gpt) etkisiyle α -ketoglutarata taşınır ve glutamat oluşurken alanin de tekrar pirüvata dönüşür. Karaciğerde pirüvat glukoza dönüşür, glukoz kan içinde kasa taşınır, kasta glukoz pirüvata dönüşür, pirüvat da alanine dönüşür ve böylece glukoz-alanin döngüsü olarak tanımlanan döngü tamamlanmış olur. Glutamat farede bu reaksiyonlarla birlikte süksinat sentezinde, NAD^+ ve guanin monofosfat sentezi gibi farklı reaksiyonlarda da kullanılmaktadır (Lodish *et al.* 2001; Klug *et al.* 2002; Lehninger *et al.* 2005; Keha *et al.* 2005).

Glutamat beyindeki tüm sinapsların yaklaşık %40'ında bulunur ve asıl uyarıcı (eksitatör) nörotransmitterdir. Kan beyin engelini geçemez, nöronlarda hücre metabolizmasının bir parçası olarak glukozdan sentezlenir. Sinaps aralığına salıverilmesinin ardından daha çok astrositler tarafında geri alınır ve glutamine çevrilir. Glutamin aktif bir taşınma süreciyle nöronlara aktarılır. Orada glutaminaz enzimi tarafından tekrar glutamata çevrilerek keseciklerde depolanır. Glutamat sinaps sonrası nöron ve daha az olarak sinaps öncesi nöron tarafından da alınır. Bir kısmı da sinaps aralığından difüzyonla uzaklaşır (Mistra *et al.* 1998; Lodish *et al.* 2001; Klug *et al.* 2002; Lehninger *et al.* 2005; Keha *et al.* 2005).

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Hayatın gizemini arkasında genin yani DNA dizilimlerinin saklı olma sebebi elbette canlılar için hayatın devamını sağlaması açısından çok önemli olan tüm proteinlerin sentezlenmesinde kalıp rolü oynamasıdır (David *et al.* 2005). Ancak hücre ölümü, hücre çoğalması, hücre farklılaşması gibi canlı için temel olayların genler tarafından sentezlenen proteinler tarafından kontrol edildiği bilinmesine rağmen bu olayların birçoğu tam olarak aydınlatılmamış olması bu alanı çok daha ilginç yapmaktadır. Geçmiş yıllarda yapılmış olan pek çok projede temel amaç hücre davranışlarının nasıl olduğudur. Bu çalışmaların yapılmasında genlerin nerede ve ne zaman ekspresyon olduklarının bilinmesi gerekir. Gen ekspresyonlarını belirlemede pek çok teknik kullanılmaktadır. Örnek verilecek olursa Chip teknolojisi, mikroarrayler veya *in situ* hibridizasyon tekniğidir. Bunlar içinde *in situ* hibridizasyon tekniği en önemlilerinden bir tanesidir. Çünkü bu teknik ile gen ekspresyonlarının hangi hücrede olduğu çok yüksek bir duyarlılıkla tespit edilmektedir (Niehrs *et al.* 1999, Friedman *et al.* 2007, Visel *et al.* 2007).

İnsan gelişiminin ve insanlarda ortaya çıkan hastalıkları incelenmesinde fare temel genetik model organizmadır (Archibald 2000). Çünkü insanda meydana gelen hemen hemen bütün metabolik olaylar farede olmaktadır. Örneğin glikoliz, TCA devri, yağ asidi parçalanması ve sentezi, kolesterol sentezi ve amino asitlerin bir kısmının sentezi gibi. Amino asitlerden glutamat da insanda olduğu gibi farede de sentezlenmektedir, yani esansiyel değildir (genome.jp). Glutamat (Glu) proteinleri oluşturan 20 aminoasitten biri olup, polar ve asidik bir aminoasittir. Fizyolojik pH'da negatif yüklü olup glukogenik bir amino asittir (Keha *et al.* 2005). Glutamat insanda olduğu gibi farede TCA devri, glutatyon sentezi, glutamin sentezi ve gama amino bütirik asit gibi farklı hücresel olaylarda fonksiyon görür. Örneğin glutamat metabolizmasında farede toplam 28 tane gen olduğu bulunmuştur. Bu genlerin hepsi aynı tip reaksiyonu değil de gruplar halinde farklı reaksiyonların sentezlenmesinde görev yapan enzimlere kalıplık yapmaktadır (genome.jp). Sırası ile bunları inceleyecek olursak.

Birinci olarak glutatyonun sentezinde görev alan enzimler hakkında yapılmış olan çalışmaları incelersek; öncelikle glutatyon (GSH), glutamat, sistein ve glisinden oluşan bir tripeptittir. Glutatyon, bütün hücrelerde yüksek miktarlarda bulunur ve bir redoks tampon türü olarak düşünülebilir. Glutatyonun sentezinde 3 tane enzim görev yapmaktadır (David *et al.* 2005; Keha *et al.* 2005). Bunlar içinde birinci basamağı glutamat sistein ligaz, düzenleyici alt birim (Gclm) ve glutamat sisteyin ligaz, katalitik alt birim (Gclc) enzimlerinden oluşan iki tane izoenzim tarafından katalizlenmektedir ve bu basamak kontrol edici basamaktır (Yang *et al.* 2002). Geriye kalan iki enzim ise glutatyon sentetaz (Gss; EC:6.3.2.3) ve glutatyon redüktaz (Gsr; EC:1.8.1.7)'dan oluşmaktadır. Bunlar ile ilgili çalışmaları incelediğimizde; Gclc ile ilgili yapılmış olan northern blot çalışmalarından birincisinde Gclc'nin 13.5 (Gunes *et al.* 1998) günlük fare embriyosunda diğer çalışmada ise 12.5 ve 16.5 (Thompson *et al.* 2000) günlük fare embriyolarında ekspresyon olduğu bulunmuştur. Glutatyon sentetaz enzimi ekspresyonu ile ilgili literatürde rastlanan tek çalışmada 14.5 günlük fare embriyosundaki ekspresyon olduğu verilmektedir (Visel *et al.* 2007). Glutatyon redüktaz enziminin katalizlediği reaksiyonun bilinen en önemli hedeflerinden biri hücre ortamındaki GSH / GSSG oranını korumaktır. Bu oran eritrosit hücrelerinde yaklaşık 500/1'dir. Bu oranın daha düşük olduğu eritrosit hücreleri hemoliz olmaktadır (Keha *et al.* 2005). Glutatyon redüktaz'ın fare retinasının gelişimi üzerine yapılan bir çalışmada ekspresyonlarına bakılmış ve sırası ile 12, 14, 16, 18 günlük fare embriyoları ile postnatal (P0/1, P2/3, P4/5, P6/7, P8/10), yetişkin ve merkezi sinir sisteminin (P6) incelemiştir. Burada çıkan sonuçlarda elde edilen veriler; Gsr'nin 12 ve 14 günlük fare embriyolarında nöronal retinal epitelyumda, 16 günlük fare embriyosunda nöronal retina'nın nükleer tabakasında ekspresyon olduğu, 18 günlük fare embriyosunda nöronal retinal nükleer tabaka ve dışında, P0/1, P2/3, P4/5'da dış nükleer tabakada, P6/7, P8/10'da iç nükleer tabaka ve retinada, yetişkinde farede iç ve dış nükleer tabakada ve merkezi sinir sisteminde ise beyin boşluğu bölgelerinde ekspresyon olduğu verilmiştir (Blackshaw *et al.* 2004).

İkinci olarak glutamat'tan glutamin sentezinde rol alan glutamat-amonyak ligaz (glutamin sentetaz) (Glul) ile glutamin hidrolizleyerek glutamat ve amonyum iyonu elde

edilmesi reaksiyonu katalizleyen glutaminaz (Gls), glutaminaz 2 (Gls2) izoenzimleridir (David *et al.* 2005; Keha *et al.* 2005). Bunlarda Gls böbrek tipi olup böbrek, ince bağırsağın çıkıntı enterosit'leri, bağışıklık sistemindeki hızlı bölünen hücrelerde aktiftir. Gls2'de sadece karaciğerde bulunmaktadır (McCauley *et al.* 1999). Glutamin sentetaz (Glul) enzimi üzerinde yapılmış olan mutant fare çalışmasında, bu enzimin eksikliğinde yani bu enzim embriyoda sentezlenmez iken embriyonik evrenin 16.5 gününe kadar canlı olarak kalabildiği ve bundan sonra canlıda amino asitler enerjide kullanıldıklarından ortaya çıkan amonyum iyonu zehirleyici etki yaparak canlının ölmesine sebep olduğu bulunmuştur. Glutamin sentetaz enzimi için yapılan imminohistokimya çalışmasında 2 aylık bazı organlar kullanılmış ve bu çalışma sonunda karaciğer, ince bağırsak, serabellum ve böbrek korteksinde ekspresyon olduğu görülmüştür (He *et al.* 2007). Yapılan başka bir çalışmada ise 12 ve 14 günlük fare embriyolarında nöronal retinal epitelyumda, 16 günlük fare embriyosunda nöronal retinal'nın nüklear tabakasında, 18 günlük fare embriyosunda nöronal retinal nüklear tabaka ve dışında ekspresyon olduğu belirtilmiştir. Postnatal evreler içinde ise P0/1, P2/3'de dış nüklear tabakada, P6/7'da retinada, yetişkinde farede retinasında ve P6'da merkezi sinir sisteminde ekspresyon olduğu görülmüştür. (Blackshaw *et al.* 2004). Ayrıca 14.5 günlük fare embriyosunda üzerindeki bir çalışmada ise nöronal retinal epitelyumda ekspresyon olduğu rapor edilmiştir (Diaz *et al.* 2003).

Üçüncü olarak transaminasyon reaksiyonlarını katalizleyen enzimleri incelersek. Birincisi, glutamate piruvat transaminaz (Gpt) [alanin transaminaz (Alt)] enzimidir. Bu enzim iki tane izoenzimi vardır. Bunlar glutamat piruvat transaminaz, çözünür form (Gpt1) ve glutamat piruvat transaminaz 2 (Gpt2)'dir. Bu enzim karaciğer tahribatı ve hastalıklarında belirlemede kullanılan bir enzimidir. Çünkü karaciğerde olan olağandışı olaylarda bu enzimin miktarı artmaktadır (Jadhao *et al.* 2004). İkinci transaminasyon reaksiyonu glutamat-okzalasetat transaminaz (Got) diğer adı ile aspartat aminotransferaz (Ast) enzimidir. Bu enzimde iki izoenzimden [glutamat-okzalasetat transaminaz 1 (Got1) ve glutamat-okzalasetat transaminaz 2 (Got2)]'den oluşur. Got1 izoenzim üzerinde yapılmış olan *in situ* hibridizasyon çalışmasında 14.5 günlük fare embriyosundaki ekspresyonu olduğu görülmüştür (Visel *et al.* 2004). Bununla beraber

bu Got1 üzerinde yapılmış olan northern blot çalışmasında ise bu genin 18 günlük fare embriyosu karaciğeri ve yeni doğmuş fare beyinde ekspresyon olduğu görülmüştür (Lia *et al.* 1995). Got2'de 12, 14 ve 18 günlük fare embriyolarında retinasında ekspresyon olmamıştır. 16 günlük fare embriyosunda nöronal retina'nın nükleer tabakasında, P0/1 dış nükleer tabaka ve retinada, P2/3 ve P4/5 için ise dış nükleer tabaka ile iç nükleer tabakada ekspresyon olmuştur. P6/7 için iç nükleer tabaka ve retinada, yetişkinde farede iç ve dış nükleer tabakada ve postnatal 6 ait merkezi sinir sisteminde ile 16 günlük embriyonik döneminde yaygın olarak ekspresyon olmuştur (Blackshaw *et al.* 2004).

Dördüncü reaksiyon olarak glutamat dehidrogenaz (Glu1) enzimini verebiliriz. Bu enzim azot metabolizması için çok önemlidir ve bütün organizmalarda bulunarak glutamattan oksalasetat'ta oksidatif deaminasyon reaksiyonunu katalizler (Smith *et al.* 2001). Bu enzim üzerinde yapılmış olan *in situ* hibridizasyon çalışmasında 14.5 günlük fare embriyosunda ekspresyon olduğu görülmüştür (Visel *et al.* 2004).

Beşinci reaksiyon; glutamik asit dekarboksilaz 1 (Gad1), glutamik asit dekarboksilaz 2 (Gad2) izoenzimleri tarafından katalizlenen ve glutamattan 4-amino butirat oluşumunu katalizleyen reaksiyon ilk basamaktır. Bundan sonra sırası 4-amino butirat aminotransferaz (Abat) enzimi katalizörlüğünde 4-amino butirat'den süksinat semialdehit sentezlenir. Son basamakta da süksinat semialdehit, aldehit dehidrogenaz 5'ci aile, A1 altalesi (Aldh5a1) enzimi katalizörlüğünde süksinata dönüşür (genome.jp). Gad1 ve Gad2 üzerinde yapılmış birçok ekspresyon çalışması literatürde rastlanmaktadır. Bu iki izoenzim çok önemli bir nörotransmitter olan gama amino bütirik asidin sentezlenmesi reaksiyonu katalizlediklerini yukarıda belirtilmiştir. Bu enzimlerin molekül ağırlıkları bir birinden farklı olmasına karşın amino asit içerikleri de bir birine benzemektedir. İkisi de piridoksal fosfatı prostetik grup olarak kullanmaktadırlar (Katarova *et al.* 2000). Bunları incelersek Gad1 üzerinde yapılan *in situ* hibridizasyon çalışmasında, sırası ile 8.5 günlük embriyoda ekspresyon olmamıştır. Ekspresyonu 9.0 günlük fare embriyosundan itibaren başlamaktadır. 9.0, 9.5, 10.5, 11.5 ve 12.5 günlük fare embriyolarında merkezi sinir sistemi, spinal kord da ekspresyon

olmuştur. Ayrıca bunlar içinde 9 günlük fare embriyosunda kalp ve ön ayaklarda, 9.5 günlük fare embriyosunda kuyruk, cilt, rektum, kalp ve ön ayaklarda, 10.5 günlük fare embriyosunda kalp, ön ve arka ayaklar, 11.5 günlük fare embriyosunda ön ve arka ayaklar ekspresyona uğramıştır (Maddox *et al.* 2001). Bir başka *in situ* çalışmasında ise çalışmada 10.5, 11.5 ve 12.5 günlük fare embriyoları üzerinde yapılmıştır. Bu çalışmada Gad1 ve Gad2'nin değişik embriyonik dönemlerdeki ekspresyonları incelenmiştir. Bu çalışma sonunda ortaya çıkan sonuçların en başında küçük ekspresyon farklılıklarına rağmen bu iki izoenzim ekspresyon oldukları dokular bir birleri ile nerdeyse aynıdır. Bunları inceleyecek olursak; Gad 1 için 10.5 günlük fare embriyosu üzerinde yapılmış olan *in situ* hibridizasyon çalışmasında sinir sistemi, arka beyin, diensefalon'da ekspresyon olmasına karşın dorsal talamusta ve preoptik alanda ekspresyona rastlanmamıştır. Yine aynı şekilde, telenkefalon'da ekspresyon var iken neokorteks, hipokampus, rinenkefalon, amigdala, septum ekspresyon görülmemiştir. Orta beyinde ekspresyon gözlemlenirken orta beyin içinde bulunan inferior ve superior colliculus'da ekspresyon olmamıştır. 11.5 günlük fare embriyosuna ait ekspresyonları incelediğimizde telenkefalon, sinir sistemi, arka beyin, diensefalon, orta beyin, spinal kord, nazal epitelyum, olfaktori epitelyum, serebellum'da ekspresyon olmuştur. Ancak bu genel ekspresyon alanlarının detayına inerek hipotalamik anterior dorsal nükleuslarda, supraoptic-paraventricular alanda, ventral tegmental alanda da ekspresyon gözlemlenmemiştir. 12.5 günlük fare embriyosunu incelersek ön beyin, telenkefalon, korpus striatum, pons, hipotalamus, talamus, orta beyin, medula, superior colliculus, retina lens, nazal epitelyum, olfaktori epitelyum, serebellum, periferal sinir sistemi, bazı bezler'de ekspresyon olmasına karşın, inferior colliculus, anterior dorsal nükleuslarda, supraoptic-paraventricular alanda da ekspresyon olmamıştır. Gad2 ekspresyon alanlarına bakacak olursak; 10.5 günlük fare embriyosunda telenkefalon, sinir sistemi, orta beyin, arka beyin, spinal kord, diensefalon ve nazal epitelyumda ekspresyon olurken, ventral hipotalamik alan, serebellum, inferior ve superior colliculus, neokorteks, hipokampus, rinenkefalon, amigdala, septum ekspresyon olmamıştır. 11.5 günlük fare embriyosunda telenkefalon, diensefalon, orta beyin, spinal kord, olfaktori epitelyum, nazal epitelyum da ekspresyon olmuştur. 12.5 günlük fare embriyosunu incelersek ön beyin, telenkefalon, korpus striatum, pons, hipotalamus, talamus, orta beyin, medula, superior colliculus, retina lens, nazal epitelyum, olfaktori epitelyum,

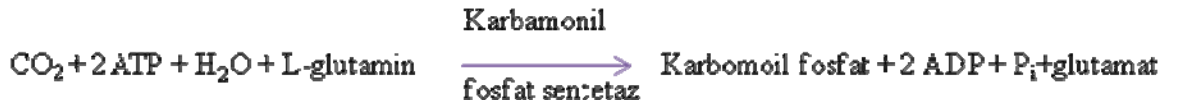
serebellum, periferel sinir sistemi, kalp, kan damarları, karaciğer, dorsal kök bezleri, mide bağırsaklar, pankreas'ta ekspresyon olmuştur. (Katarova *et al.* 2000). Yapılan bir northern blot çalışmasında Gad1 geninin 10.5, 11.5, 12.5, 13.5, 15.5, 18.5 günlük fare embriyolarına ait beyin dokuları ile postnatal 0 (P0) ve yetişkin beyinde ekspresyon olduğu görülmüştür (Szabo *et al.* 1994). Gad2 üzerine yapılmış *in situ* hibridizasyon çalışmalarında inceleyecek olursak; Gad2'nin ön beyin ve hippocampusta ekspresyon olduğu rapor edilmektedir (Aguado *et al.* 2003). 14.5 günlük fare embriyosun üzerinde yapılmış olan çalışmalarda ise 2 farklı prob kullanılmıştır. Bunların sonucunda Gad2'nin merkezi sinir sisteminde, karaciğerde, kalp ve birçok dokuda ekspresyon olduğu bulunmuştur (Visel *et al.* 2004, Visel *et al.* 2007). 4-amino butirat aminotransferaz (Abat) enzimi katalizlediği reaksiyon açısından çok önemlidir. Abat genin kalıplık yaptığı enzim bir homopolipeptit olup 4-amino butirat'tı süksinat semi aldehite dönüşüm reaksiyonunu katalizler ve bu reaksiyon çift yönlüdür (genome.jp). Son olarak Aldh5a1 enzimi incelersek; bu enzim süksinatan süksinat semialdehit oluşumu ve tersi reaksiyonu katalizleyerek önemli bir nörotransmitter olan 4-amino butirat'tın sağlanmasında rol oynamaktadır. Bu enzimin eksikliğinde 4-amino butirat sentezinde sorunlara neden olacağından sinir sisteminin normal çalışmamasına neden olacaktır (Gupta *et al.* 2003; Sauer *et al.* 2007).

Altıncı olarak glutamattan L- glutamil tRNA sentezini katalizleyen enzimler iki tanedir bunlar, glutamil-pirolin-tRNA sentetaz (Eprs) ve glutamil-pirolin-tRNA sentetaz 2 (Ears2). Yedinci olarak aldehit dehidrogenaz 4'cü aile, A1 üyesi (Aldh4a1) enzimini sentezleyen Aldh4a1 genini incelersek, bu enzim L-1 pirolin – 5 karbolsilazın sentezini katalizlemektedir. Sekizinci olarak glutamil-tRNA sentetaz (Qars) enzimini sentezleyen geni incelendiğinde bu enzim L-glutamil tRNAGln sentezini L-glutaminden gerçekleştirir. Dokuzuncu reaksiyon glutamat metabolizması için glutamindeki amino grubunu ksantin 5'-fosfatta aktararak guanin monofosfat oluşumunu katalizleyen guanin monofosfat sentetaz (Gmps)'dir. Onuncu reaksiyon olarakda glutaminde bulunan amino grubunu deamino- NAD⁺ üzerine aktararak NAD⁺ oluşumunu katalizleyen NAD sentetaz 1 (Nadsyn1)'dir. Onbirinci reaksiyon 5-fosfo-beta-D-ribozilamin ve L-glutamattan L-glutamil amin ve 5-fosfo-alfa-D-riboz 1 di fosfatatın sentezi veya tersi

yöndeki reaksiyonu katalizleyen fosfo ribozil pirofosfat amidotransferaz (Ppat)'dır. Bu genler hakkında her hangi bir ekspresyon çalışmasına rastlanmamıştır (genome.jp).

On ikinci reaksiyon olarak, karbomoil fosfat sentezini katalizleyen iki enzim genini inceleyeceğiz. Bunlardan birincisi karbomoil fosfat sentetaz 1(Cps1) genidir. Bu gen tarafından kodlanan enzim mitokondride bulunur ve üre devrinde amonyak, karbondioksit, su ve ATP kullanılarak karbomoil fosfat sentezi oluşumunu katalizler. Bu gen ile ilgili yapılmış olan çalışmalarda ortaya çıkan sonuçları incelersek; 15 günlük farenin karaciğerinde ekspresyon olmaya başladığı ve doğum sonrası 2 haftalık olana kadar bu ekspresyondaki gelişme devam ettiği rapor edilmiştir. Buradaki amaç ortamda oluşan toksik amoyumu iyonunu uzaklaştırmaktır (Shiojiri *et al.* 1998). Karbomoil fosfat sentezini katalizleyen ikinci enzim geni de ise karbomoil fosfat sentetaz 2 (Cad)'dir. Bu gende pirimidin halkası sentezinde görev yapan ilk üç enzimin kodlanmasını sağlar. Sırası ile karbomoil fosfat sentezini katalizleyen karbomoil fosfat sentetaz aktivitesi, ikinci olarak karbomoil fosfatı kullanarak karbomoilaspartat sentezini katalizleyen aspartat transkarbamoilaz aktivitesi ve son olarak da karbomoilaspartat kullanarak dihidroorotatin sentezlenmesi katalizleyen dihidroorotaz aktivitesi bulundurur. Bunlar sitozolde bulunurlar. Cad yaptığı üç reaksiyon sırası ile aşağıdaki tablodanda görülebilir (genome.jp).

1



2



3



Ancak bu gen ile ilgili de herhangi bir ekspresyon çalışmasına literatürde rastlanmamıştır.

Son reaksiyon ise L-glutaminden N-asetil D-glukozamin sentezlenmesinde glutamin fruktoz-6-fosfat transaminaz 1 (Gfpt1), glukozamin-fosfat N-asetiltransferaz (Gnpat1) ve N-asetilglukozamin kinaz (Nagk) genleri kalıplık yaptığı enzimlerine tarafından yapılmaktadır. Bu genleri incelediğimizde; Gfpt1 bu reaksiyonu hekzoamin sentezin yolunun ilk ve kontrol basamağıdır. Bu genin kalıplık yaptığı enzim glutamin ve fruktoz 6 fosfatı kullanarak glukozamin 6 fosfat'a ve glutamine dönüştürür. Bu gen fare arka ayak kaslarında kuvvetli, kalp, beyin, karaciğer, akciğer, bağırsaklar, dalak ve yağ dokularında zayıf ekspresyon olduğu northern blot analizi ile belirlenmiştir (Dehaven *et al.* 2001). Bu yolu ikinci reaksiyonu katalizleyen Gnpat1 glukozamin 6 fosfat'ın asetil CoA kullanarak N-asetil D-glukozamin 6 fosfata dönüşüm reaksiyonu katalizlemektedir. Bu gen üzerinde yapılmış olan *in situ* hibridizaysonda bu genin 12.5 günlük fare embriyosunda yaygın, 14.5 günlükte bölgesel olarak, 16.5 günlük fare embriyosunda sadece kemiklerde, yeni doğmuş fare embriyosunda ön ayaklarda ancak ayak kasları hariç ekspresyon olduğu görülmüştür (Boehmelt *et al.* 2000). Nagk tarafından katalizlenen ve N-asetil D-glukozamin 6 fosfat'ı N-asetil D-glukozamin'ne veya tersi yönde olan reaksiyonu ele alırsak, bu gen üzerinde yapılmış olan northern blot çalışmasında yetişkin fare beyni, dalak ve iskelet kasında zayıf olarak; böbrek, kalp, karaciğer, akciğer ve testisler kuvvetli bir şekilde ekspresyon olmuştur. Bu çalışma içinde incelenen fareye ait embriyonik evrelerden 7 günlükte çok kuvvetli, diğer bakılan üç evrede (11.0, 15.0, 17.0 günlüklerde) zayıf olarak ekspresyon oldukları gözlemlenmiştir (Hinderlich *et al.* 2000).

Metabolik yollar üzerinde yapılmış olan ekspresyon çalışmaları literatürde oldukça sınırlıdır. Bununla beraber fare dokuları üzerinde glutamat metabolizmasının içerdiği bazı genler üzerine ekspresyon çalışması yapılmasına rağmen sistematik olarak hepsini

içeren detaylı bir çalışma da yoktur. Birçok çalışmanın temelini oluşturan ekspresyon analizleri oldukça önemli olması açısından, farede glutamat metabolizması genleri farklı doku ve evrelerini içeren detaylı bir gen ekspresyon çalışmasının literatürde olmaması nedeni ile glutamat metabolizmasını içeren tüm genlerin farede ekspresyon çalışması 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
Dnaz I (Rnaz Free)	Roche
DNTPs	Roche
DTT, ditiyotreitol	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. (devamı)

Hidrojen peroksit (H ₂ O ₂)	Fluka
ISH Tamponu	Ambion
Iyotasetamid	Sigma
Kalsiyum klorür	Merck
Kb-Ladder	NEBiolabs
KH ₂ PO ₄	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 ₂ HPO ₄	Riedel de Haen
NaH ₂ PO ₄	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
Rnaz inhibitörü	Roche
RnazZAP	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 Terazi	: 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 4⁰C'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 tamamlandı. -20⁰C'de saklandı.
3. 2-Log DNA Ladder (0,1-10,0 kb) reaktifi: 150 µl gliserol (%100), 150 µl DEPC'lı su ve 100 µl 6x loading tamponu konup karıştırılde ve ardına 100 µl DNA ladder (1000 µg/µl) alınıp eklenerek -20⁰C'de saklandı.
4. %1'lık Agaroz Jeli: 1x TBE'den 100 ml alınır üzerine 1 g agaroz konur ve 1,5 dakika mikro dalga fırınında ısıtıldı.
5. DEPC (Dietyl pirokarbonat)'li su: 1 ml DEPC alındı 1 lt dd H₂O ilave edilip 4 saat karıştırıcıda karıştırıldıktan sonar otoklavlande 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 su (60⁰C) çözülüp pH 8 ayarlandıktan sonra 1 lt'ye tamamlandı ve otoklavlandı.
7. 10x PBS: 80 g NaCl, 2 g KCl, 14,4 g Na₂HPO₄ ve 2,4 g KH₂PO₄ alınarak dd suda 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 suda çözüldü ve pH 7,5 ayarlandı. Son hacim 1 lt'ye tamamlandıktan sonra otoklavlandı.

9. TNB (%0,5'lik bloking reaktifi): 1 x TN çözeltisinden 100 ml alınıp içine yüzdesi %0,5 olacak şekilde blocking reaktifi konur ve 1 saat 60⁰C'de karıştırıcı üzerinde karıştırıldı, daha sonra oda sıcaklığına getirildikten sonra pH 8,0 ayarlandı ve 50' mlik kısımlar halinde -20⁰C de saklandı.
10. TMN: 500 ml'si hazırlamak için 6,06 g Tris, 2,92 g NaCl ve 5,08 g MgCl₂-6H₂O alınıp elga suda çözülüp daha sonra pH 9,5 ayarlandı, stoklar halinde -20⁰C'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 suda çözülüp daha sonra pH 8,0 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 suda çözülür pH 7,0 ayarlandıktan sonra 1 lt hacme tamamlandı ve otoklavlandı.
13. Maleat Tamponu: 1 lt maleat tamponu hazırlamak için 8,765 g NaCl, 16 g maleik asit alınır 950 ml elga suda çözülür pH: 7,5 ayarlandıktan sonra 1 lt hacim tamamlandı.
14. %10'luk Tween: 100 ml %10'luk tween hazırlamak için 10 g tween tartılır üzerine 90 g otoklavlanmış dd su 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 400ml'de otoklavlanmış dd su alındı ve karıştırılarak hazırlandı.
16. %50'lik Formamid II: 1 lt bu çözeltiden hazırlamak için 50 ml 20x SSC, 500 ml formamid ve 450ml'de otoklavlanmış dd su alındı ve karıştırılarak hazırlandı.

17. 0,2 M HCl: 100 ml bu çözeltilerden hazırlamak için 1 M'lik HCl'den 20 ml alındı ve hacim otoklavlanmış dd su ile 100 ml tamamlandı.

18. %4'lük PFA: 200 ml bu tampondan hazırlamak için 180 ml otoklavlanmış dd su, 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 konur karıştırıcıda karıştırıldıktan sonra kullanılmaya kadar +4°C de saklandı.

19. 4 M'lik Amonyum Asetat: 100 ml bu çözeltilerden hazırlamak için 31,12 g amonyum asetat alındı ve 70 ml çözülüp son hacim dd su ile 100 ml tamamlanarak otoklavlandı ve -20°C'de saklandı.

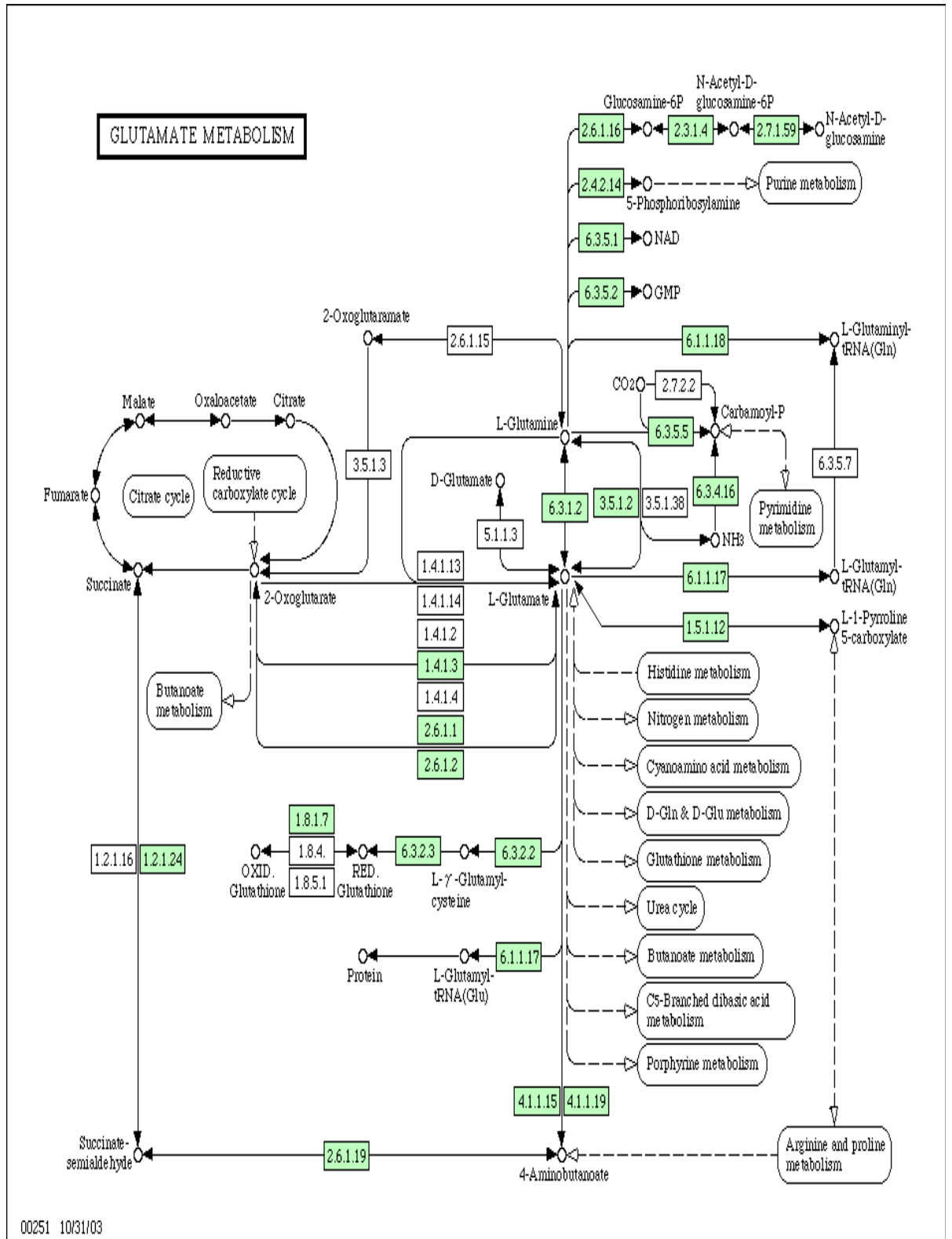
20. %4'lük Sheep serum: 250 ml bu çözeltilerden hazırlamak için 1xTNT çözeltisinden 240 ml alındı ve bu çözelti içinde 10 ml'de sheep serum alınarak karıştırıldı ve daha sonra filtreden geçirildi.

21. Renklendirme çözeltisi: 200 ml hazırlamak için önceden hazırlanmış TMN çözeltisini ilk önce filtreden geçirilip ardına çözeltinin her 1 ml'sinde 0,5 mg levamizol [(-)-tetramizol hidroklorür] olacak şekilde 100 mg bu maddeden alındı. Çözülür ve 1 ml NBT (Nitroblue tetrazolium klorid) (5µl/ml), 0,75 ml BCIP (5-bromo-4-kloro-3-indolil-fosfat,4-toluidine tuzu) (3,75µl/ml) şeklinde ilaveler yapıldıktan sonra hemen kullanıldı.

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

3.4. Glutamat Metabolizması için Gen Seçimi

Bu tez çalışması kapsamında 28 genin ekspresyon analizi fareler üzerinde yapıldı. Fare genomu içinde bulunan glutamat metabolizması 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’de verildi.



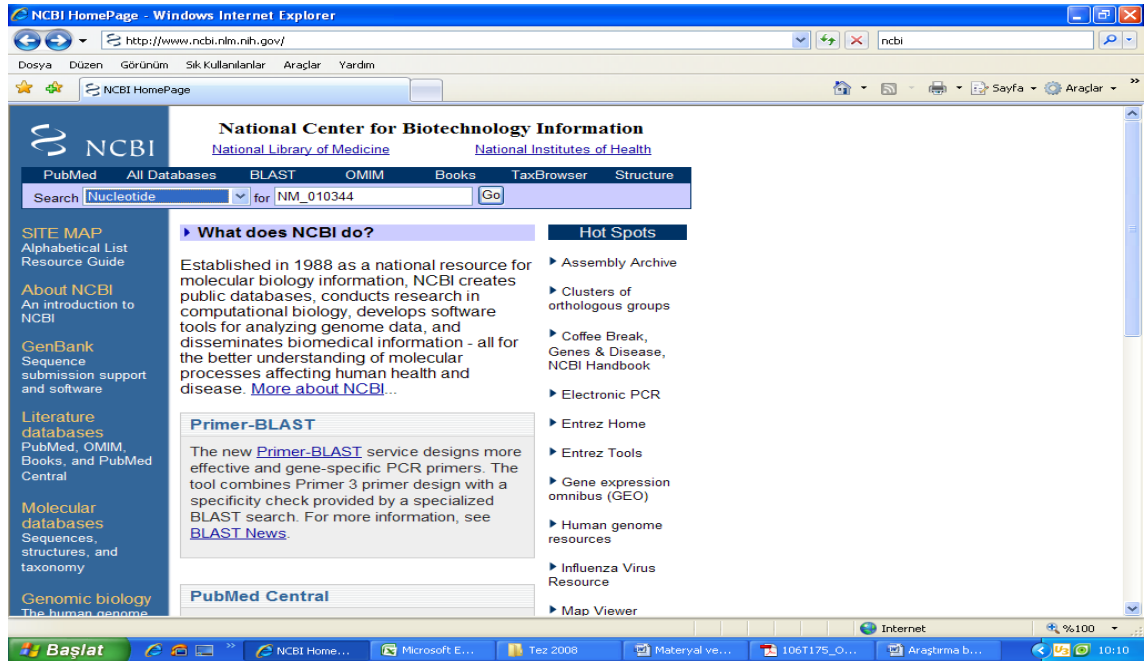
Şekil 3.1. Glutamat metabolizması ve ilişkili metabolik yollar.

3.5. Spesifik Genler İçin İnternet Kullanılarak Primer Dizaynı

Araştırılan genlerin primer dizaynı için aşağıdaki işlemler sırayla yapıldı. Burada örnek olarak glutasyon redüktaz1 geni (Gsr) 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_010344) yazıldı ve “daha sonra “go” tuşuna basıldı (Şekil 3.2). Şekil 3.3’de sorgu sonucu görülebilir. Burada aradığımız gen karşımıza çıktı. NM_010344 üzerine tıklandı ve bu genin cDNA’sına ulaşıldı (Şekil 3.4 ve 3.5). Bu sekans kopyalandı ve Mus musculus database’a karşı blastlandı.



Şekil 3.2. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> web sayfası. “Search” karşısına “Nucleotide” seçildi, “for” karşısına araştırılacak genin Accession number’ı (NM_010344) yazıldı ve “daha sonra “go” tuşuna basıldı.

Nucleotide Result - Windows Internet Explorer

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez

NCBI Nucleotide

Search Nucleotide for NM_010344

Found 1 nucleotide sequence. Nucleotide [1]

Display Summary Show 20 Sort by Send to

All: 1 Bacteria: 0 RefSeq: 1 mRNA: 1

This search in Gene shows 1 result.

Gsr (*Mus musculus*): glutathione reductase
Chromosome 8, 8 18.0 cM, NC_000074.5 (34763709..34808633)
Gene ID: 14782; Other Aliases: AI325518, D8Erd238e, Gr-1, Gr1; Other Designations:

1: [NM_010344](#) Reports Links
Mus musculus glutathione reductase (Gsr), mRNA
gi|160298212|ref|NM_010344.4|[160298212]

Recent Activity

Turn Off Clear

Q NM_010344 (1) Nucleotide

Gsr glutathione reductase [*Mus musculus*]

Q NM_010344 (1) Gene

Write to the Help Desk
NCBI | NLM | NIH
Department of Health & Human Services
Privacy Statement | Freedom of Information Act | Disclaimer

Şekil 3.3. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> web sayfasından bulunan mus musculus glutatyon redüktaz1 geni (Gsr) için sorgu sonucu.

NCBI Sequence Viewer v2.0 - Windows Internet Explorer

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucleotide&id=160298212

NCBI Sequence Viewer v2.0

Search Nucleotide for NM_010344

Display GenBank Show 5 Send to Hide: sequence all but gene, CDS and mRNA features

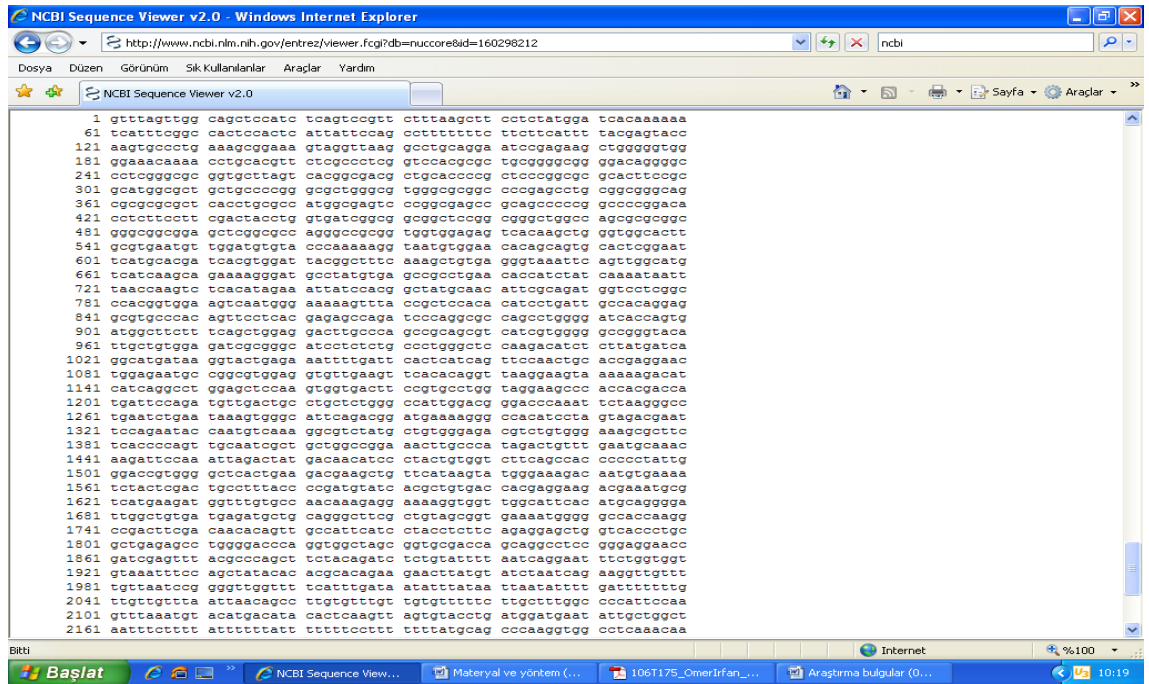
Range: from begin to end Reverse complemented strand Features: STS Exon Refresh

1: [NM_010344](#) Reports [Mus musculus glut...](#) [gi:160298212] Links

Comment Features Sequence

LOCUS NM_010344 2692 bp mRNA linear ROD 12-OCT-2008
DEFINITION Mus musculus glutathione reductase (Gsr), mRNA.
ACCESSION NM_010344
VERSION NM_010344.4 GI:160298212
KEYWORDS .
SOURCE Mus musculus (house mouse)
ORGANISM [Mus musculus](#)
Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi;
Mammalia; Eutheria; Euarchontoglires; Glires; Rodentia;
Sciurognathi; Muroidea; Muridae; Murinae; Mus.
REFERENCE 1 (bases 1 to 2692)
AUTHORS Qiao, M., Kisgati, M., Cholewa, J.M., Zhu, W., Smart, E.J.,
Sullistio, M.S. and Asmis, R.
TITLE Increased expression of glutathione reductase in macrophages
decreases atherosclerotic lesion formation in low-density
lipoprotein receptor-deficient mice
JOURNAL Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 27 (6), 1375-1382 (2007)
PUBMED 17363688
REFERENCE 2 (bases 1 to 2692)
AUTHORS Rogers, L.K., Bates, C.M., Welty, S.E. and Smith, C.V.
TITLE Diquat induces renal proximal tubule injury in glutathione...

Şekil 3.4. Mus musculus glutatyon redüktaz1 (Gsr) geninin sekansının olduğu sayfanın üst tarafı.



Şekil 3.5. Mus musculus glutatyon redüktaz1 (Gsr) geninin sekansının olduğu sayfanın alt tarafı.

3.5.2. cDNA Probu Yapılacak Gen Sekansının Blastlanması

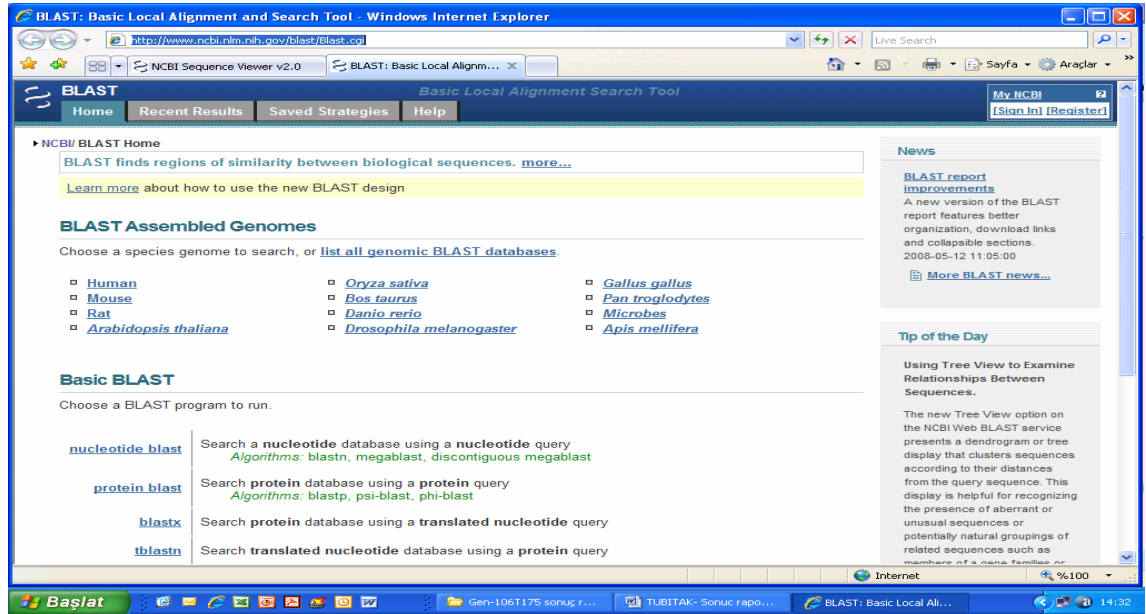
Gen sekansının blastlanmasının amacı, aranan genin diğer genlerle homolojisinin araştırılması ve diğer genlerle en az homoloji gösteren kısımdan cDNA probu üretilmesinin sağlanmasıdır. Bu yapıldığı takdirde hemen işin başında diğer birçok genin interferansı giderilmiş olur.

Blastlama için <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi> web sayfasına girildi (Şekil 3.6). “Nucleotide blast” tuşuna basıldı. Şekil 3.7’deki web sayfası açıldı. Şekil 3.5’de seçilen ilgili genin sekansı, “Enter Query Sequence” altındaki kutu içine yapıştırıldı.

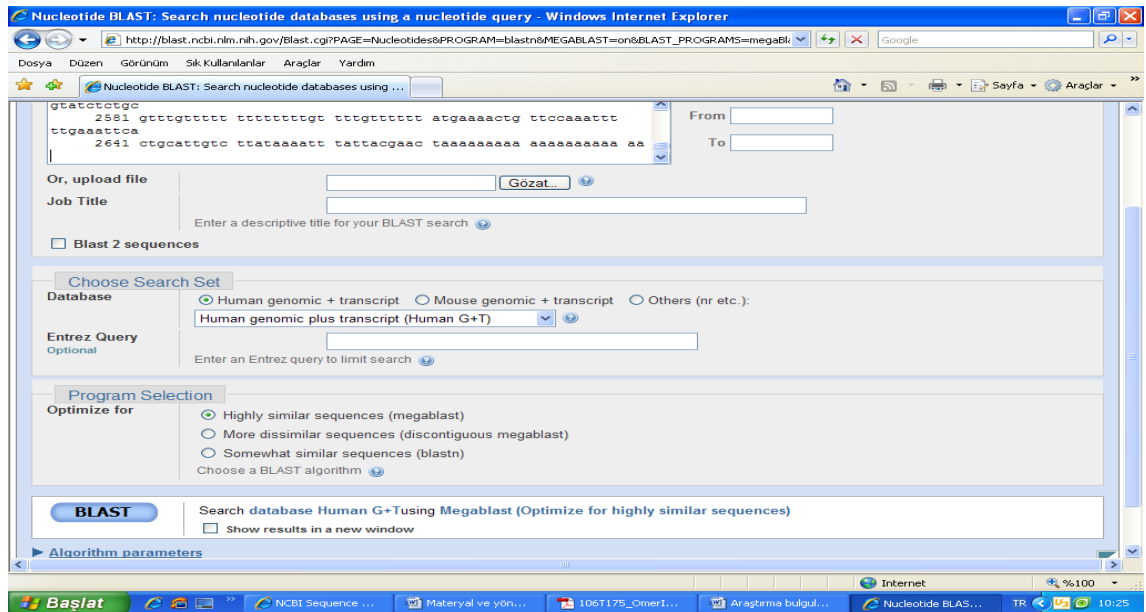
Database: Mouse genomic+ transcript

Optimize for: Highly similar sequences (megablast)

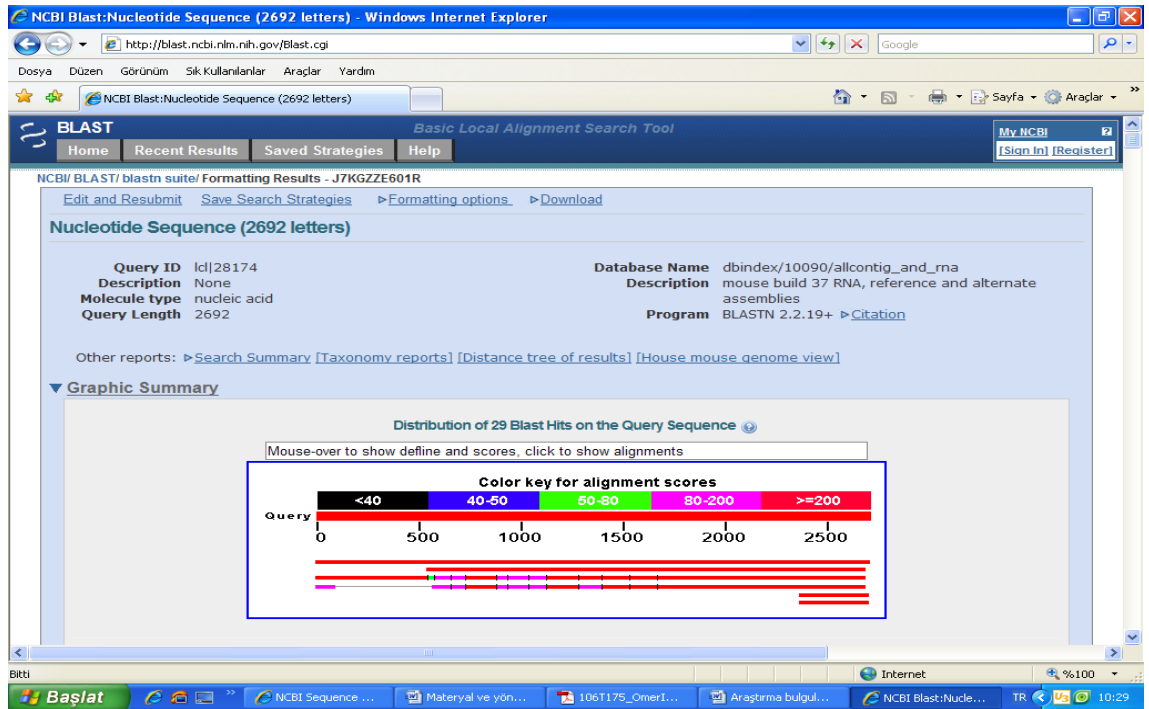
seçildi. “BLAST” tuşuna basılarak sorgu başlatıldı. Daha sonra homolojinin olup olmadığı anlaşıldı (Şekil 3.8 ve Şekil 3.9).



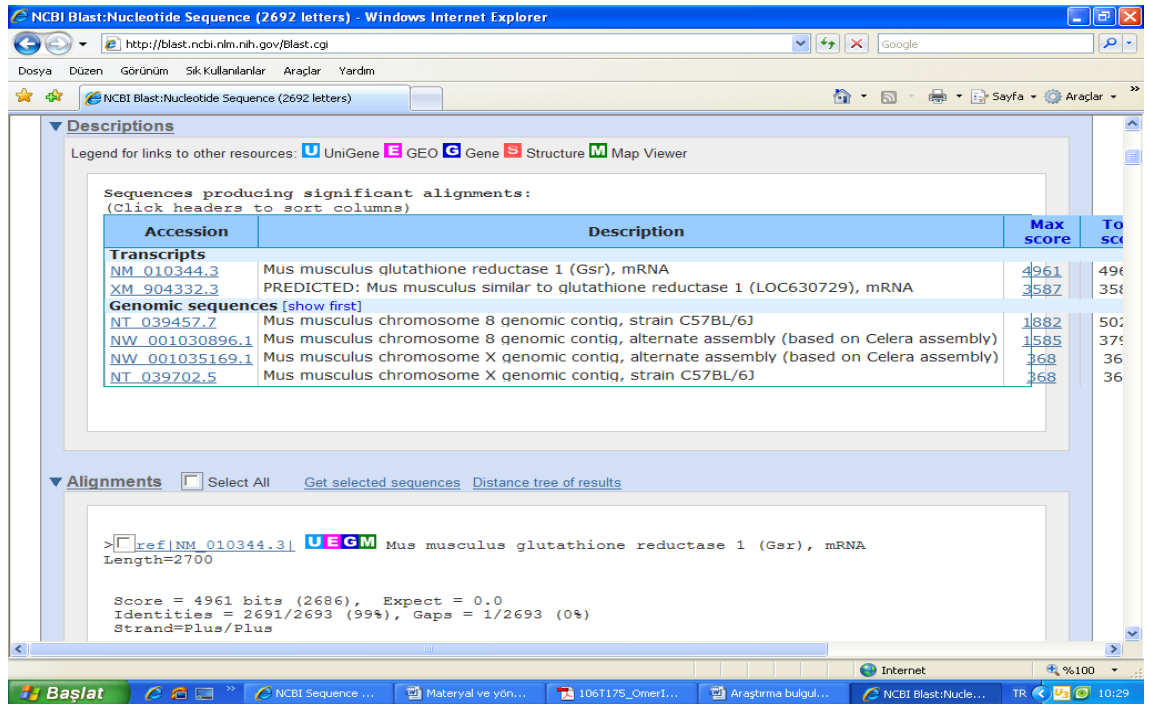
Şekil 3.6. Blastlamanın yapıldığı web sayfasının girişi. “Nucleotide blast” tuşuna basılarak işlem başlatıldı.



Şekil 3.7. Blastlamanın yapıldığı web sayfasının açılmış hali. İlgili yerler dolduruldu ve “BLAST” tuşuna basıldı.



Şekil 3.8. Mus musculus glutasyon redüktazı (Gsr) geni için yapılan blastlama sonucunun üst tarafı.



Şekil 3.9. Mus musculus glutasyon redüktazı (Gsr) geni için yapılan blastlama sonucunun alt tarafı.

Bu sonuca göre genin spesifik probunu elde etmek için gen sekansında en iyi bölge seçimi yapılmalıydı. Bunun için Şekil 3.6'e göre 0-1100 arasındaki bölgede, bu bölgenin tamamına karşılık olarak diğer genlerle homolojinin daha az bulunduğu anlaşılmaktadı. Bu yüzden bu bölge içinde spesifik cDNA probunun hazırlanması idealdir ve bu bölge seçilmiştir (Şekil 3.10). 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 ayarlanmalıydı. 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.

```

NCBI Sequence Viewer v2.0 - Windows Internet Explorer
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nuccore&id=160298212
Dosya Düzen Görünüm Sık Kullanılanlar Araçlar Yardım
NCBI Sequence Viewer v2.0
STS 2439..2665
/gene="Gsr"
/gene_synonym="Gr1"
/gene_synonym="Gr-1"
/gene_synonym="AI325518"
/gene_synonym="D8Erttd238e"
/standard_name="RH126625"
/db_xref="UniSTS:167555"
polyA_site 2672
/gene="Gsr"
/gene_synonym="Gr1"
/gene_synonym="Gr-1"
/gene_synonym="AI325518"
/gene_synonym="D8Erttd238e"
ORIGIN
1 gtttagttgg cagctccatc tcagtcocgt ctttaagctt cctctatgga tcacaaaaa
61 tcatttcggc cactccactc attattccag cctttttttc ttcttcattt tacgagtacc
121 aagtgcctcg aaagcggaaa gtaggttaag gcctgcagga atccgagaag ctgggggtgg
181 ggaacaaaaa cctgcacggt ctgcacctcg gtccaacgcg tgccggggcg ggacagggcg
241 cctcggggcg ggtgcttagt caagcggacg ctgcaacccg ctccggggcg gcacttcocg
301 gcattggcgt gctgccccgg gcgctggggc tggcgccggc ccgagccctg cggcgggca
361 cgcgcgcgct caactgcgco atggcggatc ccggcgagcc gcagcccccg gcccccga
421 cctcttcctt cgactacctg gtgatcggcg gcggtccggc cgggctggcc agcgcggcg
481 ggcgcggcga gctcggcgco agggcggcgg tggggagag tcacaagctg ggtggcactt
541 gcgtgaatgt tggatgtgta cccaaaaagg taatgtgga cacagcagtg cactcggaat
601 tcatcaagca gaaaaggat gcctatgtga gccgcctgaa caccatctat caaaataatt
661 tcaacaaagc gaaaaggat gcctatgtga gccgcctgaa caccatctat caaaataatt
721 taacaaagtc tcaatagaa attatccacg gctatgcaac atccagcagt ggtcctggcg
781 ccacggtgga agtcaatggg aaaaagttta ccgctccaca catcctgat gccacaggag
841 gcgtgccac agttcctcag gagagccaga tcccagcgcg cagcctgggg atcaccagtg
901 atgctctctt tcagctggag gacttgccca gccgcagcgt catcgtgggg gccgggtaca
961 ttgctgtgga gatcggggcg atcctctctg ccctgggctc caagacatct cttatgatca
1021 gccatgataa ggtactgaga aattttgatt cactcatcag ttccaactgc accgaggaac
1081 tggagaatcg cggcgtggag gtggtgaagt tcaacacaggt taaggaagta aaaaagacat
1141 catcaggcct gtagctccaa gtggtgactt ccgtgctcgg taggaagccc accacgacca
1201 tgattccaga tgttgactgc ctgctctggg ccattggacg ggaacccaat tctaaggccc
1261 tgaatctgaa taaagtggcg attcagcggc atgaaaaagg ccacatccta gtgacaagaat
  
```

Şekil 3.10. Mus musculus glutasyon redüktaz1 (Gsr) geni için, diğer genlerle en az homolojinin olduğu ve baz sıralamasında 0-1100 arasındaki bölgeden seçilen cDNA parçası.

3.5.3. cDNA Probu İçin Primer Dizaynı

Primer dizaynı için http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi web sayfasına girildi. Şekil 3.10'da kopyalanan gen sekansı, kaynak sekans kutusuna yapıştırıldı ve aşağıdaki bilgiler girildi (Şekil 3.11):

Sequence ID: NM_010344

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 3.12 ve Şekil 3.13). Primer seçiminde bu yöntem için, primerin A veya T ile başlaması G ve C ile sonlanması idealdir. Yine 4 veya daha fazla nükleotidin peşpeşe 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): ATCTCAGTCCGTTCTTTAAG

Right (revers) primer (20 baz): TTATCATGCCTGATCATAAG

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 uygulanır. Sonuçlar Şekil 3.14-3.15'de verildi.

b) Left ve right primerlerin başlangıç noktaları belirlendi. cDNA probu olan bu bölge seçilerek blastlandı (Şekil 3.16) ve diğer genlerle homoloji olup olmadığı belirlendi (18-1030 nolu bazlar) (Şekil 3.17).

Bu iki kontrol beraberce yapılabilir. Başka genlerle homoloji göstermediği anlaşılırsa bu primerler emniyetle kullanılabilir. Şekil 3.17'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.

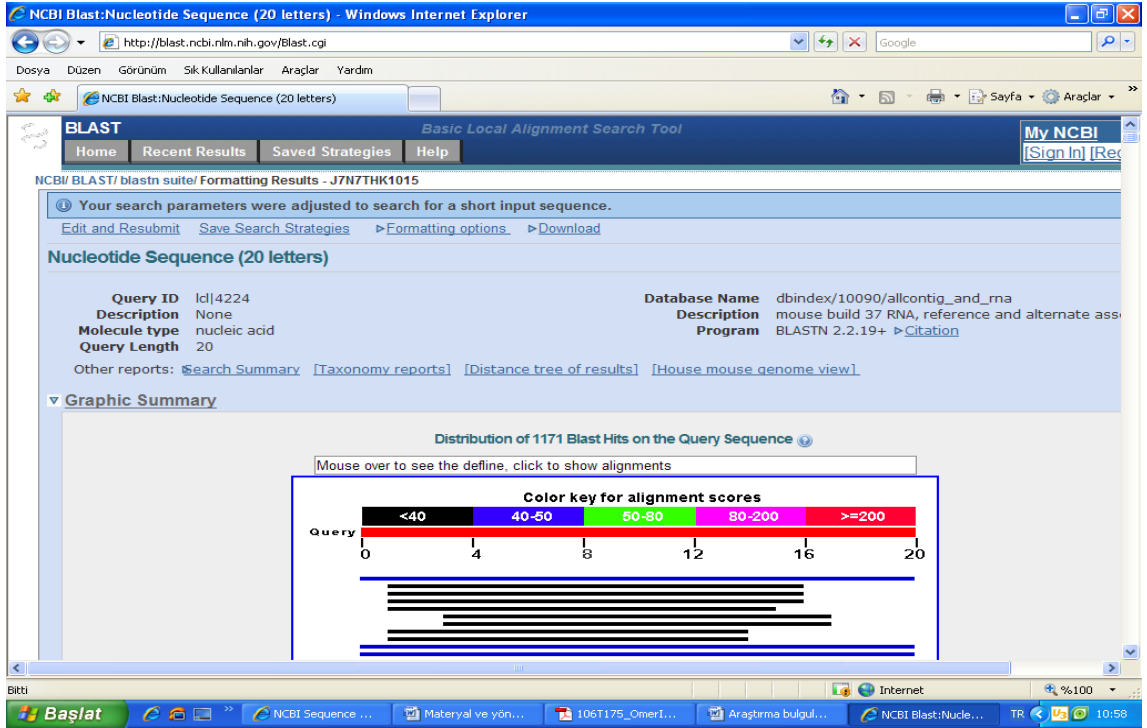
The image shows a screenshot of the Primer3 web interface in a Windows Internet Explorer browser. The browser title is "Primer3 Input 0.4.0 (primer3-web/htdocs/input-040.htm) - Windows Internet Explorer". The address bar shows the URL "http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi". The page content includes the following elements:

- Primer3 (v. 0.4.0) Pick primers from a DNA sequence.**
- Navigation links: [Primer3plus interface](#), [More primer/oligo tools](#), [Old \(0.3.0\) interface](#), [disclaimer](#), [cautions](#), [Primer3 Home](#), [FAQ/Wiki](#).
- Instructions: "Paste source sequence below (5'→3', string of ACGTNacgtn -- other letters treated as N -- numbers and blanks ignored). FASTA format ok. Please N-out undesirable sequence (vector, ALUs, LINEs, etc.) or use a [Mispriming Library \(repeat library\)](#): NONE".
- DNA sequence input field containing:

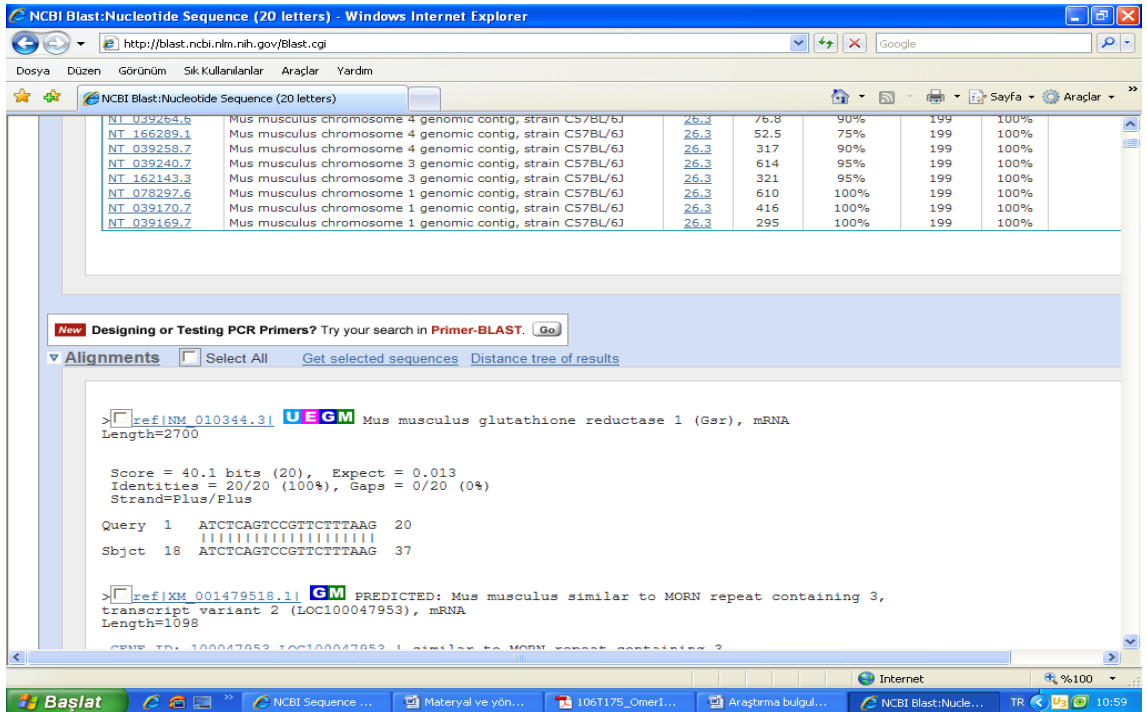

```

781 ccacggtgga agtcaatggg aaaaagttaa cagctccaca catcctgatt gccacaggag
841 gcgtgcccac agttccctcac gagagccaga tcccaggcgc cagcctgggg atcaccagtg
901 atggcttctt tcagctggag gacttgccca gccgcagcgt catcgtgggg gccgggtaca
961 ttgctgtgga gatcgccggc atcctctctg cctctggctc caagacatct cttatgatac
1021 ggcatgataa ggtactgaga aattttgatt cactcatcag ttccaaactgc acgagggaac
1081 tggagaatgc cggcgtggag
      
```
- Form fields for primer selection:
 - Pick left primer, or use left primer below:
 - Pick hybridization probe (internal oligo), or use oligo below:
 - Pick right primer, or use right primer below (5' to 3' on opposite strand):
- Buttons: [Pick Primers](#), [Reset Form](#).
- Additional options:
 - Sequence Id:** Gsr (A string to identify your output.)
 - Targets:** (E.g. 50,2 requires primers to surround the 2 bases at positions 50 and 51. Or mark the [source sequence](#) with [and]: e.g. ...ATCT[CCCC]TCAT.. means that primers must flank the central CCCC.)
 - Excluded Regions:** (E.g. 401,7 68,3 forbids selection of primers in the 7 bases starting at 401 and the 3 bases at 68. Or mark the [source sequence](#) with < and >: e.g. ...ATCT<CCCC>TCAT.. forbids primers in the central CCCC.)
 - Product Size Ranges:** 851-1000
 - Number To Return:** 5
 - Max 3' Stability:** 9.0

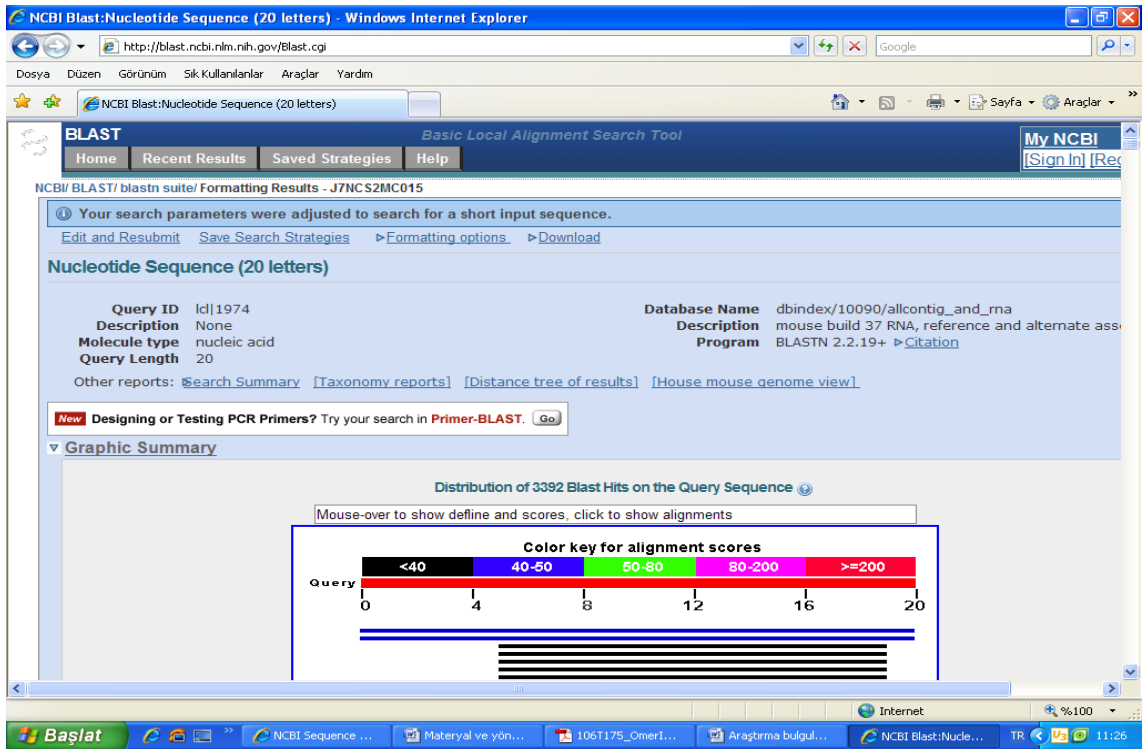
Şekil 3.11. Primer belirlemek için kullanılan site: Gen sekansı yukarıdaki kutucuğa yapıştırıldı. Genin kısa adı, istenen cDNA boyutu, primer büyüklüğü vb. bilgiler girildi.



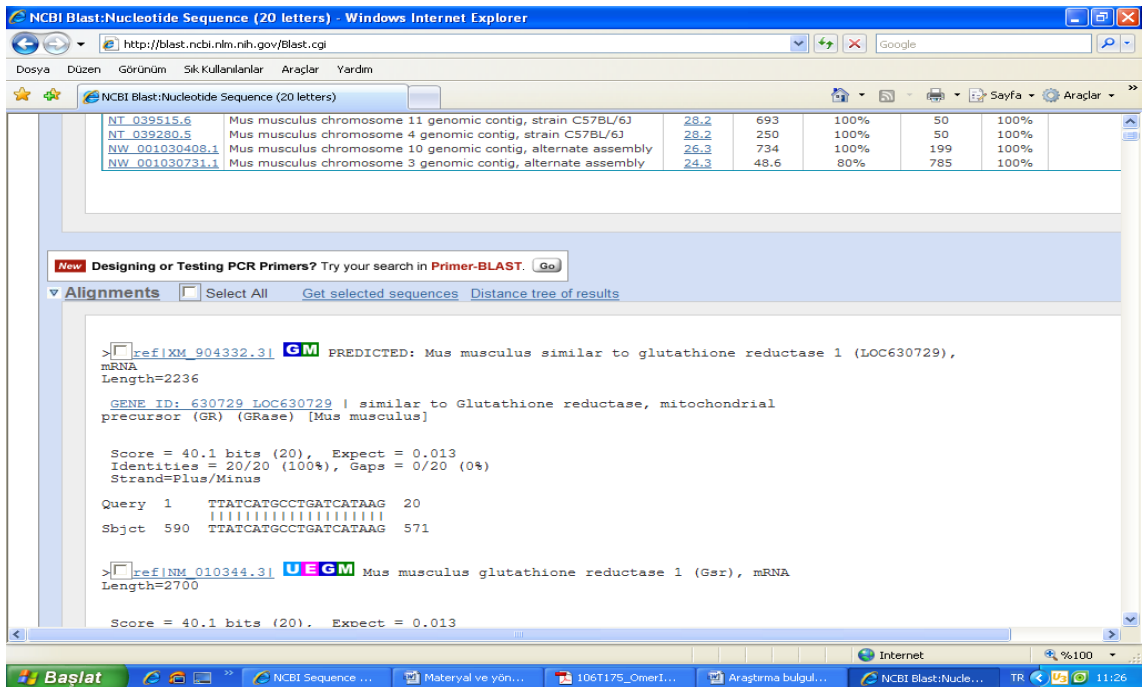
Şekil 3.14. Left (forward) primerin blastlama sonucunun üst tarafı.



Şekil 3.15. Left (forward) primerin blastlama sonucunda ortaya çıkan ve ilgili primerlerle homolojisi olan genler. Query: verilen primerin baz sırası, Sbjt: Homoloji gösteren genin ilgili bölgesi.



Şekil 3.16. Right (revers) primerin blastlama sonucunun üst tarafı.



Şekil 3.17. Right (revers) primerin blastlama sonucunda ortaya çıkan ve ilgili primerlerle homolojisi olan genler. Query: verilen primerin baz sırası, Sbjct: homoloji gösteren genin ilgili bölgesi.

NCBI Sequence Viewer v2.0 - Windows Internet Explorer

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucleotide&id=160298212

Dosya Düzen Görünüm Sık Kullanılanlar Araçlar Yardım

NCBI Sequence Viewer v2.0

```

/gene_synonym="AI325518"
/gene_synonym="D8Erttd238e"
/standard_name="RH126625"
/db_xref="UniSTS:167555"
2672
/gene="Gsr"
/gene_synonym="Gsr1"
/gene_synonym="Gsr-1"
/gene_synonym="AI325518"
/gene_synonym="D8Erttd238e"

polyA_site

ORIGIN
1 gtttagttcg cagctccatc scagtcoggt ctttaagctt cctctatgga tcacaaaaaa
61 tcattttggc cactccaactc attattcoaag cctttttttc ttbtctattt tacgagtaac
121 aagtgccctg aaagcggaaa gtaggttaag ccctcgaaga atccgagaag cttgggggtg
181 ggaaacaaaa cctgcaagtt ctcgcccctg gtcgaagcgc tgcggggcgg ggaacggggc
241 cctcggggcg ggtgcttagt caaggcagac ctcgaacccc ctcocggcgc gcacttcocg
301 gcaatggcgt gctgcccogc ggcgtggggc tggcgcggc ccgagcctg cggcggcag
361 cgcggcgtc caactcgccc atggcgagtc ccggcgagcc cagcggccc gcccgggaca
421 cctctcctt cgactacctg gtgatggcg cgggtccgg cgggtggcc agcggcggc
481 gggcggcgga gctcggcgcc agggcggcgg tgggtggag tcacaagctg ggtggcaact
541 gctggaatg tggatgtgta cccaaaaag taatgggaa cacagcagtg cactcggaa
601 tcaatcaaga tcactggat taaggctttc aaagctgga ggttaaatc agttggcatg
661 tcaatcaaga gaaaaggat gcctatgta gccgcctgaa caccatctat aaaaataatt
721 taaccaagtc tcacatagaa attatccag cctatgcaac attcgagat ggtcctcggc
781 ccacggcgga agtcaacggg aaaaagtta ccgctccca cactcggat gccacaggag
841 gctggccca agtcccaac gaaagcaga tcccaagcgc cagcggggg atccacagtg
901 atggtctct tcagctggag gaattgccca ccgcaagct catcgtggg gccgggaca
961 ttgctggga gatcggcggc atcctctctg cctcggcctc caagacatct cttatgata
1021 ggcattgaaa ggtactgaga aattttgat cactcatcag ttccaactg accgaggaac
1081 tggagaatgc cggcgtggag gtgttgaagt tcacacagat taaggaagta aaaaagacat
1141 catcagcct ggagctccaa gtgtgactt ccgtcctgg taggaagccc accacagaca
1201 tgaatccaga tgttgactgc ctgctctgg caattggac ggaacccaa tctaaaggcc
1261 tgaatccaga taaagtggc atcagaagg atgaaaagg ccacatccta gtgacgaat
1321 tcagaatac caatgtcaaa ggcgtctat ctgtgggaga cgtctgtgg aaagccttc
1381 tcaccocag tgcaatcgt gctggcggga aacttgcca tagactgtt gccctgaaac
1441 aagattccaa attagactat gacaacatcc ctactgtgt ctcagccac ccccatttg
1501 ggaccgtgg gctcactgaa gacgaagctg ttcataagta tgggaaagac aatgtgaaa

```

Internet %100

Başlat NCBI Sequence ... Materyal ve yön... 106T175_OmerI... Araştırma bulgu... NCBI Blast:Nucle... TR 11:27

Şekil 3.18. cDNA'dan üretilen DNA parçası (cDNA probe).

NCBI Blast:Nucleotide Sequence (1013 letters) - Windows Internet Explorer

http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi

Dosya Düzen Görünüm Sık Kullanılanlar Araçlar Yardım

NCBI Blast:Nucleotide Sequence (1013 letters)

Other reports: Search Summary Taxonomy reports Distance tree of results House mouse genome view

Graphic Summary

Distribution of 15 Blast Hits on the Query Sequence

Mouse over to see the define, click to show alignments

Color key for alignment scores

Query

0 200 400 600 800 1000

Legend for links to other resources: U UniGene E GEO G Gene S Structure M Map Viewer

Sequences producing significant alignments:

(Click headers to sort columns)

Accession	Description	Max score	To score
Transcripts			
NM_010344.3	Mus musculus glutathione reductase 1 (Gsr), mRNA	1871	187
XM_904332.3	PREDICTED: Mus musculus similar to glutathione reductase 1 (LOC630729), mRNA	63	86
Genomic sequences [show first]			
NT_039457.7	Mus musculus chromosome 8 genomic contig, strain C57BL/6J	977	191
NW_00102086.1	Mus musculus chromosome 8 genomic contig, alternate assembly (based on Celera assembly)	174	oo

Internet %100

Başlat NCBI Sequence ... Materyal ve yön... 106T175_OmerI... Araştırma bulgu... NCBI Blast:Nucle... TR 11:28

Şekil 3.19. cDNA probe için yapılan blastlama sonucu.

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, P7, P56) ve fare embriosundan (E12.5, E14.5, E15.5) 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, ardına 5 dakika buz içinde bekletildi.

2. Bekleme işleminin ardından 15 dakika 4⁰C'de maksimum hızda santrifüj edildi ve süpernatant atıldı ve 1 ml %75'lik etanol ile tekrardan çökelek çözüldü ve 5 dakika 4⁰C'de maksimum hızda santrifüj edildi. Süpernatant tekrardan atılarak çökelek 5 dakika vakum kurutucusunda kurutuldu. Ardına 87 µl DEPC su ile 60⁰C 10 dakika bekletilerek çözüldü.

3. Bu işlemin ardına 99 µl su ve 1 µl hazırladığımız çözeltiden aldı 260 nm'de konsantrasyonunu ölçüldü ve hesaplama aşağıdaki şekilde yapıldı.

$$U_g = OD_{260} \times 310$$

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

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

5. Hazırlanan karışım 37⁰C'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 4⁰C'de maksimum hızda santrifüj edildi. Süpernatant başka bir tüpe alıp 250 µl kloroform eklendi. Tekrardan 5 dakika 4⁰C'de maksimum hızda santrifüj edildi. Süpernatant yine başka bir tüpe aktarıldı ve 750 µl etanol ile 6,25 µl 3 M sodyum asetat eklendi. 30 dakika 4⁰C'de maksimum hızda santrifüj edildi ve süpernatant atıldı. 1ml etanol çökelek üzerine eklendi ve 5 dakika 4⁰C'de maksimum hızda 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 60⁰C'de 10 dakika bekletilerek çözüldü ve kullanılıncaya kadar -80⁰C'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 konur 65⁰C'de 5 dakika bekletildi.

Karışım 2 (Her bir cDNA stoku için).

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

Karışım 1'de hazırlanan tüp üzerine karışım 2 eklendi ve vortekslendi. Karıştırma işleminin ardından 60 dakika 50⁰C'de ve daha sonra 85⁰C 5 dakika PCR cihazı içinde inkübe edildi. İnkübasyon sonunda 1 µl RNaseH ilave edildi. PCR cihazıda 20 dakika 37⁰C'de bekletilerek reaksiyon durduruldu. Hazırlanan ürün -80⁰C'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 verildi (Krieg, 1987).

Yukarıdaki örnekte glutatyon redüktaz1 geni için primer dizilimleri aşağıdaki gibidir:

T7 promoter- Left (forward) primer (43 baz):

GCGTAATACGACTCACTATAGGG ATCTCAGTCCGTTCTTTAAG

SP6 promoter Right (revers) primer (41 baz):

GCGATTTAGGTGACACTATAG TTATCATGCCTGATCATAAG

cDNA kütüphaneleri ve her gen için spesifik primerler (T7 promoter- forward primer, SP6 promoter-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 sentezlenmediği kontrol edildi. Sırası ile yapılan işlemler aşağıda gösterilmiştir.

PCR PROGRAMI

LID 105⁰C WAIT AUTO

- 1.) PAUSE PRESS ENTER
- 2.) T=94⁰C 2 dakika
- 3.) PAUSE PRESS ENTER
- 4.) T=94⁰C 25 saniye
- 5.) T=57⁰C 25 saniye
- 6.) T=72⁰C 1.15 dakika
- 7.) GOTO 4 REP 35
- 8.) T=72⁰C 9 dakika
- 9.) HOLD 4⁰C ENTER

Reaksiyon için küçük eppendorf PCR (200µL) tüpü kullanıldı. PCR işlemi ise ilk önce PCR cihazının kapak sıcaklığı 105⁰C ayarlandı; daha sonra çalışılan reaksiyon karışımının denatürasyonu için 2 dk 95⁰C bekletildi. Bu işlemin ardından 35 kez tekrarlanacak olan reaksiyon işlemlerine geçildi. Burada birinci olarak 94⁰C 25 sn denatürasyon, 57⁰C 25 sn primerin yapışması ve 72⁰C 1.15 dakika cDNA'nın uzaması yapıldı. Bu işlemlerin ardına son basamak olan 72⁰C'de 9 dk bekletildi

Çizelge 3.2 Belirli bir cDNA için yapılan PCR reaksiyon karışımı;

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

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. Elektroforezde işleminden sonra DNA konsantrasyonu bulmak için aşağıdaki formül kullanıldı. cDNA problemleri bu şekilde sentezlenip kontrolde yapıldıktan sonra antisens mRNA hazırlanması için -20⁰C'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 37⁰C'de 4-5 saat inkübasyona bırakıldı (Çizelge 3.3).

Çizelge 3.3. Antisens mRNA üretimi için ependrof tüpüne yapılan pipetlemeler

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

Daha sonra DNase ile muamele edilerek DNA'nın sindirilmesini sağlandı. Bu amaçla aşağıda hazırlanan karışımdan alınarak bir önceki basamakta hazırlanan reaksiyon için inkübasyona bırakılan karışım üzerine ekledir. Bu şekilde reaksiyonu durdurarak ortamda kalan cDNA'yı DNase ile parçalanması sağlandı (Çizelge 3.4).

Çizelge 3.4. Dnase karışımının hazırlanması

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

Karışım 37⁰C' de 15 dakika inkübasyonda bıraktıktan sonra RNA çöktürmesi yapıldı. RNA'yı çöktürmek için aşağıdaki işlemler uygulandı;

a) Ortama 72 µL 4 M NH₄CH₃COO katıldı. Daha sonra 470 µL -80⁰C'de %100 etil alkol katıldı.

b) Bir gece -20⁰C'de veya 30 dakika -80⁰C'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 absorbans ölçüldü ve RNA miktarına bakıldı. Hesaplamaları aşağıdaki formüle göre yapıldı. Bu işlemde seyrelme faktörü 50'dir.

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

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

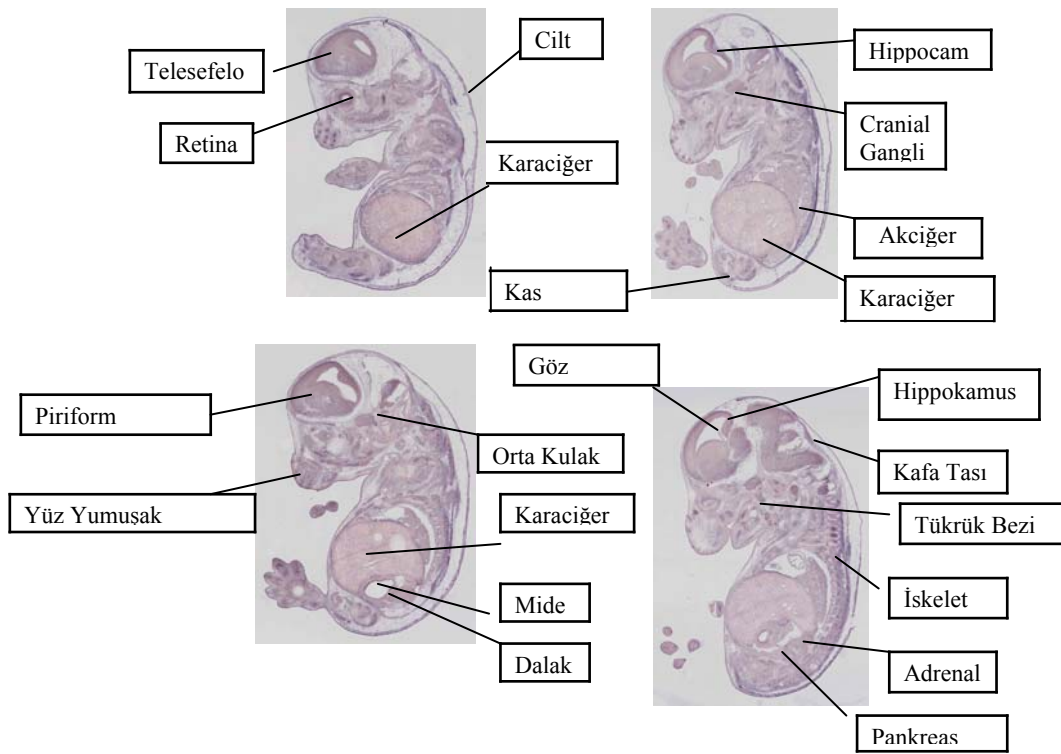
3.10. *In situ* Hibridizasyon (ISH) Yönteminin Uygulanması

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

Slâytların sandviç şeklinde hazırlanmasında kullanılan özel camlar bir gece 180°C sıcaklıktaki fırında bekletildi. Kullanılan bütün çözeltiler büyük bir kısmı otoklavlandı veya özel şekillerde hazırlandı. RNA'ları korumak için DEPC'li su kullanıldı ve

böylece Rnaz karşı korundu. 12.5, 14.5, 15.5 günlük fare embriyosu ve yetişkin fare beyni (P56) fareden alındıktan sonra OCT (optimal freezing medium) içine gömüldü. Bu amaçla özel alaşımli kablari kullanıldı. Bu özel kablari içine konulduktan sonra ani dondurmayla dondurulan embriyo -70°C saklandı (Herzig 2001). Mikroton cihazı kullanılarak lamliari üzerine 12.5, 14.5, 15.5 günlük fare embriyosu ve yetişkin fare beyni (P56) 20 μm kesitler halinde yayıldı. Alınan kesitler şekil 3.20'deki gibidir.

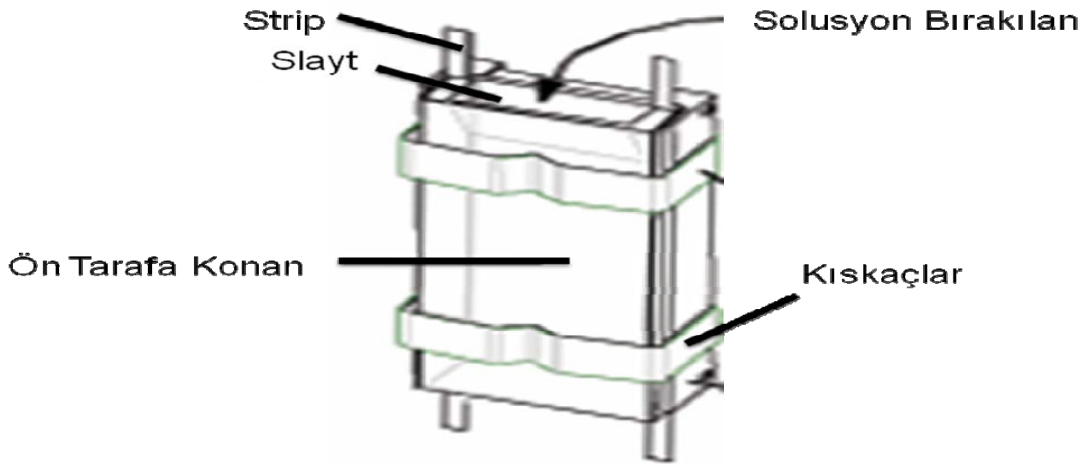


Şekil 3.20. 14.5 günlük fare embriyosundaki bazı organ ve yapıların yerlerinin gösterilmesi

In situ hibridizasyon yaparken kullanılan cihazlar değişik şekillerde dizayn edildi. Bunlardan bir tanesi de Tecan Genesis ISH uygun platformudur. Bahsedilen cihaz, Şekil 3.21'deki görünümünden de anlaşılacağı gibi, 2x48'lik özel bölmeden oluşur (aynı anda 96 slayt (Şekil 3.22) kullanılabilir); ön hibridizasyon, hibridizasyon, son hibridizasyon ve prob ilavesi işlemleri otomatik şekilde yapılır. Cihaz Gemini adlı bilgisayar programı ile kontrol edildi.



Şekil 3.21. 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 3.22. Slâytların hazırlanma şekli (sandviç); slâyt resminde slâyt ile kullanılan cam arasındaki boşluk 80 μm ve slaytın aldığı toplam hacim ise 400 μL 'dir.

Slâytlar hazırlanıp cihaza yerleştirildi ve sırası ile aşağıdaki işlemler yapıldı. Herbir gen için 4-6 slâyt kullanıldı. Her slayta 4 embriyo veya P56 beyin aktarıldı. Böylece herbir gen için 24-32 fotoğraf elde edildi.

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

Tekrar sayısı	Hacim	Zaman	Kullanılan Çözelti	Sıcaklık
5	300µL	5dk	%0,6 H ₂ O ₂ in MeOH	24 ⁰ C
7	300µL	5dk	PBS 1	
2	300µL	5dk	0,2 M HCl	
4	300µL	5dk	PBS	
1	400µL	5dk	proteinase K	
2	300µL	10dk	proteinase K	
7	300µL	5dk	PBS	
1	300µL	10dk	%4 PFA	
7	300µL	5dk	PBS	
2	300µL	15dk	hyb-mix	64 ⁰ C
1		5h	Prob ekleme	set 64 ⁰ C

2. Gün

Tekrar sayısı	Hacim	Zaman	Kullanılan Çözelti	Sıcaklık
5	300µL	5dk	5 x SSC	62 ⁰ C
5	350µL	10dk	formamide I	
5	350µL	12dk	formamide II	
3	300µL	8dk	0,1 x SSC	
1	300µL	8dk	0,1 x SSC	25 ⁰ C
4	300µL	5dk	NTE 1	
6	300µL	5dk	20 mM iodoacetamide	
4	300µL	5dk	NTE 2	
2	300µL	5dk	TNT 1	
6	300µL	5dk	%4 sheep serum	
4	200µL	5dk	TNT 2	
2	200µL	5dk	TNB blocking tamponu 1	
2	200µL	5dk	TNT 3	
2	300µL	5dk	maleate yıkama tamponu 1	

Çizelge 3.5. (devamı)

2	350µL	10dk	Blocking tamponu		
2	300µL	5dk	maleate yıkama tamponu 2		
2	250µL	5dk	TNT 4		
2	200µL	5dk	TMN 1		
4	200µL	5dk	TNT 5		
4	300µL	10dk	TNB blocking tamponu 2		
2	350µL	30dk	antiDIG-POD (1:600)		
6	200µL	5dk	TNT 6		
1	250µL	30dk	tyramide-biotin		
6	250µL	5dk	maleate yıkama tamponu 3		
2	200µL	5dk	TMN 2		
3	200µL	13dk	BCIP/NBT		
4	400µL	5dk	H ₂ O		
1	300µL		NTE 3		
2	200µL	10dk	%4 PFA+ %1 G/A		↓
4	400µL		H ₂ O 2		

A. Yıkama ve ön hibridizasyon işlemleri;

1. İlk basamakta slaytların üst kısmından 5 kez 5'er dakika %0,6 H₂O₂ (hidrojen peroksit) ilave edilmiş CH₃OH (methanol) uygulanır ve ardına 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 muamale edildi. Tekrar 4 kez %0,05 tween içeren 1xPBS ile yıkandı.

3. Bu işlemde 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 62⁰C'de 4,5 saat bekletilir. Bunun için her bir slayt mililitresinde 300ng prob içeren 300µl hyb mix ile muamele edildi.

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

1. 5 kez 6'şar dakika 5x SCC ile yıkandı. Ardına 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 64⁰C'de ve 1 tanesinde 25⁰C'de olmak üzere yapıldı.

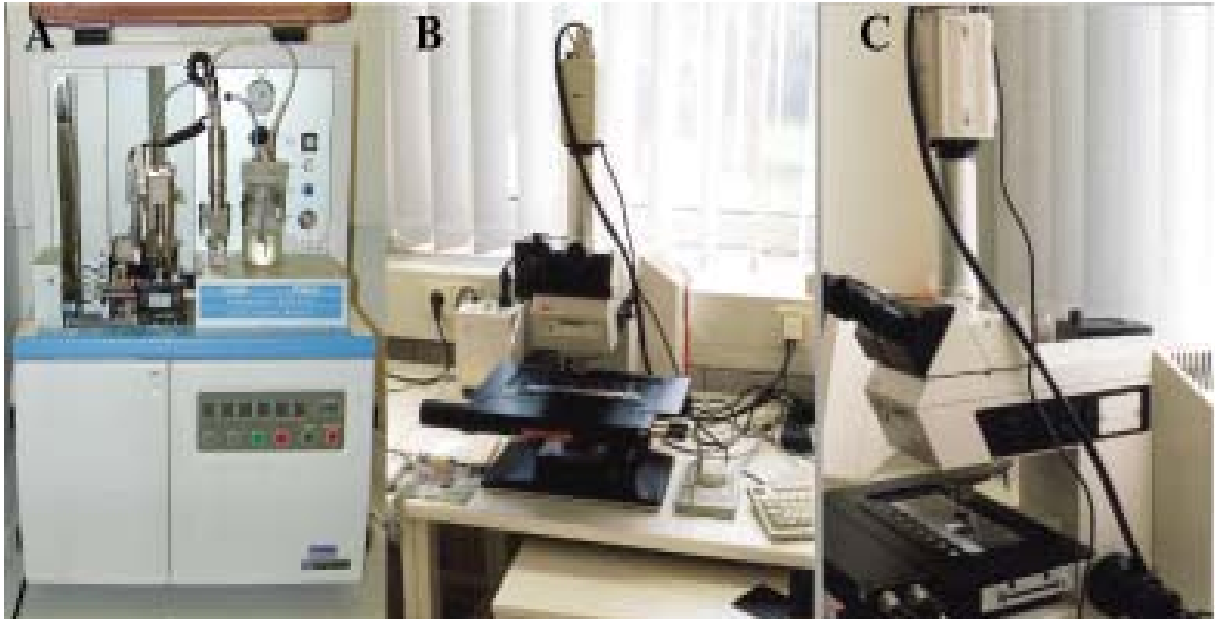
2. Yukarıdaki işlemlerin ardına 4 kez 5'er dakika %0,05 tween içeren 1xNTE yıkandı ve 6 kez 5'er dakika iodo asetamid ile yıkanır bu basamak çok önemlidir; doku üzerinde bulunan enzimler ve bazı protein rezidülerinin aktiviteleri azaltır veya tamamen bloke edildi.

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

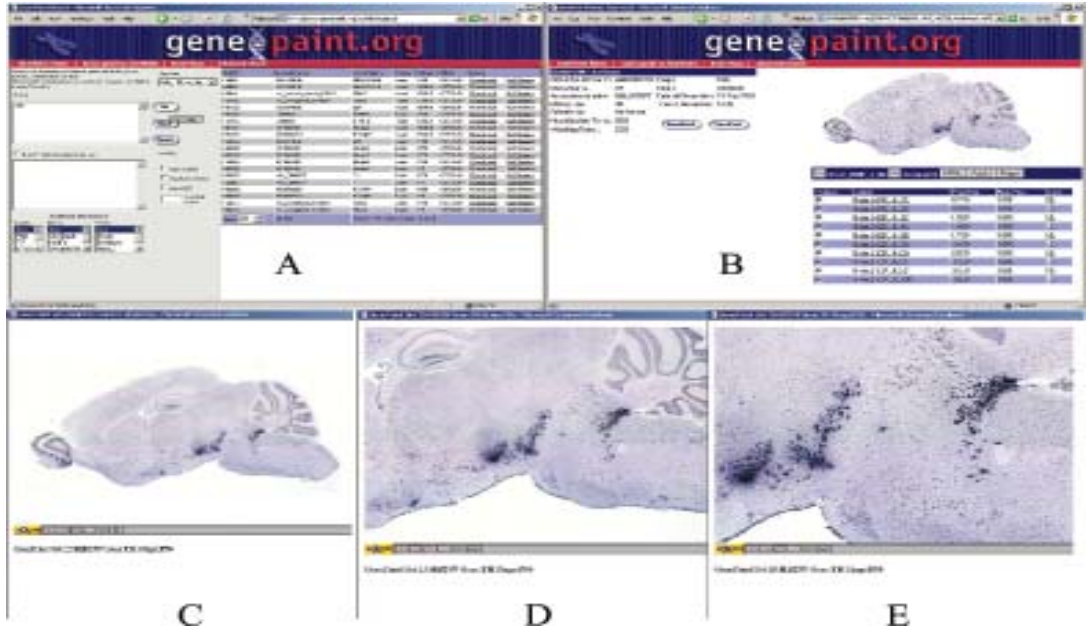
4. 4 kez 5'er dakika %0,05 tween içeren 1xTNT ilede yıkandı ve ardına TNB blocking çözeltisi ile 2 kez 5'er dakika yıkandı. Bu basamakta spesifik olmayan bağlanmalar giderildi. Ardına tekrardan 2 kez 5 dakika %0,05 tween içeren 1xTNT ilede yıkandı.
5. 2 kez 5'er dakika %0,05 tween içeren maleat tamponu ile yıkandı ve blocking reaktifi ile 2 kez 10'ar dakika ardından tekrardan 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, ardına 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 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 solusyon 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 ardına tekrardan 6 kez 5'er dakika %0,05 tween içeren maleat tamponu ile yıkandı. Bu işlemin ardına 4 kez 5 dakika %0,05 tween içeren 1xTNT tamponu yıkama yapıldı.
10. 2 kez 5'er dakika her 1 ml'sinde 0,5 mg levamizol içeren TMN tamponu yıkama yapılır. 3 kez 13'er dakika renk reaktifi eklendi ve sonra dd su ile 4 kez 5'er dakika, 1 kez %0,05 tween içeren 1x NTE, %1 oranında glutaraldehit içeren %4 PFA'lede 1 kez 10 dakika yıkama yapılır ve son olarakda saf su ile 4 kez yıkama yapılarak işlemler bitmiş olur. Bu etaptan sonra slaytlar temizlenerek bir gece kurumaya bırakılır.

3.11. Gen Ekspresyon Örneklerinin Değerlendirilmesi

Slâytlar bir gece bekledikten sonra slâyt kaplama makinasında yüzeyleri kaplandı ve daha sonra slâytlar temizlenerek kuruması için 37°C 'de bir gece bekletildi. Bundan sonra slâytlar mikroskopta incelenir sonra taranarak bilgisayar ortamına alındı (Şekil 3.23). Bu işlem; ilk önce slâytları parçalar halinde tarama yapan cihazda taranması ve daha sonra mozaik oluşturma programı ile birleştirildi. Ekspresyon için doku üzerinde oluşan mavi noktalara yani renk reaksiyonunun sonucunda oluşan renge bakıldı, kullanılan reaktiflerden dolayı mavi renk oluştuğundan ona göre yorum yapıldı (Şekil 3.24). Bilgisayar ortamına aktarılan çalışmalar detaylı şekillerde incelenerek çeşitli çalışmalarda kullanıldı ve bununla beraber diğere bilim adamlarının kullanımına açıldı (www.genepaint.org).



Şekil 3.23. (A): Slâyt kaplama makinesi, (B): Slâytları iclemede kullanılan mikroskop, (C): Slâytların taramasının yapıldığı scanner cihazı.



Şekil 3.24. Genepaint.org sorgu ve sonuç sayfası

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

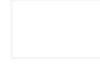
4. ARAŞTIRMA ve BULGULAR

Fare genomu içinde bulunan glutamat metabolizması genleri <http://www.genome.ad.jp> web sayfasından bakılarak belirlendi. Bu enzim genleri şunlardır: N-asetilglukozamin kinaz (Nagk), glukozamin-fosfat N-asetiltransferaz (Gnpnat1), glutamin fruktoz-6-fosfat transaminaz 1 (Gfpt1), fosfo ribozil pirofosfat amidotransferaz (Ppat), NAD sentetaz 1 (Nadsyn1), glutamil-tRNA sentetaz (Qars), karbamoil fosfat sentetaz 2 aspartat transkarbamoilaz, dihidroorotaz (Cad), karbamoil fosfat sentetaz 1(Cps1), glutaminaz (Gls), glutaminaz 2 (karaciğer, mitokondrial) (Gls2), glutamat-amonyak ligaz (glutamin sentetaz) (Glul), glutamil-pirolin-tRNA sentetaz (Eprs), glutamil-pirolin-tRNA sentetaz 2 (Ears2), aldehit dehidrogenaz 4'cü aile, A1 üyesi (Aldh4a1), glutamat dehidrogenaz 1 (Glud1), glutamat okzalasetat transaminaz 1, çözüner (Got1), glutamat okzalasetat transaminaz 2, mitokondrial (Got2), glutamat piruvat transaminaz (alanin transaminaz) 2 (Gpt2), glutamat piruvat transaminaz 1, çözüner (Gpt1), aldehit dehidrogenaz 5'ci aile, A1 altailesi (Aldh5a1), glutatyon reduktaz 1 (Gsr), glutatyon sentetaz (Gss), glutamat sistein ligaz, modifiye alt ünite (Gclm), glutamat-sistein ligaz, katalitik alt ünite (Gclc), glutamik asit dekarboksilaz 1 (Gad1), glutamik asit dekarboksilaz 2 (Gad2), 4-amino butirat aminotransferaz (Abat), guanin monofosfat sentetaz (Gmps). Bu çalışmada çalışılacak olan bu enzim genlerin 11(Çizelge 4.2.) tanesi için primer dizaynı ile 14.5 günlük fare embriyosundaki *in situ* hibridizasyonları daha önceki çalışmalarda yapılmıştır. Bu nedenle geriye kalan 17 enzim geni için primer dizaynları materyal metotta açıklandığı şekilde spesifik primerleri hazırlandı. Hepsinin primer uzunlukları 20 baz olacak şekilde yapıldı. Çizelge 4.1'de gösterildiği gibi bütün genler için hazırlanan spesifik primerler verilmiştir. Right (reverse) primerin 5' ucuna SP6 (GCGATTTAGGTGACACTATAG) promoter ile left (forward) primerin 5' ucunda T7 (GCGTAATACGACTCACTATAGGG) promoter takılarak spesifik primerler hazırlanmış oldu.



Çizelge 4.1. Yeni çalışılan glutamat metabolizması genleri için primer dizaynı sonuçlarına ait bilgiler.

LoliD	LoliSy	LoLi Name	Accession no	FW Position	RW Position	Probe Length	T7+FP	Sp6+RP
54342	Gnpnat1	Glukozamin-fosfat N-asetiltransferaz	NM_019425	723	1617	895	GCGTAATACGACTCACTATAGG GACTGTGGTGTGCCAGTGTGT	GCGATTTAGGTGACACTATAG TGATCATGGTGGTACATGCC
14583	Gfpt1	Glutamin fruktoz-6-fosfat transaminaz 1	NM_013528	605	1661	1057	GCGTAATACGACTCACTATAGG GTGCCAAGCTCGTCAAGTACA	GCGATTTAGGTGACACTATAG TTTGCCTCTCTTGCATGG
231327	Ppat	Fosfo ribozil pirofosfat amidotransferaz	XM_973973	2675	3618	944	GCGTAATACGACTCACTATAGG GCTGTCTTCATACACTTAG	GCGATTTAGGTGACACTATAG AATGCCAATCCGCCTGTGTC
78914	Nadsyn1	NAD sentetaz 1	NM_030221	1433	2327	895	GCGTAATACGACTCACTATAGG GTGAGCATCGACACTGCTGTG	GCGATTTAGGTGACACTATAG TAACTAAGATCTGGTCAGGC
97541	Qars	Glutamil-tRNA sentetaz	NM-133794	14	863	850	GCGTAATACGACTCACTATAGG GTACTCCAGATTCGCTAGCGC	GCGATTTAGGTGACACTATAG TTGATGGCTTTGGCGTGTCC
69719	Cad	Karbamoil fosfat sentetaz 2 aspartat transkarbamoilaz	NM_023525	293	1184	892	GCGTAATACGACTCACTATAGG GTAGTGCTAACGTATCCTCTC	GCGATTTAGGTGACACTATAG TCCATATCTGAAGGGCCGGC
227231	Cps1	Karbamoil fosfat sentetaz	XM_129769	3663	4589	927	GCGTAATACGACTCACTATAGG GAGTAGAGATGGACGCTGTTG	GCGATTTAGGTGACACTATAG TCCACAGTGCAGATTTCTG
216456	Gls2	Glutaminaz 2 (karaciğer, mitokondrial)	NM_001033264	207	981	775	GCGTAATACGACTCACTATAGG GAGCACTCGGATCATGACGCC	GCGATTTAGGTGACACTATAG TTCTCTGACTTGAATGTGGC
107508	Eprs	Glutamil-pirolin-tRNA sentetaz	NM_029735	2923	3954	1032	GCGTAATACGACTCACTATAGG GACAGTACAAGTCGCTGACAG	GCGATTTAGGTGACACTATAG ACCATCACACCGATGGTTCG
14645	Glul	Glutamat-amonyak ligaz (glutamin sentetaz)	NM_008131	1141	2143	1003	GCGTAATACGACTCACTATAGG GAAGACCGTCGGCCTTCTGCC	GCGATTTAGGTGACACTATAG ACAGGTGGTGGCAAGCAGTG
67417	Ears2	Glutamil-pirolin-tRNA sentetaz 2	NM_026140	46	1045	1000	GCGTAATACGACTCACTATAGG GTGCTGGCCGAGCCGCACGTG	GCGATTTAGGTGACACTATAG TGGCAGGTGATCCGCGTCAG
212647	Aldh4a1	Aldehit dehidrogenaz 4'cü aile, A1 üyesi	NM_175438	100	1057	958	GCGTAATACGACTCACTATAGG GAGCTGCGCAAGACTGTAAAG	GCGATTTAGGTGACACTATAG AGCGTGGGAAGGTACGGAAC
108682	Gpt2	Glutamat piruvat transaminaz (alanin transaminaz) 2	NM_173866	2551	3533	983	GCGTAATACGACTCACTATAGG GATCTGCGGACAGCATCCTAT	GCGATTTAGGTGACACTATAG AGGAGGCGGAAGAAGTATG
214579	Aldh5a1	Aldehit dehidrogenaz 5'ci aile, A1 altailesi	NM_172532	462	1540	1079	GCGTAATACGACTCACTATAGG GAGGACGACCTTGCCAAGATC	GCGATTTAGGTGACACTATAG TTCATTACACCGACCATGC



Çizelge 4.1. (devamı)

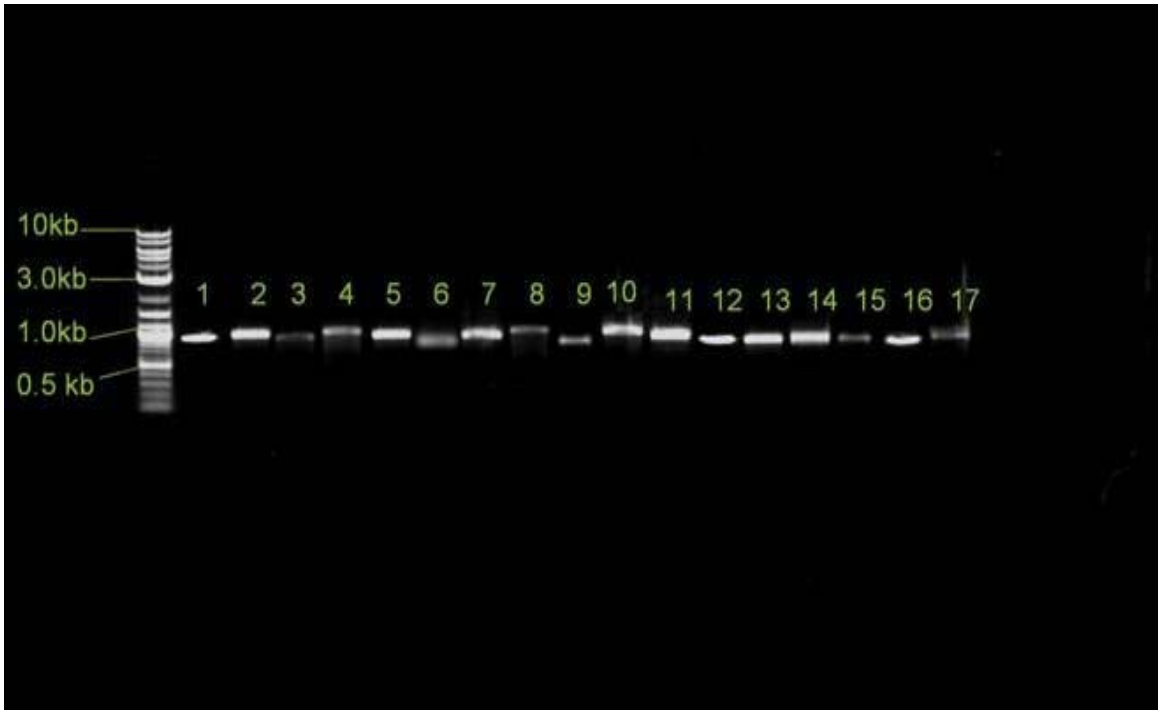
14782	Gsr	Glutasyon reduktaz 1	NM_010344	18	1030	1013	GCGTAATACGACTCACTATAGG GATCTCAGTCCGTTCTTTAAG	GCGATTTAGGTGACACTATAG TTATCATGCCTGATCATAAG
14629	Gclc	Glutamat-sistein ligaz, katalitik alt ünite	NM_010295	209	1292	1084	GCGTAATACGACTCACTATAGG GATGGAGGCGATGTTCTTGAG	GCGATTTAGGTGACACTATAG ACCTCCATTGGTCGGAAGCTC
268860	Abat	4-amino butirat aminotransferaz	NM_172961	801	1786	986	GCGTAATACGACTCACTATAGG GTGCTTAGCGACCACACACTC	GCGATTTAGGTGACACTATAG ACAAGCCTGAACCAATGAGC

Çizelge 4.2. Önceden çalışılan glutamat metabolizması genleri için primer dizaynı sonuçlarına ait bilgiler

LoliD	LoliSy	LoLi Name	Accesion no	FW Position	RW Position	Probe Length	T7+FP	Sp6+RP
56174	Nagk	N-asetilglukozamin kinaz	NM_019542	134	389	255	GCGTAATACGACTCACTATAGG G CCCACGCGTCCGGCGGGAGC	GCGATTTAGGTGACACTATAG AGCCTTCTGTTTGGCCCTGT
14660	Gls	Glutaminaz	XM_129846	2166	2600	435	GCGTAATACGACTCACTATAGG G CGCACACGACAAATCTGAGT	GCGATTTAGGTGACACTATAG CAGACATTTGACAGCAGGA
14661	Glud	Glutamat dehidrogenaz	NM_008133	19	872	854	GCGTAATACGACTCACTATAGG GAGCCAGACAAGCACAGCCGC	GCGATTTAGGTGACACTATAG TGCTGGCATAGGTGTCAGCG
14718	Got1	Glutamat oksalasetat transaminaz 1, sitozolik	NM_010324	66	947	882	GCGTAATACGACTCACTATAGG ATCAGTCTTGGCCAGGTTTC	GCGATTTAGGTGACACTATAG TTGGACCAGGTGATTCGTAC
14719	Got2	Glutamat oksalasetat transaminaz 2, mitokondrial	NM_010325	39	2383	2344	GCGTAATACGACTCACTATAGG GTCAGTGTCTCACCTTTTAG	GCGATTTAGGTGACACTATAG GGTCTATAGTAATTTTATTG
76282	Gpt1	Glutamat piruvat transaminaz 1, çözüdür	NM_182805	1	255	255	GCGTAATACGACTCACTATAGG G CCCACGCGTCCGGTGCC	GCGATTTAGGTGACACTATAG CTGCTCCAGCTCCAAGGCAC
14854	Gss	Glutasyon sentetaz	NM_008180	432	1353	922	GCGTAATACGACTCACTATAGG G AAGCCCTGAAACAGATCGAG	GCGATTTAGGTGACACTATAG ACATGCTTGTTCATCACCAG
14630	Gclm	Glutamat sistein ligaz modifiye alt birim	NM_008129	37	1002	966	GCGTAATACGACTCACTATAGG GAAGCACTTTCTCGGGTGAGG	GCGATTTAGGTGACACTATAG AGGCAGTCAAATCTGGTGGC
14415	Gad1	Glutamik asit dekarboksilaz 1	NM_008077	3	552	549	GCGTAATACGACTCACTATAGG G TGGCCTCGAGCCAGATTCGG	GCGATTTAGGTGACACTATAG TCTTAGCTGGAAGCAGATCT
14417	Gad2	Glutamik asit dekarboksilaz 2	NM_008078	114	2643	2530	GCGTAATACGACTCACTATAGG G CCTGACTGGAACATACAAAC	GCGATTTAGGTGACACTATAG CCTTTTCACTGTACCCAG
229363	Gmps	Guanin monofosfat sentetaz	XM_130877	853	2240	1388	GCGTAATACGACTCACTATAGG G AAAGTGTGGTTTACTCAG	GCGATTTAGGTGACACTATAG CCTCAACAAAGCATTTATTA

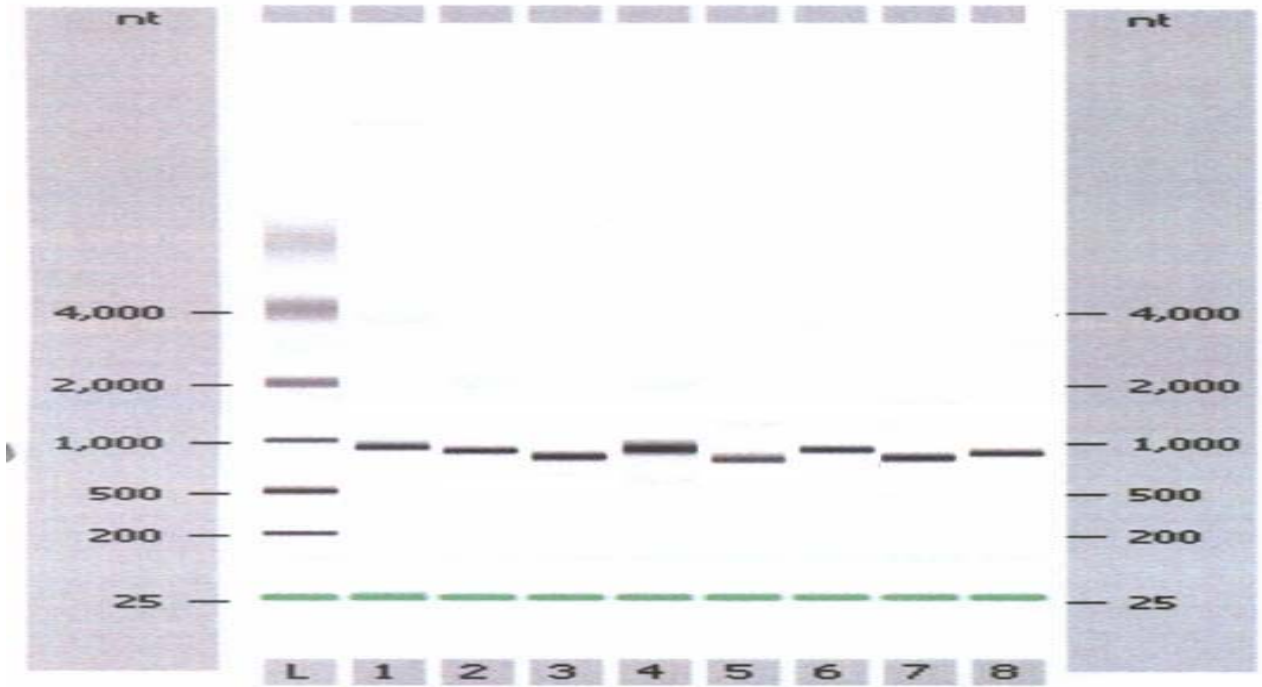
1. Spesifik Genler için cDNA Problarının ve Spesifik Antisens mRNA'larının Agaroz Elektroferez Sonuçları

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 ve antisens mRNA ürünlerinin jelde yürütülmesi sonucunda elde edilen jel fotoğrafları verilmiştir. Elektroferez işlemlerinde 10 kb'lık DNA markerı kullanıldı. Bu problar üretildikten sonra -80°C 'ye bırakıldı. Glutamat metabolizması için ayrıca 12.5, 14.5, 15.5 günlük fare embriyoları ve yetişki fare beyni (P56) alınarak medium içine gömüldü ve daha sonra kroyostat kesim cihazı ile bu üç değişik doku için kesitler hazırlandı. Hazırlanan bu dokular ISH'da kullanılmak üzere -80°C 'ye bırakıldı.



Şekil 4.1. Spesifik genler için yapılan cDNA problarına ait agaroz elektroforezi sonucu

*1.)Gnpnat1 2.) Gfpt1 3.) Ppat 4.) Ears2 5.) Nadsyn1 6.) Gclc 7.) Qars 8.) Gls2 9.) Eprs 10.) Glul 11.) Aldh5a1 12.)Gsr 13.) Gpt2 14.) Aldh4a1 15.) Cad 16.)Abat 17.) Cps1

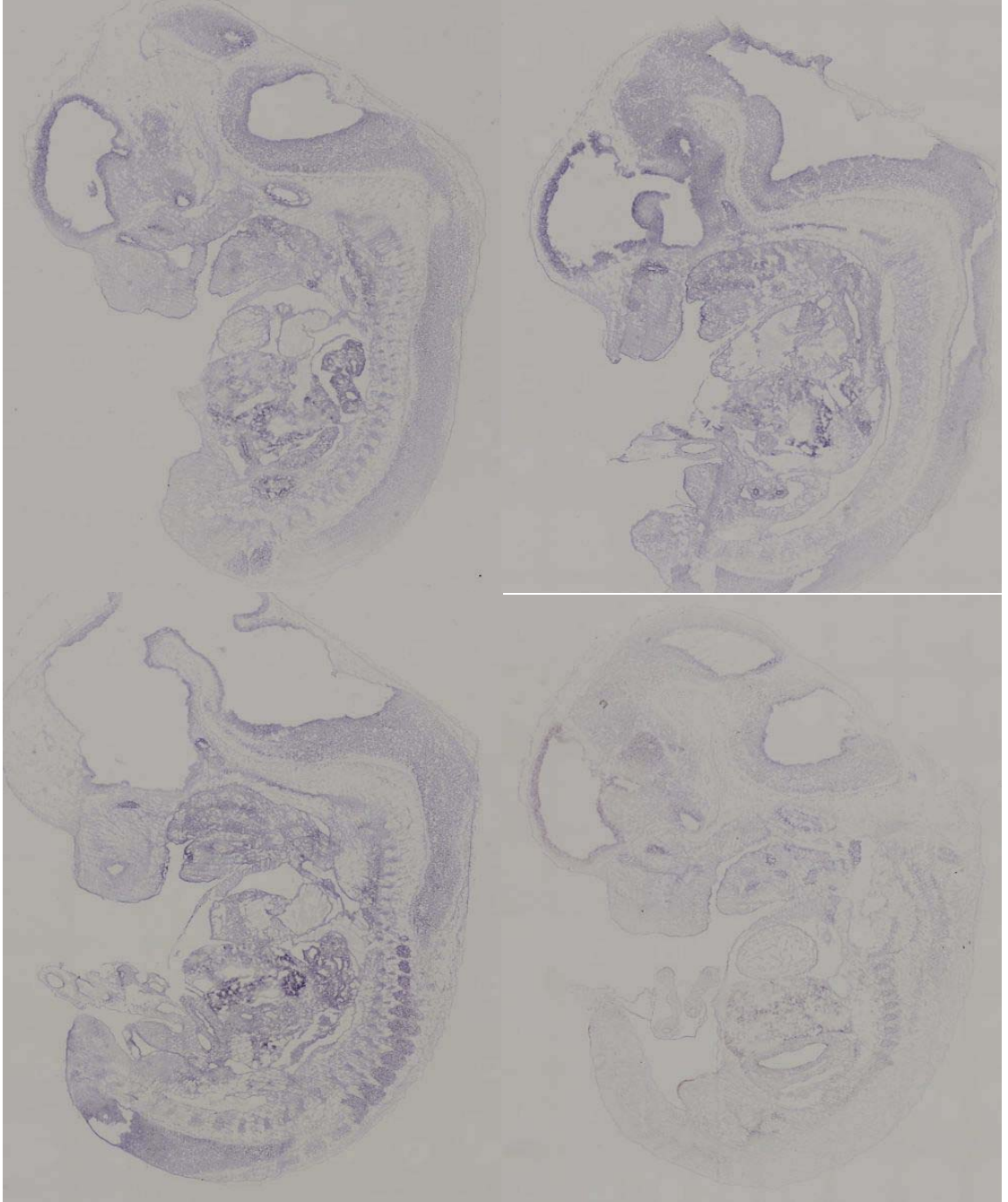


Şekil 4.2. Spesifik genler için yapılan antisens mRNA'larına yani hazırlanan mRNA problemlerine ait agaroz elektroforez sonucu. Burada ilk fotoğrafta 12 tane için görülmektedir. Diğerleri içinde aynı sonuçlar elde edildi.

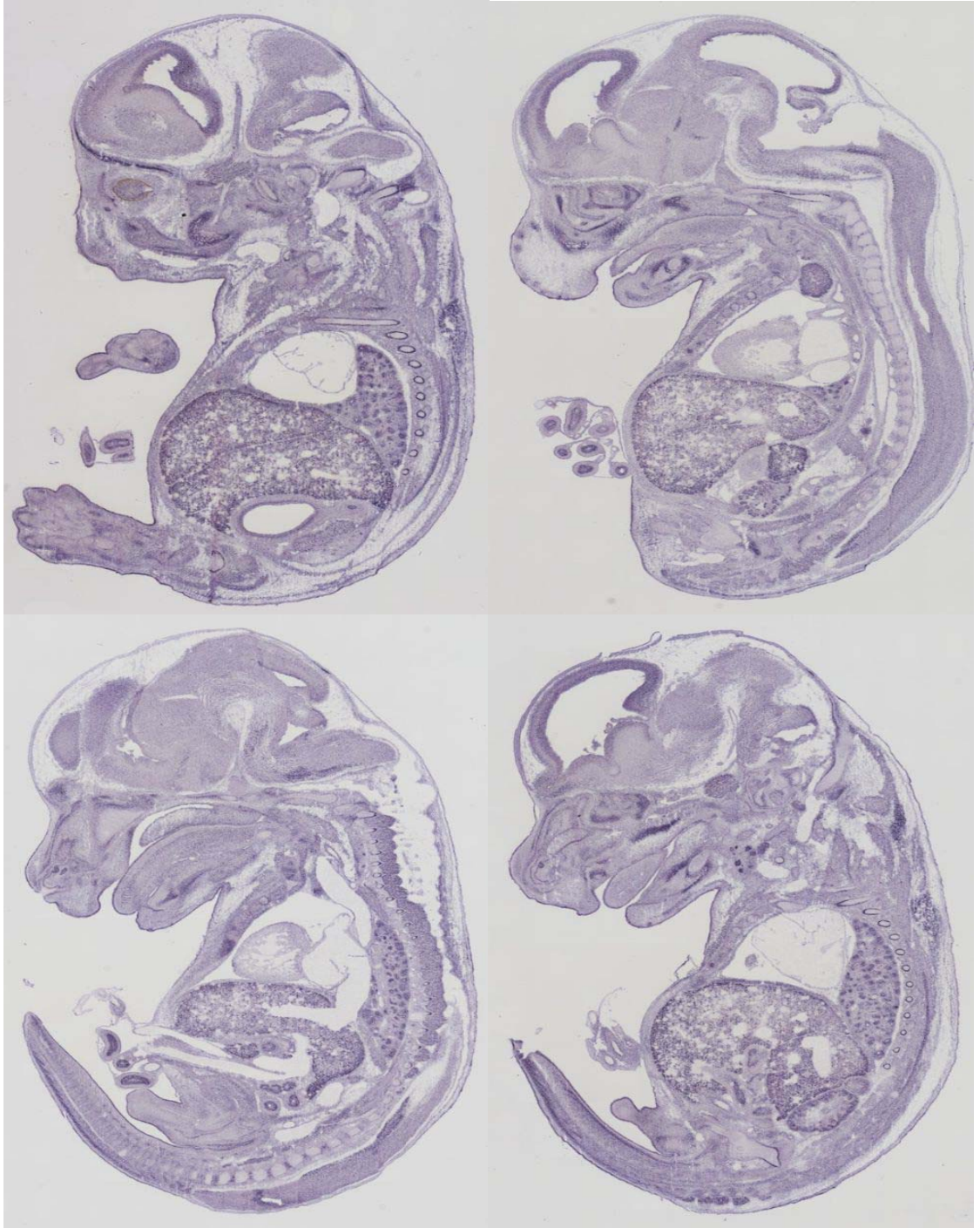
4.1. *In situ* Hibridizasyon Sonuçları

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.

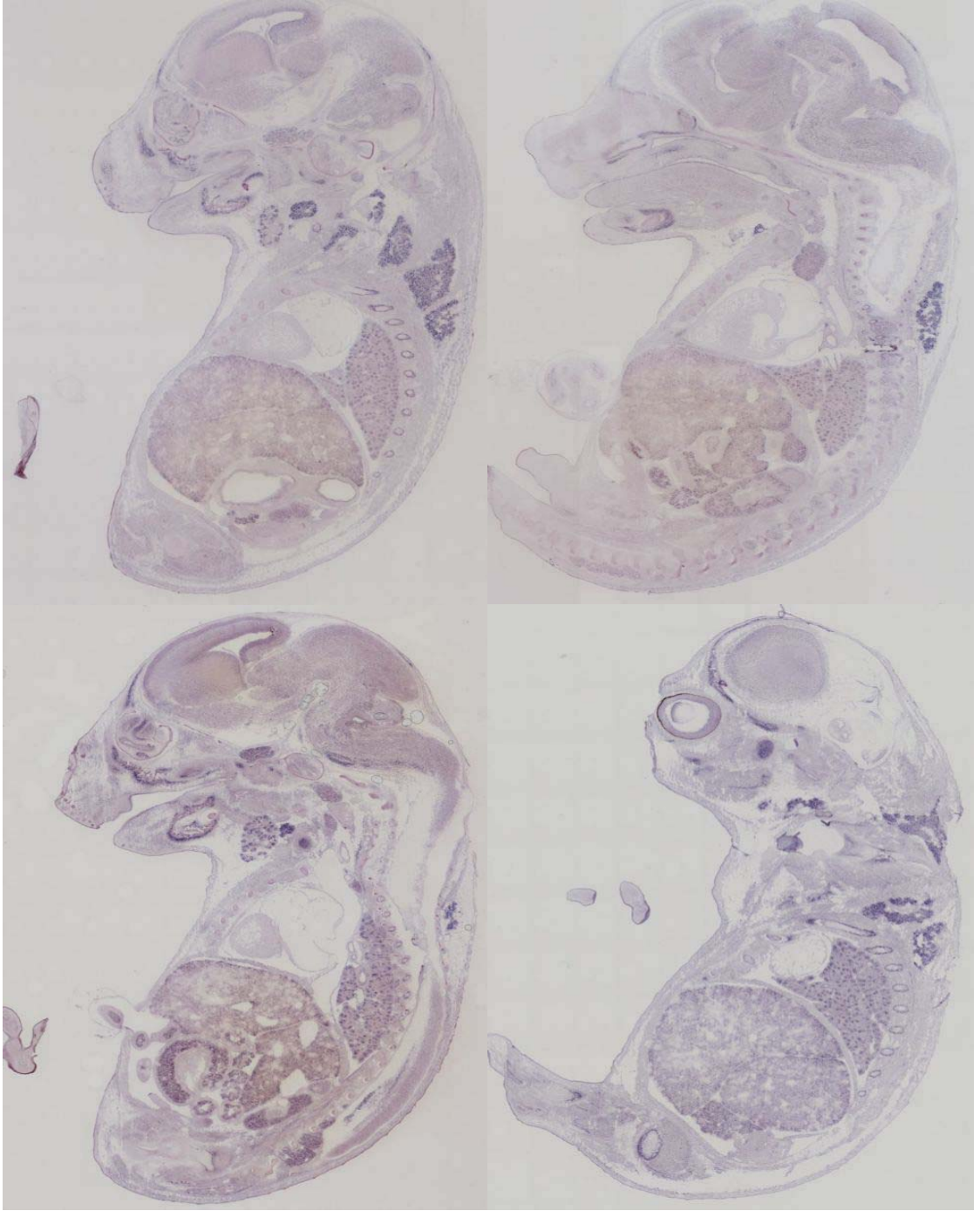
Glutamat metabolizmasının bütün genleri için 12.5 günlük, 14.5 günlük ve 15.5 günlük fare embriyoları ile postnatal 56 gün beyin dönemindeki ekspresyon yorumları ve ekspresyon çalışmaları sonucu <http://www.genepaint.org/> web sayfasına aktarılmıştır. Çalıştığımız tüm genlerden sadece 3 genin tüm evrelerine ait fotoğraflar verilmiştir (Şekil 4.3-Şekil 4.14). Diğer çalışılan genlerin tüm evrelerine ait ekspresyon sonuçlarına ulaşılabilecek kod numaraları Çizelge 3.2-3.5'de gösterilmiştir.



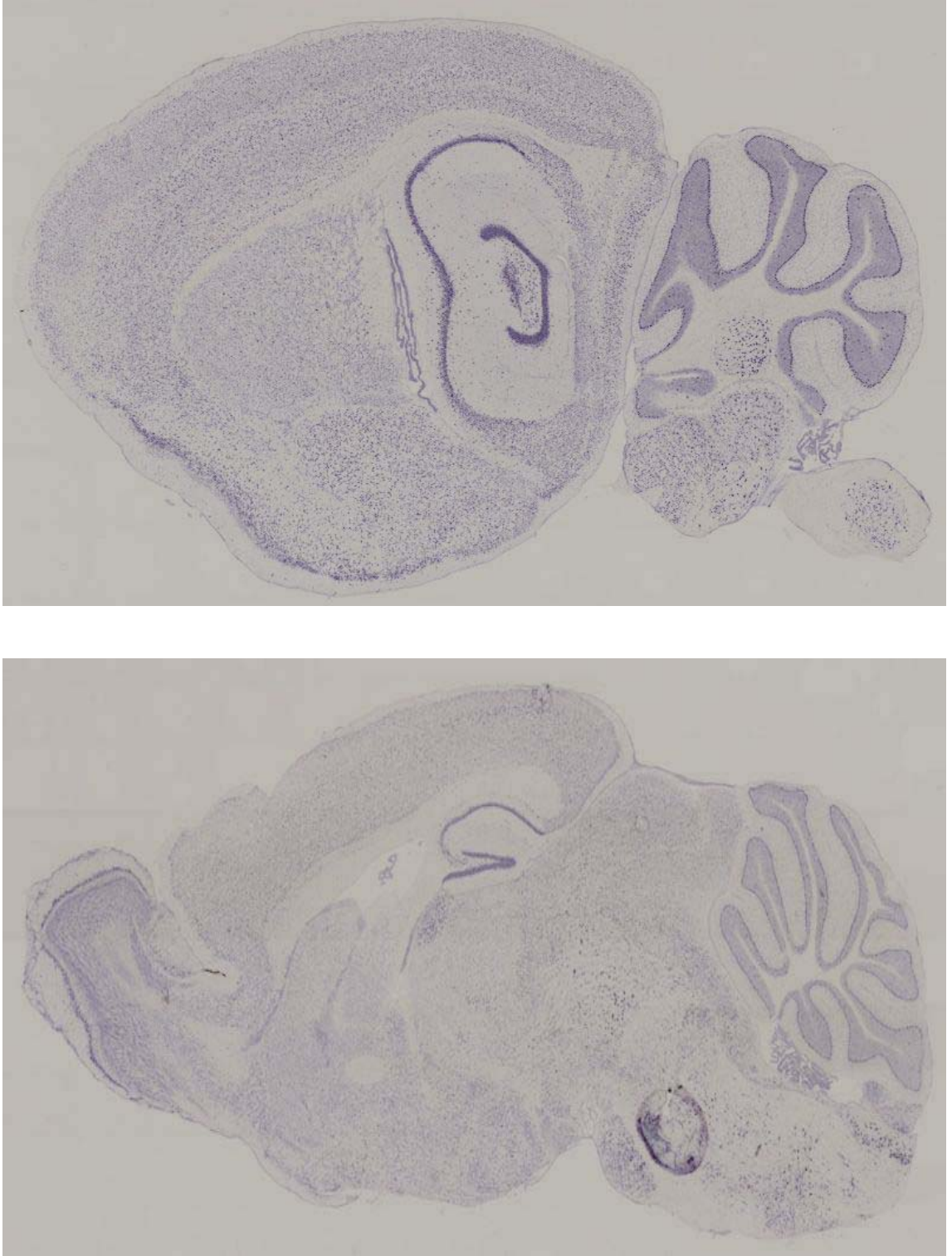
Şekil 4.3. Glutamil-prolil-tRNA sentetaz (Eprs) geninin 12.5 günlük fare embriyosu üzerinde farklı kesimlerde yapılan *in situ* hibridizasyon işlemlerinde elde edilen sonuçlar.



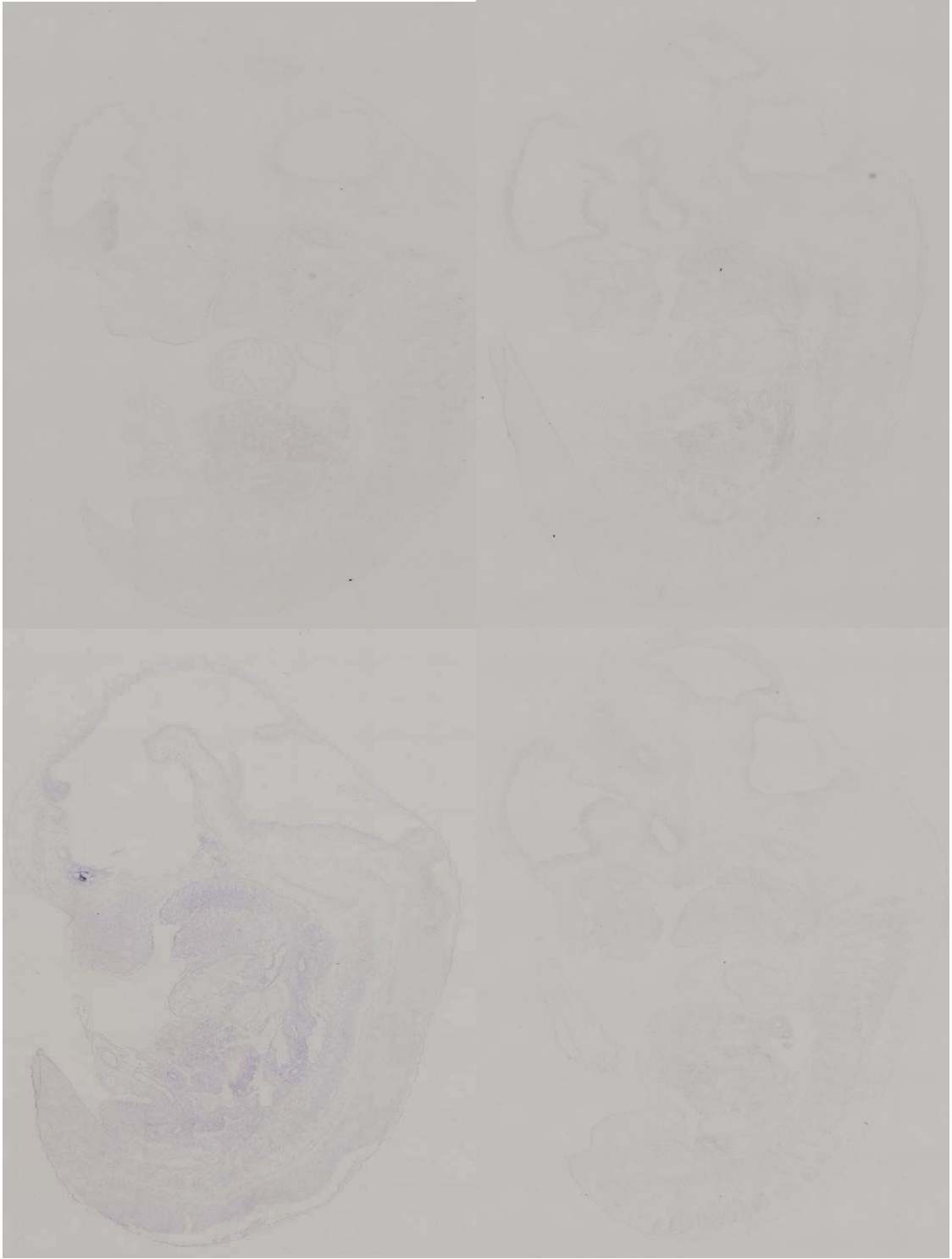
Şekil 4.4. Glutamil-prolil-tRNA sentetaz (Eprs) geninin 14.5 günlük fare embriyosu üzerinde farklı kesimlerde yapılan *in situ* hibridizasyon işlemlerinde elde edilen sonuçlar.



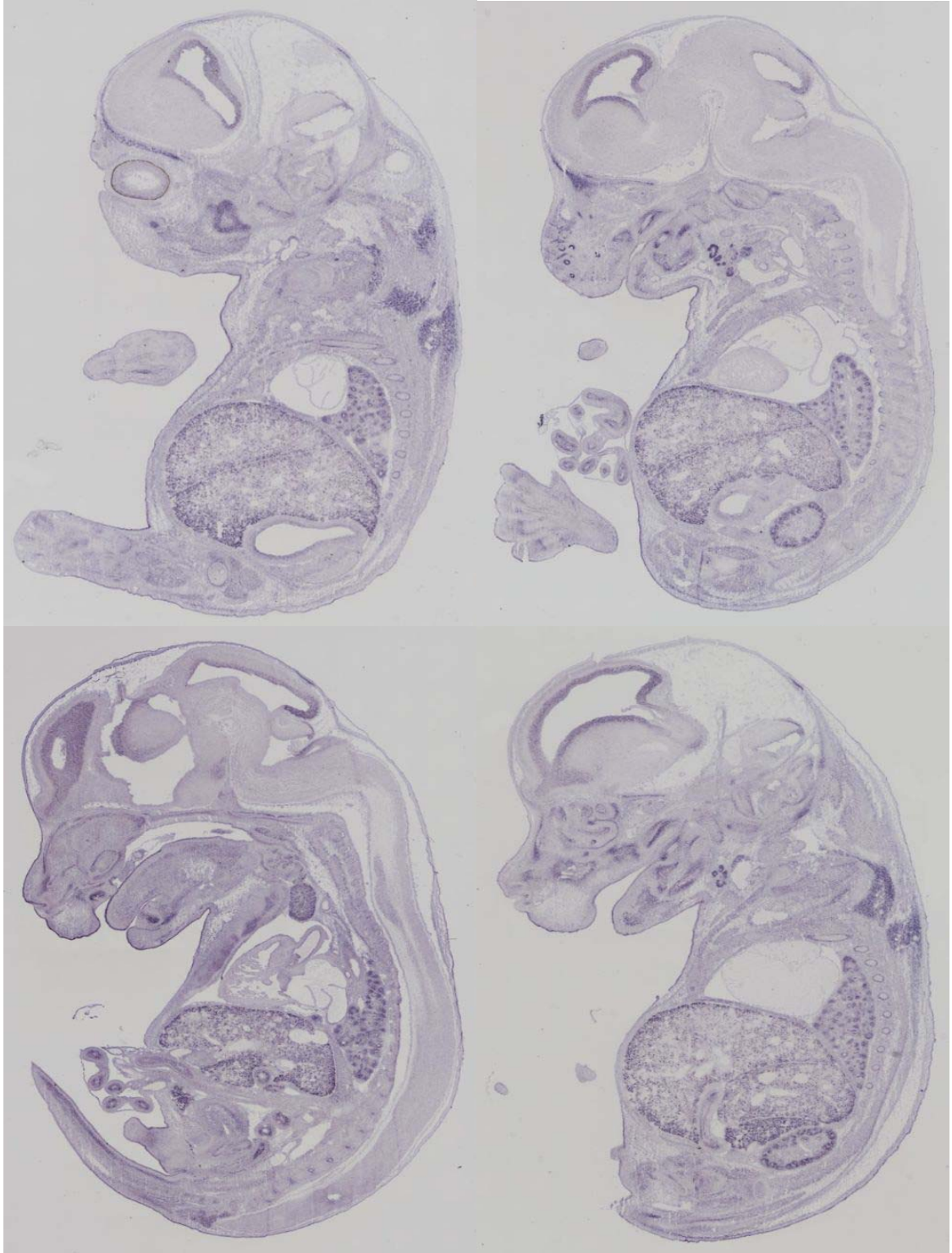
Şekil 4.5. Glutamil-prolil-tRNA sentetaz (Eprs) geninin 15.5 günlük fare embriyosu üzerinde farklı kesimlerde yapılan *in situ* hibridizasyon işlemlerinde elde edilen sonuçlar.



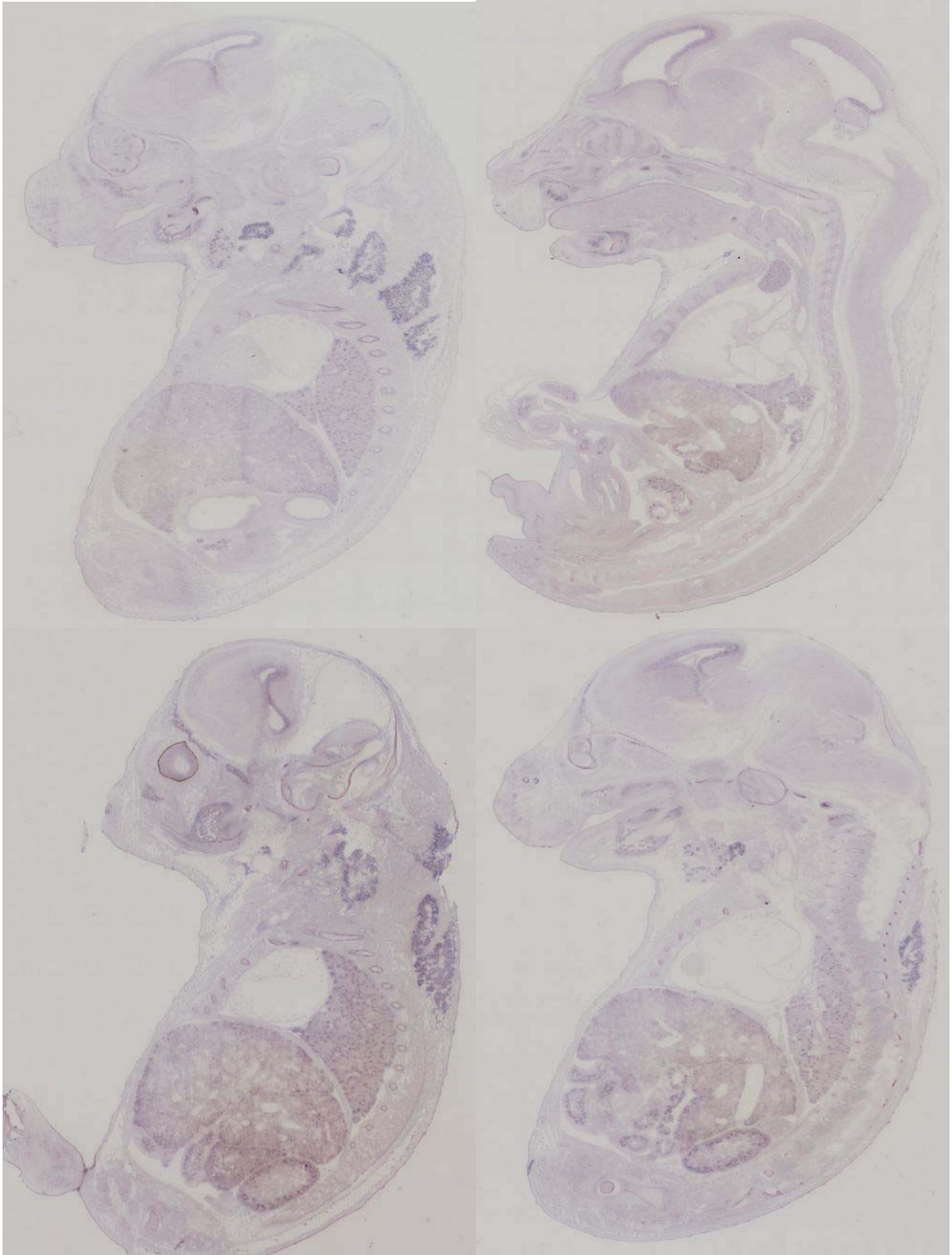
Şekil 4.6. Glutamil-prolil-tRNA sentetaz (Eprs) geninin P56 yetişkin fare beyni üzerinde farklı kesimlerde yapılan *in situ* hibridizasyon işlemlerinde elde edilen sonuçlar.



Şekil 4.7. Karbamoil-fosfat sentetaz 2, aspartat transkarbamilaz (Cad) geninin 12.5 günlük fare embriyosu üzerinde farklı kesimlerde yapılan *in situ* hibridizasyon işlemlerinde elde edilen sonuçlar.



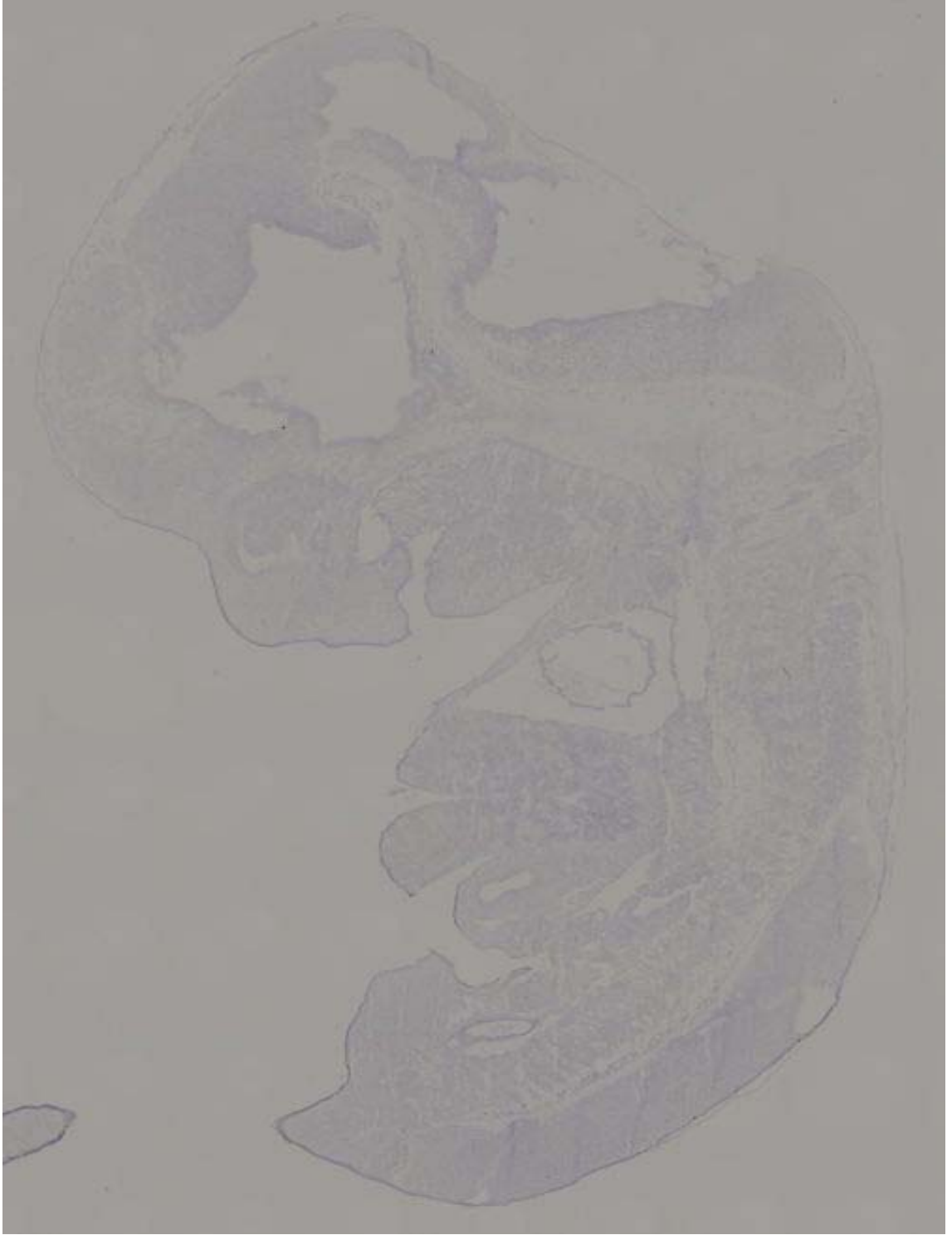
Şekil 4.8. Karbamoil-fosfat sentetaz 2, aspartat transkarbamilaz (Cad) geninin 14.5 günlük fare embriyosu üzerinde farklı kesimlerde yapılan *in situ* hibridizasyon işlemlerinde elde edilen sonuçlar.



Şekil 4.9. Karbamoil-fosfat sentetaz 2, aspartat transkarbamilaz (Cad) geninin 15.5 günlük fare embriyosu üzerinde farklı kesimlerde yapılan *in situ* hibridizasyon işlemlerinde elde edilen sonuçlar.



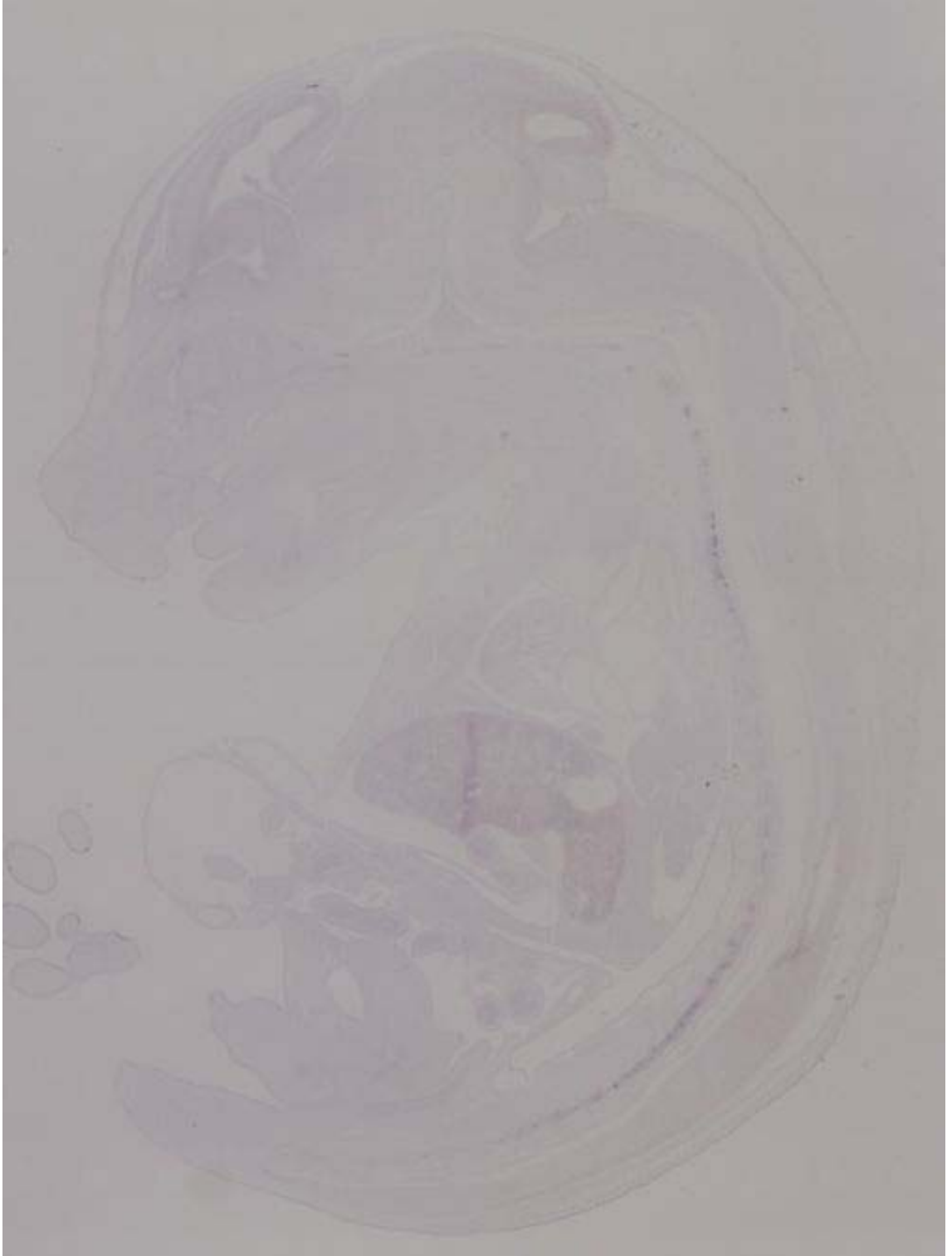
Şekil 4.10. Karbamoil-fosfat sentetaz 2, aspartat transkarbamilaz (Cad) geninin P56 yetişkin fare beyni üzerinde farklı kesimlerde yapılan *in situ* hibridizasyon işlemlerinde elde edilen sonuçlar.



Şekil 4.11. NAD sentetaz 1 (Nadsyn1) geninin 12.5 günlük fare embriyosu üzerinde farklı kesimlerde yapılan *in situ* hibridizasyon işlemlerinde elde edilen sonuçlar.



Şekil 4.12. NAD sentetaz 1 (Nadsyn1) geninin 14.5 günlük fare embriyosu üzerinde farklı kesimlerde yapılan *in situ* hibridizasyon işlemlerinde elde edilen sonuçlar



Şekil 4.13. NAD sentetaz 1 (Nadsyn1) geninin 15.5 günlük fare embriyosu üzerinde farklı kesimlerde yapılan *in situ* hibridizasyon işlemlerinde elde edilen sonuçlar.



Şekil 4.14 NAD sentetaz 1 (Nadsyn1) geninin P56 yetişkin fare beyni üzerinde farklı kesimlerde yapılan *in situ* hibridizasyon işlemlerinde elde edilen sonuçlar.

Çizelge 4.3. Glutamat metabolizmasının bütün genleri için 12.5 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	E12.5 için kod numaraları	ISH kod	Ekspresyon sonuçları (E12.5)
1	Gnpnat1	NM_019425	2665		Ekspresyon olmadı.
2	Gfpt1	NM_013528	2695		Ekspresyon olmadı.
3	Ppat	XM_973973	2702		Ekspresyon olmadı.
4	Nadsyn1	NM_030221	2701		Ekspresyon olmadı.
5	Qars	NM-133794	2673		Yaygın ve genel olarak tüm dokularda ekspresyon oldu.
6	Cad	NM_023525	2658		Karaciğerde zayıf bir ekspresyon vardır.
7	Cps1	XM_129769	2693		Bağırsaklar ve karaciğerde ekspresyon oldu.
8	Gls2	NM_001033264	2663		Ekspresyon olmadı.
9	Glul	NM_008131	2664		Yaygın ve genel olarak tüm dokularda ekspresyon oldu.
10	Eprs	NM_029735	2659		Karaciğer, kaslar, sinir sisteminde ekspresyon oldu.
11	Ears2	NM_026140	2653		Ekspresyon olmadı.
12	Aldh4a1	NM_175438	2656		Karaciğerde ekspresyon oldu.
13	Gpt2	NM_173866	2700		Arka beyin boşluklarının yüzeyinde ve spinal kordda ekspresyon oldu.
14	Aldh5a1	NM_172532	2657		Zayıf ve yaygın bir ekspresyon görüldü.
15	Gsr	NM_010344	2668		Ekspresyon olmadı.
16	Gclc	NM_010295	2661		Yaygın ve genel olarak tüm dokularda ekspresyon oldu.
17	Abat	NM_172961	2654		Merkezi sinir sistemi, karaciğer, bağırsaklarda ekspresyon oldu.

Çizelge 4.3. (devamı)

18	Gmps	XM_130877	2698	Yaygın ve genel olarak tüm dokularda ekspresyon oldu.
19	Gls	NM_129846	2696	Zayıf olarak merkezi sinir sisteminde ekspresyon olduğu görüldü.
20	Glud	NM_008133	2697	Karaciğerde çok kuvvetli ve belirgin olarak diğer dokularda da zayıf olarak ekspresyon olduğu görüldü.
21	Got1	NM_010324	2666	Karaciğer, akciğer, dorsal kök bezleri, böbrek ve timusda ekspresyon oldu.
22	Got2	NM_010325	2667	Karaciğer, dorsal kök bezleri başta olmak üzere yaygın bir ekspresyon olduğu görüldü.
23	Gpt1	NM_182805	2699	Ekspresyon olmadı.
24	Gss	NM_008180	2669	Yaygın ve zayıf olarak ekspresyon olduğu görüldü.
25	Gclm	NM_008129	2662	Karaciğerde ekspresyon olduğu görüldü.
26	Gad1	NM_008077	2660	Yaygın ve genel olarak tüm dokularda ekspresyon oldu.
27	Gad2	XM_123772	2694	Sinir sisteminde ekspresyon oldu.
28	Nagk	NM_019542	2671	Yaygın ve zayıf olarak ekspresyon olduğu görüldü.

Çizelge 4.4. Glutamat metabolizmasının bütün 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	Gnpnat1	NM_019425	MH2495	Karaciğer, akciğer, böbrek ve bağırsaklarda ekspresyon oldu.
2	Gfpt1	NM_013528	MH2496	Akciğer, böbrek, kaslar, spinal kord, kemikler ve pankreasta ekspresyon oldu.
3	Ppat	XM_973973	MH2501	Karaciğer, akciğer, böbrek ve timusta ekspresyon oldu.
4	Nadsyn1	NM_030221	MH2499	Ekspresyon olmadı.
5	Qars	NM-133794	MH2488	Yaygın ve genel olarak tüm dokularda ekspresyon oldu.
6	Cad	NM_023525	MH2485	Yaygın ve genel olarak tüm dokularda ekspresyon oldu.
7	Cps1	XM_129769	MH2453	Bağırsaklar ve karaciğerde ekspresyon oldu.
8	Gls2	NM_001033264	MH2535	Ekspresyon olmadı.
9	Glul	NM_008131	MH2497	Yaygın ve genel olarak tüm dokularda ekspresyon oldu.
10	Eprs	NM_029735	MH2486	Yaygın ve genel olarak tüm dokularda ekspresyon oldu.
11	Ears2	NM_026140	MH2520	Ekspresyon olmadı.
12	Aldh4a1	NM_175438	MH2521	Karaciğer, böbrek, spinal kord ve timusta ekspresyon oldu.
13	Gpt2	NM_173866	MH2522	Beyin boşluklarında ekspresyon oldu.
14	Aldh5a1	NM_172532	MH2515	Yaygın ve genel olarak tüm dokularda ekspresyon oldu.
15	Gsr	NM_010344	MH2523	Ekspresyon olmadı.

Çizelge 4.4. (devamı)

16	Gclc	NM_010295	MH2514	Yaygın ve genel olarak tüm dokularda ekspresyon oldu.
17	Abat	NM_172961	MH2518	Yaygın ve genel olarak tüm dokularda ekspresyon oldu.
18	Gmps	XM_130877	MH207	Yaygın ve genel olarak tüm dokularda ekspresyon oldu.
19	Gls	NM_129846	MH733	Sinir sistemi, retina, nazal epiteliumda ekspresyon oldu.
20	Glud	NM_008133	MH832	Kaslar, karaciğer, böbrekde çok daha belirgin olmak üzere tüm dokularda ekspresyon oldu.
21	Got1	NM_010324	MH1269	Yaygın ve genel olarak tüm dokularda ekspresyon oldu.
22	Got2	NM_010325	EH2482	Yaygın ve genel olarak tüm dokularda ekspresyon oldu.
23	Gpt1	NM_182805	EH1971	Zayıf olarak yaygın ve genel olarak tüm dokularda ekspresyon oldu.
24	Gss	NM_008180	MH1613	Karaciğer, bağırsaklar daha belirgin olarak ekspresyon oldu.
25	Gclm	NM_008129	MH1296	Karaciğerde ekspresyon oldu.
26	Gad1	NM_008077	EG1070	Yaygın ve genel olarak tüm dokularda ekspresyon oldu.
27	Gad2	XM_123772	MH448	Sinir sisteminde ekspresyon oldu.
28	Nagk	NM_019542	EH1978	Yaygın ve zayıf olarak tüm dokularda ekspresyon oldu.

Çizelge 4.5. Glutamat metabolizmasının bütün genleri için 15.5 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	E15.5 ISH için kod numarası	Ekspresyon sonuçları (E15.5)
1	Gnpnat1	NM_019425	2721	Karaciğer, akciğer, böbrek ve bağırsaklarda ekspresyon oldu.
2	Gfpt1	NM_013528	2715	Akciğer, böbrek, kaslar, spinal kord, kemikler ve pankreasta ekspresyon oldu.
3	Ppat	XM_973973	2732	Karaciğer, akciğer, böbrek ve timusta ekspresyon oldu.
4	Nadsyn1	NM_030221	2729	Ekspresyon olmadı.
5	Qars	NM-133794	2733	Yaygın ve genel olarak tüm dokularda ekspresyon oldu.
6	Cad	NM_023525	2708	Yaygın olarak tüm dokularda ekspresyon oldu. Ancak karaciğer, böbrek ve kaslarda daha kuvvetli ekspresyon oldu.
7	Cps1	XM_129769	2709	Bağırsaklar ve karaciğerde ekspresyon oldu.
8	Gls2	NM_001033264	2717	Ekspresyon olmadı.
9	Glul	NM_008131	2719	Yaygın ve genel olarak tüm dokularda ekspresyon oldu.
10	Eprs	NM_029735	2710	Yaygın ve kuvvetli olarak tüm dokularda ekspresyon oldu.
11	Ears2	NM_026140	2703	Ekspresyon olmadı.
12	Aldh4a1	NM_175438	2706	Karaciğer, sırt kası, böbrek, spinal kord ve timusta ekspresyon oldu.
13	Gpt2	NM_173866	2725	Beyin boşluklarında ekspresyon oldu.
14	Aldh5a1	NM_172532	2707	Yaygın ve genel olarak tüm dokularda ekspresyon oldu.
15	Gsr	NM_010344	2726	Ekspresyon olmadı.
16	Gclc	NM_010295	2713	Yaygın ve genel olarak tüm dokularda ekspresyon oldu.

Çizelge 4.5. (devamı)

17	Abat	NM_172961	2704	Yaygın ve genel olarak tüm dokularda ekspresyon oldu.
18	Gmps	XM_130877	2720	Yaygın ve kuvvetli olarak tüm dokularda ekspresyon oldu.
19	Gls	NM_129846	2716	Sinir sistemi, retina, nazal epiteliumda ekspresyon oldu.
20	Glud	NM_008133	2718	Kaslar, karaciğer, böbrekte çok daha belirgin olmak üzere tüm dokularda ekspresyon oldu.
21	Got1	NM_010324	2722	Yaygın ve genel olarak tüm dokularda ekspresyon oldu.
22	Got2	NM_010325	2723	Yaygın ve genel olarak tüm dokularda ekspresyon oldu.
23	Gpt1	NM_182805	2724	Zayıf olarak yaygın ve genel olarak tüm dokularda ekspresyon oldu.
24	Gss	NM_008180	2727	Karaciğer, bağırsaklar daha belirgin olarak ekspresyon oldu.
25	Gclm	NM_008129	2714	Karaciğer ekspresyon oldu.
26	Gad1	NM_008077	2711	Yaygın ve genel olarak tüm dokularda ekspresyon oldu.
27	Gad2	XM_123772	2712	Sinir sisteminde ekspresyon oldu.
28	Nagk	NM_019542	2730	Zayıf olarak tüm dokularda ekspresyon oldu.

Çizelge 4.6. Glutamat metabolizmasının bütün genleri için postnatal fare beyinde (P56) 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	P56 ISH için kod numaraları	Ekspresyon sonuçları (P56)
1	Gnpnat1	NM_019425	2680	Serebelum ve olfaktori soğancığında baskın olarak yaygın ancak zayıf olarak ekspresyon oldu.
2	Gfpt1	NM_013528	2674	Yaygın ve kuvvetli bir ekspresyon vardır.
3	Ppat	XM_973973	2691	Zayıf ve yaygın bir ekspresyon olduğu görüldü
4	Nadsyn1	NM_030221	2688	Cerebelum, korteks, olfaktori soğancığında belirgin olmak üzere yaygın ve genel bir ekspresyon vardır.
5	Qars	NM-133794	2692	Yaygın ve kuvvetli bir ekspresyon vardır.
6	Cad	NM_023525	2646	Cerebelum, korteks, olfaktori soğancığında ekspresyon oldu.
7	Cps1	XM_129769	2647	Zayıf ve yaygın bir ekspresyon olduğu görüldü
8	Gls2	NM_001033264	2676	Yaygın bir ekspresyon vardır.
9	Glul	NM_008131	2678	Yaygın ve kuvvetli bir ekspresyon vardır.
10	Eprs	NM_029735	2648	Pons, medula, cerebelum, korteks, olfaktori soğancığında ekspresyon oldu.
11	Ears2	NM_026140	2641	Zayıf ve yaygın bir ekspresyon olduğu görüldü

Çizelge 4.6. (devamı)

12	Aldh4a1	NM_175438	2644	Cerebelum, korteks, olfaktori soğancığı, talamusda daha belirgin olarak tüm beyinde ekspresyon oldu.
13	Gpt2	NM_173866	2684	Zayıf ve yaygın bir ekspresyonla beraber kortekte, serebellumda ekspresyon olduğu görüldü
14	Aldh5a1	NM_172532	2645	Kuvvetli ve yaygın bir ekspresyon olduğu görüldü.
15	Gsr	NM_010344	2685	Yaygın bir ekspresyon vardır.
16	Gclc	NM_010295	2651	Yaygın bir ekspresyon vardır.
17	Abat	NM_172961	2642	Yaygın bir ekspresyon vardır.
18	Gmps	XM_130877	2679	Kuvvetli ve yaygın bir ekspresyon olduğu görüldü.
19	Gls	NM_129846	2734	Kuvvetli ve yaygın bir ekspresyonla beraber korteksde, serebellumda ekspresyon olduğu görüldü
20	Glud	NM_008133	2677	Talamus, hipotalamus ve serebellum başta olmak üzere kuvvetli ve yaygın bir ekspresyon olduğu belirlendi.
21	Got1	NM_010324	2681	Olfaktori soğancığı, talamus, hipotalamus ve serebellum başta olmak üzere kuvvetli ve yaygın bir ekspresyon olduğu belirlendi.
22	Got2	NM_010325	2682	Olfaktori soğancığı, talamus, hipotalamus ve serebellum başta olmak üzere kuvvetli ve yaygın bir ekspresyon olduğu belirlendi.
23	Gpt1	NM_182805	2683	Zayıf ve yaygın bir ekspresyonla beraber kortekte, serebellumda ekspresyon olduğu görüldü.
24	Gss	NM_008180	2686	Yaygın bir ekspresyon vardır.

Çizelge 4.6. (devamı)

25	Gclm	NM_008129	2652	Beyin boşluk yüzeyleri, korteks, serebelum başta olmak üzere yaygın bir ekspresyon gözlenmiştir.
26	Gad1	NM_008077	2649	Kuvvetli ve yaygın bir ekspresyon olduğu görüldü.
27	Gad2	XM_123772	2650	Kan damarlarında, talamusta, serebelumda belirgi olmakla beraber dokularda da ekspresyon olduğu görüldü.
28	Nagk	NM_019542	2689	Yaygın bir ekspresyon vardır.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Glutamat metabolizmasının bütün genleri için 12.5, 14.5, 15.5 günlük fare embriyonik dönemleri ve postnatal fare beyinde (P56) ekspresyon yorumları ve ekspresyon çalışmaları sonucu <http://www.genepaint.org/> web sayfasına aktarılan gen ekspresyon fotoğraflarına ulaşılabilecek kod numaraları Çizelge 4.2-4.5’de verilmiştir. Bu genler için 12.5, 14.5, 15.5 günlük fare embriyonik dönemleri ve postnatal fare beyinde (P56) ekspresyon yorumları karşılaştırması Çizelge 5.1’de yapılmıştır. Buna göre bir kısım genlerin farklı evrelerde farklı ekspresyona uğradığı anlaşılmaktadır.

Çizelge 5.1 Glutamat metabolizmasının bütün genleri için 12,5, 14,5, 15,5 günlük fare embriyonik dönemleri ve postnatal fare beyinde (P56) ekspresyon yorumları karşılaştırması.

ENZİM ADI VE GEN SİMGESİ	E12.5	E14.5	E15.5	P56
Glutamat-sistein ligaz, katalitik alt ünite (Gclc)	Yaygın ve genel olarak tüm dokularda ekspresyon olmuştu.	Yaygın ve genel olarak tüm dokularda ekspresyon oldu.	Yaygın ve genel olarak tüm dokularda ekspresyon oldu.	Yaygın bir ekspresyon vardır.
Glutamat sistein ligaz, modifiye alt ünite (Gclm)	Karaciğerde ekspresyon oldu.	Karaciğerde ekspresyon oldu.	Karaciğerde ekspresyon oldu.	Beyin boşluk yüzeyleri, korteks, serebelum başta olmak üzere yaygın bir ekspresyon gözlenmiştir.
Glutasyon sentetaz (Gss)	Yaygın ve zayıf olarak ekspresyon olduğu görüldü.	Karaciğer, bağırsaklar daha belirgi olarak ekspresyon oldu.	Karaciğer, bağırsaklar daha belirgi olarak ekspresyon oldu.	Yaygın bir ekspresyon vardır.
Glutasyon reduktaz 1 (Gsr)	Ekspresyon olmadı.	Ekspresyon olmadı.	Ekspresyon olmadı.	Yaygın bir ekspresyon vardır.

Çizelge 5.1 (devamı)

Glutamat-amonyak ligaz (glutamin sentetaz) (Glul)	Yaygın ve genel olarak tüm dokularda ekspresyon oldu.	Yaygın ve genel olarak tüm dokularda ekspresyon oldu.	Yaygın ve genel olarak tüm dokularda ekspresyon oldu.	Yaygın ve kuvvetli bir ekspresyon vardır
Glutaminaz (Gls)	Zayıf olarak merkezi sinir sisteminde ekspresyon olduğu görüldü.	Sinir sistemi, retina, nazal epitelyumda ekspresyon oldu.	Sinir sistemi, retina, nazal epitelyumda ekspresyon oldu.	Kuvvetli ve yaygın bir ekspresyonla beraber kortekste, serebelumda ekspresyon olduğu görüldü
Glutaminaz 2 (karaciğer, mitokondrial) (Gls2)	Ekspresyon olmadı.	Ekspresyon olmadı.	Ekspresyon olmadı.	Yaygın bir ekspresyon vardır.
Glutamat okzalasetat transaminaz 1, çözüdür (Got1)	Karaciğer, akciğer, dorsal kök bezleri, böbrek, timusda ekspresyon oldu.	Yaygın ve genel olarak tüm dokularda ekspresyon oldu.	Yaygın ve genel olarak tüm dokularda ekspresyon oldu.	Olfaktori soğancığı, talamus, hipotalamus ve serebelum başta olmak üzere kuvvetli ve yaygın bir ekspresyon olduğu belirlendi.
Glutamat okzalasetat transaminaz 2, mitokondrial (Got2)	Karaciğer, dorsal kök bezleri başta olmak üzere yaygın bir ekspresyon olduğu görüldü.	Yaygın ve genel olarak tüm dokularda ekspresyon oldu.	Yaygın ve genel olarak tüm dokularda ekspresyon oldu.	Olfaktori soğancığı, talamus ve serebelum başta olmak üzere kuvvetli ve yaygın bir ekspresyon olduğu belirlendi
Glutamat piruvat transaminaz 1, çözüdür (Gpt1)	Ekspresyon olmadı.	Zayıf olarak tüm dokularda ekspresyon oldu.	Zayıf olarak tüm dokularda ekspresyon oldu.	Zayıf ve yaygın bir ekspresyon olduğu görüldü.

Çizelge 5.1 (devamı)

Glutamat piruvat transaminaz (alanin transaminaz) 2 (Gpt2)	Arka beyin boşluklarının yüzeyinde ve spinal kord da ekspresyon oldu.	Beyin boşluklarında ekspresyon oldu.	Beyin boşluklarında ekspresyon oldu.	Zayıf ve yaygın bir ekspresyonla beraber kortekste, serebelumda ekspresyon olduğu görüldü
Glutamat dehidrogenaz (Gld1) 1	Karaciğerde çok kuvvetli ve belirgin olarak diğer dokularda da zayıf olarak ekspresyon olduğu görüldü.	Kaslar, karaciğer, böbrekte çok daha belirgin olmak üzere tüm dokularda ekspresyon oldu	Kaslar, karaciğer, böbrekte çok daha belirgin olmak üzere tüm dokularda ekspresyon oldu	Talamus, hipotalamus ve serebelum başta olmak üzere kuvvetli ve yaygın bir ekspresyon olduğu belirlendi
Glutamik asit dekarboksilaz (Gad1) 1	Yaygın ve genel olarak tüm dokularda ekspresyon oldu.	Yaygın ve genel olarak tüm dokularda ekspresyon oldu.	Yaygın ve genel olarak tüm dokularda ekspresyon oldu.	Kuvvetli ve yaygın bir ekspresyon olduğu görüldü.
Glutamik asit dekarboksilaz (Gad2) 2	Sinir sisteminde ekspresyon oldu.	Sinir sisteminde ekspresyon oldu.	Sinir sisteminde ekspresyon oldu.	Kan damarları ve talamusla beraber tüm dokular da ekspresyon olduğu görüldü.
4-amino butirat aminotransferaz (Abat)	Merkez sinir sistemi, karaciğer, bağısaklar da ekspresyon oldu.	Yaygın ve genel olarak tüm dokularda ekspresyon oldu.	Yaygın ve genel olarak tüm dokularda ekspresyon oldu.	Yaygın bir ekspresyon vardır.
Aldehit dehidrogenaz 5'ci aile, A1 altailesi (Aldh5a1)	Zayıf ve yaygın bir ekspresyon görüldü.	Yaygın ve genel olarak tüm dokularda ekspresyon oldu.	Yaygın ve genel olarak tüm dokularda ekspresyon oldu.	Kuvvetli ve yaygın bir ekspresyon olduğu görüldü.

Çizelge 5.1. (devamı)

Glutamil-pirolin-tRNA sentetaz (Eprs)	Karaciğer, kaslar, sinir sistemi ekspresyon oldu.	Yaygın ve genel olarak tüm dokularda ekspresyon oldu.	Yaygın ve kuvvetli olarak tüm dokularda ekspresyon oldu.	Pons, medula, serebelum, korteks, olfactory soğancığında ekspresyon oldu.
Glutamil-pirolin-tRNA sentetaz 2 (Ears2)	Ekspresyon olmadı.	Ekspresyon olmadı.	Ekspresyon olmadı.	Zayıf ve yaygın bir ekspresyon olduğu görüldü.
Aldehit dehidrogenaz 4'cü aile, A1 üyesi (Aldh4a1)	Karaciğerde ekspresyon oldu.	Karaciğer, böbrek, spinal kord ve timusta ekspresyon oldu.	Karaciğer, sırt kası, böbrek, spinal kord ve timusta ekspresyon oldu.	serebelum, korteks, olfaktori soğancı, talamusta daha belirgin olarak tüm beyinde ekspresyon oldu.
Glutamil-tRNA sentetaz (Qars)	Yaygın ve genel olarak tüm dokularda ekspresyon oldu.	Yaygın ve genel olarak tüm dokularda ekspresyon oldu.	Yaygın ve genel olarak tüm dokularda ekspresyon oldu.	Yaygın ve kuvvetli bir ekspresyon vardır.
Guanin monofosfat sentetaz (Gmps)	Yaygın ve genel olarak tüm dokularda ekspresyon oldu.	Yaygın ve genel olarak tüm dokularda ekspresyon oldu.	Yaygın ve kuvvetli olarak tüm dokularda ekspresyon oldu.	Kuvvetli ve yaygın bir ekspresyon olduğu görüldü.
NAD sentetaz 1 (Nadsyn1)	Ekspresyon olmadı.	Ekspresyon olmadı.	Ekspresyon olmadı.	Serebelum ve korteks te belirgin olmak üzere yaygın ve genel bir ekspresyon vardır.

Çizelge 5.1. (devamı)

Fosfo ribozil pirofosfat amidotransferaz (Ppat)	Ekspresyon olmadı.	Karaciğer, akciğer, böbrek ve timusta ekspresyon oldu.	Karaciğer, akciğer, böbrek ve timusta ekspresyon oldu.	Zayıf ve yaygın bir ekspresyon olduğu görüldü
Karbamoil fosfat sentetaz 1(Cps1)	Bağırsaklar ve karaciğerde ekspresyon oldu.	Bağırsaklar ve karaciğerde ekspresyon oldu.	Bağırsaklar ve karaciğerde ekspresyon oldu.	Zayıf ve yaygın bir ekspresyon olduğu görüldü
Karbamoil fosfat sentetaz2 aspartat transkarbamoilaz, (Cad)	Karaciğerde zayıf bir ekspresyon vardır.	Yaygın ve genel olarak tüm dokularda ekspresyon oldu.	Yaygın olarak tüm dokularda ekspresyon oldu.	serebelum, korteks, olfactory soğancığı ekspresyon oldu.
Glutamin fruktoz-6-fosfat transaminaz 1 (Gfpt1)	Ekspresyon olmadı.	Akciğer, böbrek, kemikler ve pankreasta ekspresyon oldu.	Akciğer, böbrek, kemikler ve pankreasta ekspresyon oldu.	Yaygın ve kuvvetli bir ekspresyon vardır.
Glukozamin-fosfat N-asetiltransferaz (Gnpat1)	Ekspresyon olmadı.	Karaciğer, akciğer, böbrek ve bağırsaklarda ekspresyon oldu.	Karaciğer, akciğer, böbrek ve bağırsaklarda ekspresyon oldu.	Serebelum ve olfaktori soğancığında baskın olarak yaygın ancak zayıf olarak ekspresyon oldu.
N-asetilglukozamin kinaz (Nagk)	Yaygın ve zayıf olarak ekspresyon olduğu görüldü.	Yaygın ve zayıf olarak tüm dokularda ekspresyon oldu.	Zayıf olarak tüm dokularda ekspresyon oldu.	Yaygın bir ekspresyon vardır.

Çizelge 5.1’de görüldüğü gibi; iki alt birime sahip olan glutamat sisteyin ligaz genin katalitik olanı [glutamat sisteyin ligaz, katalitik alt birim (Gclc)] ile ilgili yapılmış olan literatür çalışmalarında bu genin northern blot tekniği ile ekspresyon analizi yapıldığı ve 12.5 günlük fare embriyosundan ekspresyon uğradığı belirtilmiştir (Thompson *et al.*

2000). Ayrıca 13.5 (Gunes *et al.* 1998) ve 16 (Thompson *et al.* 2000) günlük fare embriyosunda da ekspresyonlara rastlandığı rapor edilmektedir. Bizim çalışmamızda yer alan diğer evreler yani 12.5, 14.5, 15.5 günlük embriyolar ve yetişkin fare beyni (P56) sonuçları ise literatürle paralellik göstermektedir. Bu genin düzenleyici alt biriminde [glutamat sisteyin ligaz, düzenleyici alt birim (Gclm)] tüm embriyonik dönemler incelendiğinde karaciğerde ve böbrekte ifade edildiği, yetişkin beyinde ise yaygın ve orta şiddette bir ekspresyon olduğu bulundu.

Glutasyon sentetaz (Gss) için yapılan bir çalışmada 14.5 günlük fare embriyosunda yaygın ve genel bir ekspresyon olduğu rapor edilmiştir (Visel *et al.* 2007). Glutasyon sentetaz'ın (Gss) Visel *et al.* (2007) ve grubu tarafından yapılan 14.5 günlük fare embriyosu sonucunu çalışmalarımızda kullanılmış olup diğer evrelerde bulunan sonuçlarımızın ekspresyon yerleri açısından tam bir paralellik gösterdiği tespit edildi.

Glutasyon redüktaz (Gsr) incelediğimizde bu genin göz ve yetişkin farelerde merkezi sinir sisteminde ekspresyon olduğu belirtilmiştir (Blackshaw *et al.* 2004). Bizim sonuçlarımızda ise literatür verilerinin aksine embriyonik dönemlerde ekspresyona rastlanmadı. Ancak yetişkin fare beyinde kuvvetli ve yaygın olarak ekspresyon olduğu bulundu.

Glutamat'tan glutamin sentezinde rol alan glutamat-amonyak ligaz (glutamin sentetaz) (Glul) ile glutamin hidrolizleyerek glutamat ve amonyum iyonu elde edilmesi reaksiyonu katalizleyen glutaminaz (Gls), glutaminaz 2 (Gls2) enzimleri (David *et al.* 2005, Keha *et al.* 2005) bir izoenzim olup, Glul üzerinde yapılmış olan literatür sonuçlarında, bu genin bazı embriyonik ve yetişkin fare retinalarında (Blackshaw *et al.* 2004) ekspresyon olduğu belirtilmiştir. Başka bir imminohistokimyasal çalışmasında ise 2 aylık bazı fare organlar kullanılmış ve Glul'nun karaciğer, ince bağırsak, serabellum ve böbrek korteksinde ekspresyon olduğu görülmüştür (He *et al.* 2007). Bizim çalışmamızda ise bu genin retinada ekspresyonu yanında embriyonik dönemlerde birçok dokuda ekspresyon olduğu gözlemlendi. Bununla beraber yetişkin beyinde de yaygın ve kuvvetli bir şekilde ekspresyon olduğu görüldü.

Glutaminaz izoenzimlerinin ekspresyonu hakkında herhangi bir detaylı çalışmaya da literatürde rastlanmamıştır. Bizim sonuçlarımızda ise Gls1 tüm embriyonik dönemlerde bölgesel olarak ekspresyon olurken Gls2 sadece 14.5 günlük fare embriyosundaki kroid pleksusta ekspresyonu zayıf bir şekilde gözlemlendi. Beyinde ise iki izoenzimde bazı kısımlarda kuvvetli olmakla beraber geri kalan kısımlarda yaygın ve zayıf olarak ekspresyon olduğu tespit edildi.

Transaminasyon reaksiyonlarını katalizleyen enzimleri incelersek bu enzimler glutamat piruvat transaminaz 1 (Gpt1) ve glutamat piruvat transaminaz 2 (Gpt2) izoenzimleri ile glutamat-okzalasetat transaminaz 1 (Got1) ve glutamat-okzalasetat transaminaz 1 (Got2) izoenzimlerinden oluştuğu bulunmuştur (David *et al.* 2005; Keha *et al.* 2005). Gpt1 ve Gpt2 hakkında literatürde ekspresyonla ilgili herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Ancak bizim sonuçlarımız incelediğimizde Gpt1 12.5 günlük fare embriyosunda ekspresyon olmazken 14.5 ve 15.5 günlük fare embriyolarında merkezi sinir sistemi ile beraber akciğer, tükürük bezi ve cilt'de ekspresyon olurken P56 da yaygın ve orta şiddette bir ekspresyon gözlemlendi.

Gpt2 ise P56 evresinde kuvvetli ve yaygın, 12.5 günlük fare embriyosunda arka beyin boşluklarında, 14.5 ve 15.5 günlük fare embriyolarında ise talamusta orta şiddette, medulla ve spinal korda da kuvvetli olarak ekspresyon gösterdi.

Got1 ile yapılmış olan *in situ* hibridizasyon çalışmasında 14.5 günlük fare embriyosundaki ekspresyonu olduğu görülmüştür (Visel *et al.* 2004). Ayrıca yapılmış olan northern blot çalışmasında da 18 günlük fare embriyosu karaciğeri ve yeni doğmuş fare beyinde ekspresyon olduğu rapor edilmiştir (Lia *et al.* 1995). Biz'de Visel *et al.* (2004) ve grubu tarafından yapılan 14.5 günlük fare embriyosu sonucunu kullandık ve bu veriler ile 12.5 ve 15.5 günlük fare embriyosu ile P56'daki ekspresyon sonuçlarımızın hemen hemen aynı olduğunu tespit ettik.

Got2'de 16 günlük fare embriyosu ile P0/1, P2/3, P4/5 P6/7 postnatal fare evreleri retinasında ve postnatal 6 ait merkezi sinir sisteminde ile 16 günlük embriyonik

dönemlerinde yaygın olarak ekspresyon olmuştur (Blackshaw et al. 2004). Bizim sonuçlarımız bu sonuçlarla örtüşmekle beraber tüm evrelerde yaygın ve kuvvetli bir ekspresyon olduğunu göstermiştir.

Glutamat dehidrogenaz (Glud1) enzimi incelendiğinde, Glud1'in 14.5 günlük fare embriyosunda yaygın ve genel bir ekspresyon gösterdiği rapor edilmiştir (Visel *et al.* 2004). Bizim'de 14.5 günlük fare embriyosu sonucu olarak kullandığımız bu sonuç çalıştığımız 12.5 ve 15.5 günlük fare embriyolarındaki ekspresyon sonuçları ile paralellik gösterdi. P56 evresinde ise yaygın ve kuvvetli bir ekspresyon olduğu görüldü.

Ekspresyonlarını incelendiğimiz bir diğer gen grubu da; glutamat'dan 4-amino butirat oluşumunu katalizleyen glutamik asit dekarboksilaz 1 (Gad1), glutamik asit dekarboksilaz 2 (Gad2) izoenzimleri, 4-amino butirat'dan süksinat semialdehit sentezini katalizleyen-amino butirat aminotransferaz (Abat) ve süksinat semialdehit çıkarak süksinatın oluşumunu katalizleyen süksinat semialdehit, aldehit dehidrogenaz 5'ci ailesi, A1 alt ailesi (Aldh5a1)'dir. Bu enzimleri katalizlediği tüm reaksiyonlar çift yönlüdür (genome.jp). Literatürde Gad1 üzerinde yapılan *in situ* hibridizasyon çalışmasında, sırası ile 8.5 günlük embriyoda ekspresyon olmadığı, ekspresyonu 9.0 günlük fare embriyosundan itibaren başlayarak 9.0, 9.5, 10.5, 11.5 ve 12.5 günlük fare embriyolarında merkezi sinir sistemi, spinal kord da ekspresyon olduğu bulunmuştur (Maddox *et al.* 2001). Başka bir *in situ* çalışmasında ise çalışmada 10.5, 11.5 ve 12.5 günlük fare embriyoları üzerinde yapılmıştır. Bu çalışmada; Gad1 için 10.5 günlük fare embriyosu üzerinde yapılmış olan *in situ* hibridizasyon çalışmasında sinir sistemi, arka beyin, diensefalon'da ekspresyon olmasına karşın dorsal talamusta ve preoptik alanda ekspresyona rastlanmamıştır. Yine aynı şekilde telenkefalon'da ekspresyon var iken neokorteks, hipokampus, rinenkefalon, amigdala, septum ekspresyon görülmemiştir. Orta beyinde ekspresyon gözlemlenirken orta beyin içinde bulunan inferior ve superior colliculus'da ekspresyon olmamıştır. 11.5 günlük fare embriyosuna ait ekspresyonları incelediğimizde telenkefalon, sinir sistemi, arka beyin, diensefalon, orta beyin, spinal kord, nazal epitelyum, olfaktori epitelyum, serebellum da ekspresyon olmuştur. Ancak bu genel ekspresyon alanlarının detayına inerek hipotalamik anterior dorsal

nukleuslarda, supraoptic-paraventricular alanda, ventral tegmental alanda da ekspresyon gözlemlenmemiştir. 12.5'i incelersek ön beyin, telenkefalon, korpus striatum, pons, hipotalamus, talamus, orta beyin, medula, superior colliculus, retina, lens, nazal epitelyum, olfaktori epitelyum, serebellum, periferel sinir sistemi, bazı salgı bezlerin de ekspresyon olmasına karşın, inferior colliculus, anterior dorsal nukleuslarda, supraoptic-paraventricular alanda da ekspresyon olmamıştır (Katarova *et al.* 2000).Yapılmış olan northern blot çalışmasında ise Gad1'in 10.5, 11.5, 12.5, 13.5, 15.5, 18.5 günlük fare embriyolarına ait beyin dokuları ile posnatal 0 (P0) ve yetişkin beyninde ekspresyon olduğu görülmüştür (Szabo *et al.* 1994). Bizim yaptığımız çalışmalar incelenirse 12.5 günlük fare embriyosundaki ekspresyon sonucu Katarova *et al.*(2000) tarafından yapılmış olan çalışma ile örtüşmektedir. Diğer evrelerdeki sonuçlarda aynı 12.5'deki sonuç ile paralellik gösterdi. P56'da da yaygın ve kuvvetli bir ekspresyon vardı.

Gad2 için yapılmış olan ekspresyon analizleri incelendiğinde; 10.5 günlük fare embriyosunda telenkefalon, sinir sistemi, orta beyin, arka beyin, spinal kord, diensefalon ve nazal epitelyumda ekspresyon olurken, ventral hipotalamik alan, serebellum, inferior ve superior colliculus, neokorteks, hipokampus, rinenkefalon, amigdala, septum ekspresyon olmamıştır. 11.5 günlük fare embriyosunda telenkefalon, diensefalon, orta beyin, spinal kord, olfaktori epitelyum, nazal epitelyum da ekspresyon olmuştur. 12.5 günlük fare embriyosunu incelenirse ön beyin, telenkefalon, korpus striatum, pons, hipotalamus, talamus, orta beyin, medula, superior colliculus, retina lens, nazal epitelyum, olfaktori epitelyum, serebellum, periferel sinir sistemi, kalp, kan damarları, karaciğer, dorsal kök bezleri, mide, bağırsaklar, pankreas'ta ekspresyon olmuştur. (Katarova *et al.* 2000). Gad2 için yapılmış olan başka bir *in situ* hibridizasyon çalışmasında ise; Gad 2'nin ön beyin ve hippokampusta ekspresyon olduğu rapor edilmektedir (Aguado *et al.* 2003). Bizimde 14.5 günlük fare embriyosu sonucu olarak kullandığımız başka bir çalışmada ise Gad2'nin 14.5 günlük fare embriyosunda, merkezi sinir sisteminde, karaciğerde, kalp ve birçok dokuda ekspresyon olduğu rapor edilmiştir (Visel *et al.* 2004; Visel *et al.* 2007). Bizim sonuçlarımızda aynı şekilde genel olarak merkezi sinir sisteminde ekspresyon oldu. Bu nedenle bu çalışmalarla örtüşmektedir.

Abat ve Aldh5a1 genleri hakkında her hangi bir literatüre rastlanmamıştır. Bizim sonuçlarımızda ise Abat yetişkin fare beyinde yaygın ve kuvvetli diğer evrelerde ise bölgesel olarak ekspresyon olmuştur. Aldh5a1 ise P56 ekspresyonu aynı Abat gibi oldu. 12.5 günlük fare embriyosunda ekspresyona rastlanmadı. Diğer iki evrede ise paralel bir yaygın ve orta şiddette ekspresyon gözlemlendi.

Karbomoil fosfat sentezini katalizleyen karbomoil fosfat sentetaz 2 aspartat transkarbomoilaz, dihidroorotaz (Cad) ve karbomoil fosfat sentetaz 1(Cps1) genlerini inceleyerek; bunlardan birincisi karbomoil fosfat sentetaz 1 (Cps1) 15 günlük farenin karaciğerinde ekspresyon olmaya başlar ve doğum sonrası 2 haftalık olana kadar bu ekspresyondaki gelişme devam ettiği rapor edilmiştir (Shiojiri *et al.* 1998). Bizim çalışmamızda ortaya çıkan ekspresyon sonuçlarında ise 12.5 günlük fare embriyosunda ekspresyona rastlanmaz iken 14.5 ve 15.5 günlük fare embriyolarında karaciğere, bağırsaklarda ekspresyon olduğu görüldü. P56'da ise sadece serebellumda ekspresyon olduğu belirlendi. Cad ile ilgili de herhangi bir ekspresyon çalışmasına literatürde rastlanmamıştır. Bizim sonuçlarımızda ise 12.5 günlük fare embriyosunda neokorteks, hipokampus, karaciğer ve böbrekte ekspresyon olurken 14.5 ve 15.5 günlük fare embriyolarındaki ekspresyonlarda benzer olmakla beraber dil, diş, tükürük bezi, salgı bezleri, bağırsaklarda ekspresyon oldu. P56'da ise sadece serebellumda ekspresyon olduğu görüldü.

L-glutaminden N-asetil D-glukozamin sentezlenmesinde görev alan glutamin fruktoz-6-fosfat transaminaz 1 (Gfpt1), glukozamin-fosfat N-asetiltransferaz (Gnpnat1) ve N-asetilglukozamin kinaz (Nagk) enzim genleri incelenirse. Bu genler; literatürde Gfpt1 fare arka ayak kaslarında kuvvetli, kalp, beyin, karaciğer, akciğer, bağırsaklar, dalak ve yağ dokularında zayıf ekspresyon olduğu northern blot analizi ile belirlenmiştir (Dehaven *et al.* 2001). Bizim sonuçlarımızda ise 12.5 günlük fare embriyosunda ekspresyon olmaz iken 14.5 ve 15.5 günlük fare embriyolarında bölgesel olarak ekspresyon gösterdi. P56'da olafaktori soğancığı ve hipokampusta ekspresyon gösterdi.

Gnpnat1 üzerinde yapılmış olan *in situ* hibridizasyonda çalışmalarında, 12.5 fare embriyosunda yaygın, 14.5 de bölgesel olarak, 16.5 günlük fare embriyosunda sadece kemiklerde, yeni doğmuş fare embriyosunda ön ayaklarda ancak ayak kasları hariç ekspresyon olduğu görülmüştür (Boehmelt *et al.* 2000). Bizim *in situ* hibridizasyon sonuçlarımızda ise P56'da sadece serebellumda ekspresyon olurken, 12.5 günlük fare embriyosunda literatürün aksine ekspresyon gözlemlenmedi. Diğer evrelerde ise bölgesel olarak ekspresyon oldu.

Nagk üzerinde yapılmış olan northern blot çalışmasında yetişkin fare beyini, dalak ve iskelet kasında zayıf olarak; böbrek, kalp, karaciğer, akciğer ve testisler kuvvetli bir şekilde ekspresyon olmuştur. Bu çalışma içinde incelenen embriyonik evrelerden E7'de çok kuvvetli, diğer bakılan üç evrede (11.0, 15.0, 17.0) zayıf olarak ekspresyon oldukları gözlemlenmiştir (Hinderlich *et al.* 2000). Bizim sonuçlarımızda ise 12.5de arka beyinde ekspresyon olması ile beraber 14.5, 15.5ve P56'da yaygın ve kuvvetli bir ekspresyon olduğu görüldü.

Son olarak, glutamat metabolizması içinde çok önemli reaksiyonları katalizleyen ancak literatürde herhangi bir ekspresyon çalışmasına rastlanmayan diğer genleri incelersek; glutamattan L- glutamil tRNA sentezini reaksiyonlarını katalizleyen glutamil-pirolin-tRNA sentetaz (Eprs) ve glutamil-pirolin-tRNA sentetaz 2 (Ears2) genlerinden Ears2 yetişkin beyinde sadece olfaktori soğancığı ve hipokampusta ekspresyon olurken embriyonik evrelerde her hangi bir ekspresyon gözlemlenmedi. Eprs ise tüm evrelerde kuvvetli ve yaygın olarak ekspresyon olduğu bulundu. L-1 pirolin – 5 karbolsilazın sentezini katalizleyen aldehit dehidrogenaz 4'cü aile, A1 üyesi (Aldh4a1) genini bakarsak embriyonik dönemlerde karaciğer ve böbrekte ekspresyon olurken P56'da orta şiddette ve yaygın olarak ekspresyonuna rastlandı. Glutamil-tRNA sentetaz (Qars)'da tüm evrelerde kuvvetli bir şekilde ekspresyon olduğu görüldü. Glutamat metabolizması için de glutamindeki amino grubunu ksantin 5'-fosfatta aktararak guanin monofosfat oluşumunu katalizleyen guanin monofosfat sentetaz (Gmps)'da tüm evrelerde kuvvetli bir şekilde ekspresyon olduğu belirlendi. Glutaminde bulunan amino grubunu deamino-NAD⁺ üzerine aktararak NAD⁺ oluşumunu katalizleyen NAD sentetaz 1 (Nadsyn1) geni

embriyonik dönemlerde ekspresyon olmazken P56'da ise olfaktori soğancığı, hipokampus ve serebellumda ekspresyon olduğu görüldü. 5-fosfo-beta-D-ribozilamin ve L-glutamatan çıkarak L-glutamil amin ve 5-fosfo-alfa-D-riboz 1 difosfatat'ın sentezi veya tersi yöndeki reaksiyonu katalizleyen fosforibozil pirofosfat amidotransferaz (Ppat)'da 12.5 günlük fare embriyosunda ekspresyon olmazken 14.5 ve 15.5 günlük fare embriyolarında ise karaciğer, akciğer, pankreas, dalak, neokorteks ve kroid pleksus'ta ekspresyon olduğu belirlendi. P56 ise ekspresyon gözlemlenmedi.

Sonuç olarak; bu tez kapsamında aşağıdaki bulgular elde edilmiştir.

1. Glutamat metabolizmasında bulunan enzimlere ait izoenzim genleri bulundu ve bunlar için spesifik primerleri dizayn edildi.
2. Bu primerler ile cDNA probları ve bu problar ile antisens mRNA'lar üretildi.
3. *In situ* hibridizasyon tekniğı ile bu genler için ekspresyon analizi yapıldı.
4. Ekspresyon sonuçları taranarak bilgisayar ortamına aktarıldı.
5. 12.5, 14.5, 15,5 günlük fare embriyoları ve yetişkin beyini (P56)'da bulunan glutamat metabolizması genlerinin mRNA düzeyinde nerede ekspresyon oldukları tespit edildi.

KAYNAKLAR

- Aguado, F., Carmona, M.A., Pozas, E., Aguilo, A., Martinez-Guijarro, F.J., Alcantara, S., Borrell, V., Yuste, R., Ibanez, C.F., Soriano, E., 2003. BDNF regulates spontaneous correlated activity at early developmental stages by increasing synaptogenesis and expression of the K⁺/Cl⁻ co-transporter KCC2. *Development*, 130(7), 1267-80
- 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.
- Archibald, S.P., 2002. Functional genomics in the mouse. *Funct Integr Genomics*, 2, 81-91
- Blackshaw, S., Harpavat, S., Trimarchi, J., Cai, L., Huang, H., Kuo, W.P., Weber, G., Lee, K., Fraioli, R.E., Cho, S.H., Yung, R., Asch, E., Ohno-Machado, L., Wong, W.H., Cepko, C.L., 2004. Genomic analysis of mouse retinal development. *PLoS Biology*, 2(9), E247
- Boehmelt, G., Fialka, I., Brothers, G., McGinley, M.D., Patterson, S.D., Mo, R., Hui, C.C., Chung, S., Huber LA, Mak TW, Iscove NN, 2000. Cloning and characterization of the murine glucosamine-6-phosphate acetyltransferase EMeg32. Differential expression and intracellular membrane association., *Journal of Biological Chemistry*, 275(17), 12821-32
- DeHaven, J.E., Robinson, K.A., Nelson, B.A., Buse, M.G., 2001. A Novel Variant of Glutamine: Fructose-6-Phosphate Amidotransferase-1 (GFAT1) mRNA Is Selectively Expressed in Striated Muscle. *Diabetes*, 50(11), 2419-24
- Diaz, E., Yang, Y.H., Ferreira, T., Loh, K.C., Okazaki, Y., Hayashizaki, Y., Tessier-Lavigne, M., Speed, T.P., Ngai, J., 2003. Analysis of gene expression in the developing mouse retina. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(9), 5491-5496
- Discala, C., Ninnin, M., Achard, F., Barillot, E., Vaysseix, G., 1999. DBcat: a catalog of biological databases. *Nucleic Acids Research*, 27(1), 10-11.
- Friedman, A., Perrimon, N., 2007. Genetic screening for signal transduction in the era of network biology. *Cell*, 128, 225-231.
- Gassen, H.G., Schrimpf, G., 1999. *Gentechnische Methoden: Eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Labor*, 2.Auflage, s.295-332, Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg-Berlin.
- Gunes, C., Heuchel, R., Georgiev, O., Muller, K.H., Lichtlen, P., Bluthmann, H., Marino, S., Aguzzi, A., Schaffner, W., 1998. Embryonic lethality and liver degeneration in mice lacking the metal-responsive transcriptional activator MTF-1. *EMBO Journal*, 17(10), 2846-2854
- Gupta, M., Hogema, B.M., Grompe, M., Bottiglieri, T.G., Concas, A., Biggio, G., Sogliano, C., Rigamonti, A.E., Pearl, P.L., Snead, O.C. Jakobs, C., Gibson, K.M., Murine succinate semialdehyde dehydrogenase deficiency., *Annals of Neurology*, 54 Suppl 6, S81-90

- He, Y., Hakvoort, T.B., Vermeulen, J.L., Lamers, W.H., Van Roon, M.A., 2007. Glutamine synthetase is essential in early mouse embryogenesis. *Developmental Dynamics*, 236(7),1865-1875
- 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
- Hinderlich, S., Berger, M., Schwarzkopf, M., Effertz, K., Reutter, W, 2000. Molecular cloning and characterization of murine and human N-acetylglucosamine kinase. *Journal of Biological Chemistry*, 267(11), 3301-3308
- Jadhao, S.B., Yang, R.Z., Lin, Q., Hu, H., Anania, F.A., Shuldiner, A.R., Gong, D.W., 2004. Murine alanine aminotransferase: cDNA cloning, functional expression, and differential gene regulation in mouse fatty liver. *Hepatology*, 39(5), 1297-1302
- Katarova, Z., Sekerkova, G., Prodan, S., Mugnaini, E., Szabo, G., 2000. Domain-restricted expression of two glutamic acid decarboxylase genes in midgestation mouse embryos. *The Journal of Comparative Neurology*, 424(4), 607-627
- Keha, E.E., Küfrevioğlu, Ö.İ., 2004. *Biyokimya, Aktif Yayınevi, Erzurum.*
- Klug, W.S., Cummings R.M et al. 2002,. *Genetik Kavramalar (Çeviri: C. Öner) Palme yayıncılık*
- Krieg, P.A., Melton, D.A., 1987. In vitro RNA synthesis with SP6 RNA polymerase *Methods Enzymol* 155, 397-415.
- Lehninger, A.L., Nelson, D.L., Cox, M.M., 2005. *Principles of Biochemistry*, 4th edition, pp 521-600, Worth Publishers, Inc., New York.
- Lewin, B., 2004. *Genes VIII*, pearson Education inc. S. 1-545
- Lia, M., Barouki, R., Waelsch, S.G., 1995. Chromosomal deletions around the albino locus in the mouse cause loss of hormone-inducible expression of the unlinked structural gene encoding cytosolic aspartate aminotransferase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(3),788-90
- Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S.L., Matsudaira, P., Baltimore, D., Darnell, J., 2001. *Molecular Cell Biology*, 4nd edition, pp.248-251, W.H. Freeman and Company, New York.
- Maddox, D.M., Condie, B.G., 2001. Dynamic expression of a glutamate decarboxylase gene in multiple non-neural tissues during mouse development. *BMC Developmental Biology*, 1(1), 1
- McCauley, R., Kong, S., Heel, K., Hall, J.C., 1999. The role of glutaminase in the small intestine. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 31, 405-413
- Misra, I., Griffith, O.W., 1998. Expression and purification of human γ -glutamylcysteine synthetase. *Protein Expression and Purification*. 13, 268-276.
- Niehrs, C., Pollet, N., 1999. Synexpression groups in eukaryotes. *Nature*, 402, 483-487.
- Reymond, A., Marigo, V., Yaylaoglu, M. B., Leoni, A., Ucla, C., Scamuffa, N.,Caccioppoli, C., Dermitzakis, E. T., Lyle, R., Banfi, S., 2002. Human chromosome 21 gene expression atlas in the mouse. *Nature*, 420, 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.
- Sauer, S.W., Kolker, S., Hoffmann, G.F., Ten-Brink, H.J., Jakobs, C., Gibson, K.M., Okun, J.G., 2007. Enzymatic and metabolic evidence for a region specific mitochondrial dysfunction in brains of murine succinic semialdehyde dehydrogenase deficiency (Aldh5a1^{-/-} mice)., *Neurochemistry International*, 50(4), 653-659
- Shiojiri, N., Wada, J., Gebhardt, R., 1998. Heterogeneous carbamoylphosphate synthetase I expression in testicular transplants of fetal mouse liver. *European Journal of Cell Biology*, 75(4), 389-92
- Smith, T.J., Peterson, P.E., Schmidt, T., Fang, J., Stanley, C.A., 2001. Structures of bovine glutamate dehydrogenase complexes elucidate the mechanism of purine regulation. *Journal of molecular Biology*, 307(2), 707-720.
- Szabo, G., Katarova, Z., Greenspan, R., 1994. Distinct protein forms are produced from alternatively spliced bicistronic glutamic acid decarboxylase mRNAs during development. *Molecular Cell Biology*, 14(11), 7535-45
- Thompson, S.A., White, C.C., Krejsa, C.M., Eaton, D.L., Kavanagh, T.J., 2000. Modulation of glutathione and glutamate-L-cysteine ligase by methylmercury during mouse development. *Toxicological Science*, 57(1), 141-146
- Turner, P.C., McLennan, A.G., Bates, A.D.O., 2004. White, M.R.H., *Molecular biology instant notes*, 2sn. Edition, Nobel yayın.
- 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
- Visel, A., Carson, J., Oldekamp, J., Warnecke, M., Jakubcaková, V., Zhou, X., Shaw, C.A., Alvarez-Bolado, G., Eichele, G., 2007. Regulatory pathways analysis by high-throughput in Situ hybridization. *Plos Genetics*, 3(10), 1867-1883
- Yang, Y., Dieter, M.Z., Chen, Y., Shertzer, H.G., Nebert, D.W., Dalton, T.P., 2002, Initial characterization of the glutamate-cysteine ligase modifier subunit Gelm^(-/-) knockout mouse. Novel model system for a severely compromised oxidative stress response. *Journal of Biological Chemistry*, 277(51), 49446-49452.

www.genome.jp

ÖZGEÇMİŞ

1979 yılında Ağrı, Taşlıçay'da doğdu. İlk ve orta öğrenimini Ağrı'da tamamladı. 1997 yılında girdiği Atatürk Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü'nden 2001 yılında mezun oldu. Ekim 2001'de Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans öğrenimime başladı ve 2004'de yüksek lisans eğitimimi bittirerek doktora eğitimime başladı ve halen doktora eğitimimi sürdürmektedir. Yüksek lisans ve doktora laboratuvar çalışmaları için 01.01.2004 ile 31.08.2007 tarihleri arasında Deneysel Endokrinoloji Bölümünde (01.01.2004-01.06.2006-Hannover) ve Max-Planck Enstitüsü, Gen ve davranışı Bölümü (01.06.2006-31.08.2007-Göttingen) bulundu.

Atatürk Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümünde 01.01.2003 tarihinden itibaren Araştırma Görevlisi olarak çalışmaktadır. Evli ve iki çocuk babasıdır.

Murat ÇANKAYA