



**T.C.**  
**TOKAT GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KLOTHO PROTEİNİNİN NHEJ TAMİR YOLAĞINDAKİ**  
**KU70, KU80 VE DNA-PK GENLERİNİN İFADESİ**  
**VE PROTEİNLERİNİN İŞLEYİŞİ ÜZERİNE**  
**ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Hazırlayan**

**Sibel DEMİR ÖZTÜRK**

**Tıbbi Biyoloji Ana Bilim Dalı**

**Doktora Tezi**

**Danışman**

**Doç. Dr. Aydın RÜSTEMOĞLU**

**TOKAT – 2019**



**T.C.**  
**TOKAT GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KLOTHO PROTEİNİNİN NHEJ TAMİR YOLAĞINDAKİ**  
**KU70, KU80 VE DNA-PK GENLERİNİN İFADESİ**  
**VE PROTEİNLERİNİN İŞLEYİŞİ ÜZERİNE**  
**ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Hazırlayan**

**Sibel DEMİR ÖZTÜRK**

**Tıbbi Biyoloji Ana Bilim Dalı**

**Doktora Tezi**

**Danışman**

**Doç. Dr. Aydın RÜSTEMOĞLU**

**TOKAT – 2019**

Klotho'nun NHEJ Yolağında Ku70,Ku80 ve DNA-PK Genlerinin İfadesi  
ve Proteinlerinin İşleyişi Üzerine Etkilerinin Araştırılması

Tezin Kabul Ediliş Tarihi: 09 / 08 / 2019

Jüri Üyeleri (Unvanı, Adı Soyadı)

Başkan : Prof.Dr.H.Ömer ATEŞ

Üye : Doç.Dr.Akın TEKCAN

Üye : Doç.Dr.Aydın RÜSTEMOĞLU

Üye : Doç.Dr.Nevin KARAKUŞ

Üye : Doç.Dr.Serbülent YİĞİT

İmzası ,

.....  
.....  
.....  
.....  
.....

Bu tez, Gaziosmanpaşa Üniversitesi Sağlık Bilimler Enstitüsü Yönetim Kurulunun 18 / 07 / 2019 tarih ve 14 / 07 sayılı oturumunda belirlenen jüri tarafından kabul edilmiştir.

Enstitü Müdürü: Doç.Dr.Fikret GEVREK



**T.C.**  
**TOKAT GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLER ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE**

Bu belge ile bu tezdeki bütün bilgilerin akademik kurallara ve etik ilkelere uygun olarak toplanıp sunulduğunu, bu kural ve ilkelerin gereği olarak, çalışmada bana ait olmayan tüm veri, düşünce ve sonuçlara atıf yaptığımı ve kaynağını gösterdiğimi beyan ederim.

(09/08/2019)

Tezi Hazırlayan Öğrencinin

Adı ve Soyadı

Sibel DEMİR ÖZTÜRK

İmzası

.....

## ÖNSÖZ

Eğitimim boyunca ilgi ve desteğini gördüğüm, tezimin hazırlık ve çalışma aşamalarında yardımlarını esirgemeyen, değerli Danışman Hocam **Doç. Dr. Aydın RÜSTEMOĞLU'na**

Doktora eğitimim boyunca yaptıkları bilimsel ve akademik katkılardan dolayı Anabilim Dalı Hocalarımız, **Prof. Dr. H. Ömer ATEŞ, Doç. Dr. Nevin KARAKUŞ** ve **Doç. Dr. Serbüent YİĞİT'e** saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Tezimde yer alan hücrelerin sağlanmasında katkısı olan Marmara Üniversitesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalından, Sayın **Doç. Dr. Betül KARADEMİR'e**

Doktora eğitimim boyunca bana gösterdiği yardımdan dolayı **Arş. Gör. Nihan BOZKURT, Arş. Gör. Saime SEZER SONDAŞ** ve **Arş. Gör. Emel ÖZSOY'a,**

Doktora eğitimim süresince aynı çalışma ortamını paylaştığım ve birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum **arkadaşlarıma,**

Hayatımın her aşamasında bana desteğini esirgemeyen ve hep yanımda olan eşi olmaktan gurur duyduğum **Erkan ÖZTÜRK'e,**

Yanımda bana bütün sıkıntılarımı unutturan biricik oğlum **Mert ÖZTÜRK** ve **Ateş ÖZTÜRK'e,**

**Sonsuz teşekkürlerimi sunarım...**

## ÖZET

### **KLOTHO PROTEİNİNİN NHEJ TAMİR YOLAĞINDAKİ KU70, KU80 VE DNA-PK GENLERİNİN İFADESİ VE PROTEİNLERİNİN İŞLEYİŞİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Yaşlanma, zaman içerisinde canlının çevre ile olan ilişkilerinde dengelerinin çevre lehine sonuçlandığı bir süreçtir. Bu sürecin ilerleyiş hızı canlının çevre ile olan etkileşimi ve kendi kalıtsal özelliklerine bağlı olarak değişir. Bu çalışmamızda, yaşlanma ile ilgili olduğu saptanan genetik faktörlerden Klotho ( *Kl* ) geni ele alınmıştır. Klotho geni ilk kez farelerde tanımlanan, insanda 13. kromozomun q kolunda yer alan ve plazma membranında ve golgi aparatında bulunan tip 1 tek geçişli transmembran glikoproteinini kodlayan bir gendir. Klotho'nun hücre içi moleküler mekanizmaları nasıl etkilediğine yönelik bazı çalışmalar bulunsa da, özellikle yaşlanma sürecinde de etkisi bilinen DNA çift zincir kırıklarının (DSB) onarım mekanizmalarında rolü aydınlatılamamıştır. Bu çalışmada Klotho'nun DSB onarımında görevli, özellikle de Homolog Olmayan Uç Birleştirme (NHEJ) onarımında görevli bazı genlerin ifadesini nasıl etkilediğini araştırmayı amaçladık.

Çalışmada fare hipokampal kökenli hücre serisi olan HT22 hücreleri kullanılmıştır. DNA'da çift zincir kırığı oluşturduğu bilinen Endosülfan ile öncelikle IC50 dozu belirlenmiş, daha sonra bu doz kullanılarak farklı deney protokollerinde muamele edilen HT22 hücrelerinden RNA ve protein izolasyonu yapılmıştır. Elde edilen total RNA'dan cDNA oluşturulmuş ve daha sonra Ku70, Ku80, DNA-PK genlerinin ifadelerindeki değişimler RT-PCR ile belirlenmiştir. Protein seviyesindeki değişimler Western Blotlama yöntemleri ile belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar çalışılan genlerin ekspresyon seviyelerinin sadece endosülfanla muamele edilen hücrelerde önemli ölçüde yükseldiğini, ama Klotho proteini de verilen hücrelerde yükselişin olmadığını göstermiştir. Bu sonuçlar, Klotho'nun Endosülfanın zararlı etkisini minimize ettiğini ve NHEJ yolağını baskıladığını düşündürmektedir. Böylece literatürde ilk defa Klotho proteininin NHEJ tamir yolağındaki rolü araştırılmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Yaşlanma, Klotho, NHEJ, HT22, Endosülfan

## ABSTRACT

### THE INVESTIGATION OF EFFECT OF THE KLOTHO PROTEIN ON THE EXPRESSION OF NHEJ REPAIR PATHWAY GENES KU70, KU80 AND DNA-PK AND ON THE WORKING OF THEIR PROTEINS

Aging is a process in which the balance of the organism's relations with the environment over time results in favor of the environment. The rate of progress of this process depends on the interaction of the organism with the environment and its inherited characteristics. In this study the Klotho (Kl) gene, which is one of the genetic factors associated with aging was discussed. The Klotho gene, which first described in the mice located in the q-arm of chromosome 13 in the human, and encodes the type 1 single-pass transmembrane glycoprotein located in the Golgi apparatus. Although there are some studies suggesting how Klotho affects intracellular molecular mechanisms, the role of this protein on the DNA double strand breakage (DSB) repair mechanisms, which are also known to have an effect on the aging process, cannot be elucidate yet. In this study, we aimed to investigate how Klotho affects the expression of some genes, especially known to work in the non-homologous end joint (NHEJ) repair, one of the repair mechanisms in the DNA DSB repair.

In the study, the mouse hippocampal cell lines HT22 cells were used. First, the IC50 dose of Endosulfan, which is known to produce double-chain fracture in DNA, was determined. Then, using this dose the HT22 cells were treated in different experimental protocols, and finally RNA and protein isolation was performed in those cells. From obtained total RNAs the cDNAs were generated, and then changes in the expressions of the Ku70, Ku80 and DNA-PK genes were determined by RT-PCR. Changes in protein level were determined by Western Blotting methods. The results showed that the expression levels of studied genes increased significantly only in endosulfan-treated cells, but was not increased in the cells which also treated with Klotho protein. These results suggest that Klotho minimizes the harmful effect of Endosulfan and suppresses the NHEJ pathway. Thus, for the first time in the literature, the role of Klotho protein in the NHEJ repair pathway was investigated.

**Key Words:** Aging, Klotho, NHEJ, HT22, Endosulfan

## İÇİNDEKİLER

ETİK SÖZLEŞME	i
ÖNSÖZ	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
<b>İÇİNDEKİLER</b>	<b>v</b>
TABLO LİSTESİ	viii
ŞEKİL LİSTESİ	ix
KISALTMA VE SİMGE LİSTESİ	xi
<b>1. GİRİŞ VE AMAÇ.....</b>	<b>1</b>
<b>2. GENEL BİLGİLER.....</b>	<b>4</b>
2.1.YAŞLANMA (AGİNG).....	4
2.1.1. Yaşlanma Tanımı.....	4
2.1.2.Yaşlılığın Genel Özellikleri .....	4
2.1.3.Yaşlılığın Sınıflandırılması.....	5
2.1.4.Yaşlılığın Organizmaya Etkileri .....	5
2.1.5.Yaşlılık Epidemiyolojisi.....	6
2.1.6. Yaşlanma Mekanizmaları.....	6
2.1.6.1.İmmünolojik Yaşlanma Teorisi.....	7
2.1.6.2.Telomer Hipotezi.....	7
2.1.6.3. Serbest Radikaller Teorisi.....	8
2.1.6.4. Çevresel Faktörler ve Kalori Kısıtlaması .....	9
2.1.6.5. DNA Hasarı .....	10
2.1.6.6. Yaşlanma ve Apoptoz.....	11



2.2. YAŞLANMA GENETİĞİ.....	12
2.3. ANTİ-AGİNG VE ANTİ-AGİNG GENLER.....	19
2.3.1.AMPK (Adenozin Monofosfata Bağımlı Protein Kinaz).....	19
2.3.2. Sirtuinler.....	20
2.3.3. Antiaging Gen Klotho.....	21
2.4. DNA TAMİRİ VE YAŞLANMA.....	31
2.4.1.Homolog Rekombinasyon (HR).....	33
2.4.2.Homolog Olmayan Uç Birleştirme (NHEJ).....	34
<b>3. GEREÇ VE YÖNTEM.....</b>	<b>41</b>
3.1. ÇALIŞMADA KULLANILAN ARAÇ VE GEREÇLER.....	41
3.2. ÇALIŞMADA KULLANILAN KİMYASALLAR VE ÇÖZELTİLER.....	42
3.2.1. Hücre Kültüründe Kullanılan Kimyasallar.....	42
3.2.2. mRNA Ekspresyonu Saptanmasında Kullanılan Kimyasallar .....	43
3.2.3. Protein Ekspresyonu Saptanmasında Kullanılan Kimyasallar.....	43
3.3. YÖNTEM.....	44
3.3.1. Hücre Kültürü .....	44
3.3.1.1. Hücre Kültürü Yönteminin Temel Aşamaları.....	44
3.3.1.2 HT22 Hücre Serisi.....	47
3.3.1.3. Hücre Kültürü Medyumunun Hazırlanışı.....	49
3.3.1.4. Hücrelerin Çözdürülmesi ve Ekimi.....	49
3.3.1.5.Hücrelerin Beslenmesi.....	49
3.3.1.6. Hücrelerin Pasajlanması (Subculturing) .....	50
3.3.1.7. Canlı Hücrelerin Mikroskopta Sayılması .....	50
3.3.1.8. Hücrelerin Dondurulması ve Saklanması.....	51
3.3.1.9.Sitotoksite Testleri.....	52

3.3.1.10. Toksisite Değerlendirmesi İçin XTT Metodu .....	53
3.3.1.11. Endosülfan Dozunun Belirlenmesi .....	53
3.3.1.12. Klotho ve Endosülfan Uygulamaları.....	56
3.3.2. Gen Ekspresyon Deneylei.....	57
3.3.2.1 Revers Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR).....	58
3.3.2.2. GeneAll Hybrid –R <sup>TM</sup> RNA Kiti ile RNA izolasyonu.....	60
3.3.2.3. RT-PCR master mix ile cDNA Eldesi.....	61
3.3.2.4. Realtime Revers Transkriptaz RT–PCR ile Gen Ekspresyonu Analizi .....	62
3.3.3. Western Blot ve Protein Ekspresyonu Deneylei.....	64
3.3.3.1. Western Blot.....	64
3.3.3.2. Protein izolasyonu.....	65
3.3.3.3. Protein Miktarı Ölçümü.....	65
3.3.3.4. Protein Örneklerinin Hazırlanması .....	66
<b>4. BULGULAR.....</b>	<b>67</b>
<b>5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....</b>	<b>79</b>
<b>6. KAYNAKLAR.....</b>	<b>90</b>
<b>7. ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>118</b>

## TABLO LİSTESİ

Tablo 2.1:Klotho Gen ve Proteinin İnsan ve Rodentler Arasında Karşılaştırılması	22
Tablo 3.1:Yaygın Olarak Kullanılan Nöronal Hücre Serileri	47
Tablo 3.2: HT22 Hücre Serilerinde Endosülfan Konsantrasyonlarının Sitotoksik Etkisi	55
Tablo 3.3: Araştırma Grupları ve Yapılan Uygulamalar	57
Tablo 3.4: cDNA Sentez Karışımı	62
Tablo 3.5: Real-Time PCR Bileşen ve Miktarları	62
Tablo 3.6: Çalışmada Kullanılan Primerler	63
Tablo 3.7: Çalışmada Kullanılan Proteinler ve Molekül Ağırlıkları	65
Tablo 3.8: Protein Örneklerinin Hazırlanması	66
Tablo 4.1: HT 22 Hücre Serisinde Endosülfan Konsantrasyonlarının Elisa Sonuçları ve Sitotoksite Oranları	68
Tablo 4.2: Moleküler Analizi Yapılan Genlerin RT-PCR Ortalama C <sub>t</sub> Sonuçları	69
Tablo 4.3: Moleküler Analizi Yapılan Genlerin RT-PCR 2 <sup>-ΔΔC<sub>t</sub></sup> Sonuçları	70
Tablo 4.4: Moleküler Analizi Yapılan Proteinlerin % Bant Yoğunluğu	73

## ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1:DNA Hasarı ve Onarım Mekanizmaları	10
Şekil 2.2:Yaşlanma ve Genetik Arasındaki İlişki	13
Şekil 2.3:Farklı Canlılarda Yaşlanma Mekanizması	15
Şekil 2.4:İnsan KL Geni	23
Şekil 2.5:İnsan KL Geni Üzerinden Alternatif İşlenme Sonucu Kodlanan Membran Bağlı Kl Proteini ve Salgılanan Kl Proteini Yapısı	24
Şekil 2.6:Farklı Klotho Formları ve Oluşumları	25
Şekil 2.7:KL İle İlişkili Beyin Bölgeleri ve KL Proteinleri, Beynin Nöronal ve Nöronal Olmayan Bölgelerinde Etkisi	27
Şekil 2.8:Klotho Proteininin Hücre İçi Sinyal Yolaklarına Katılımının Şematik Görünümü	28
Şekil 2.9:DSB Onarım Yolu Seçimi	33
Şekil 2.10:Homolog Olmayan Uç Birleştirme (NHEJ) Mekanizması	35
Şekil 2.11:DNA-PKcs Proteini İçinde Fosforilasyon Bölgeleri	39
Şekil 3.1:HT22 Hücre Serisini Morfolojik Görüntüsü	48
Şekil 3.2:Endosülfanın İnsan Hastalıkları ile İlişkisi	54
Şekil 4.1: HT22 Hücre Serisinde Endosülfan Dozlarının Uygulama Öncesi ve Sonrası Mikroskop (10X) Görüntüsü	67
Şekil 4.2:HT 22 Hücre Serisinde Uygulanan Endosülfan Dozlarının Sitotoksite Oranlarının Karşılaştırılması	69
Şekil 4.3:Klotho mRNA Ekspresyonu	70
Şekil 4.4:Ku 70 mRNA Ekspresyonu	71
Şekil 4.5:Ku 80 mRNA Ekspresyonu	71

Şekil 4.6:DNA-PK mRNA Ekspresyonu	72
Şekil 4.7:Klotho Proteininin İfade Düzeyi	73
Şekil 4.8:Klotho İfadesinin % Olarak Değerlendirilmesi	74
Şekil 4.9:Ku70 ve pKu70 Protein İfade Düzeyi	75
Şekil 4.10:Ku70 ve pKu70 Protein İfadesinin % Olarak Değerlendirilmesi	75
Şekil 4.11:Ku80 Protein İfade Düzeyi	76
Şekil 4.12:Ku80 Proteinin İfadesinin % Olarak Değerlendirilmesi	76
Şekil 4.13:DNA-PK ve pDNA-PK Protein İfade Düzeyi	77
Şekil 4.14:DNA-PKve pDNA-PK Protein İfadesinin % Olarak Değerlendirilmesi	78

## KISALTMA VE SİMGE LİSTESİ

<b>AD</b>	: Alzheimer Hastalığı
<b>ADAM 10/17</b>	: Disintegrin Metalloproteinaz Domain İçeren Protein
<b>AMPK</b>	: Adenozin Monofosfata Bağımlı Protein Kinaz
<b>ATM</b>	: Ataksi Telanjiektazi Mutant
<b>ATR</b>	: ATM ve Rad3-ilişkili Kinaz
<b>ATP</b>	: Adenozin Tri Fosfat
<b>BACE1</b>	: $\beta$ -sekretaz $\beta$ -APP Yarma Enzimi 1
<b>BAX</b>	: Bcl-2 ile ilgili X proteini
<b>BCL</b>	: B hücreli lenfoma
<b>Bç</b>	: Baz çifti
<b>BSA</b>	: Sığır Serum Albümin
<b>cDNA</b>	: Tamamlayıcı deoksiribonükleik asit
<b>CNS</b>	: Merkezi Sinir Sistemi
<b>CO<sub>2</sub></b>	: Karbondioksit
<b>° C</b>	: Santigrat Derece
<b>C<sub>T</sub></b>	: Döngü Eşik Değeri
<b>CR</b>	: Kalori Kısıtlaması
<b>Dk</b>	: Dakika
<b>DMEM</b>	: Dulbecco's Modified Eagle Medium
<b>DMSO</b>	: Dimetil Sülfoksit
<b>DNA</b>	: Deoksiribonükleik Asit
<b>DNA-PK</b>	: DNA Bağımlı Protein Kinaz
<b>DNA-PKcs</b>	: DNA Bağımlı Protein Kinaz Katalitik Altünite

<b>DSB</b>	: DNA Çift zincir Kırığı
<b>DSÖ</b>	: Dünya Sağlık Örgütü
<b>dsDNA</b>	: Çift iplikli DNA
<b>E / ES</b>	: Endosülfan
<b>EDTA</b>	: Etilen Diamin Tetra Asetat
<b>ELISA</b>	: Enzim Temelli İmmünolojik Yöntem
<b>FBS</b>	: Fetal Bovin Serum
<b>FGF</b>	: Fibroblast Büyüme Faktörü
<b>FGFR</b>	: Fibroblast Büyüme Faktörü Reseptörü
<b>FOXO</b>	: Forkead Transkripsiyon Faktörü
<b>GAPDH</b>	: Gliseraldehid 3-Fosfat Dehidrojenaz
<b>Gr</b>	: Gram
<b>HR</b>	: Homolog Rekombinasyon
<b>HT22</b>	: Mouse Hipokampal Nöronal Hücre Serisi
<b>IC50</b>	: %50 İnhibitör Konsantrasyon
<b>İGF</b>	: İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü
<b>IGFR</b>	: İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü Reseptörü
<b>kDa</b>	: Kilodalton
<b>KL</b>	: Klotho
<b>MnSOD</b>	: Mangan Süperoksit Dismutaz
<b>ml</b>	: Mililitre
<b>µg</b>	: Mikrogram
<b>µl</b>	: Mikrolitre
<b>mM</b>	: Milimolar
<b>mRNA</b>	: Haberci RNA
<b>NHEJ</b>	: Homolog olmayan uç birleştirme

<b>Oxr</b>	: Oksidatif Stres
<b>PBS</b>	: Fosfat Tuz Tamponu
<b>PI3K</b>	: Phosphatidylinositol-3 kinaz
<b>ROS</b>	: Reaktif Oksijen Türleri
<b>RT-PCR</b>	: Real Time Polimeraz Zincir Reaksiyonu
<b>RNA</b>	: Ribonükleik Asit
<b>ROMK</b>	: Renal Dış Medüller Potasyum Kanalı
<b>Rpm</b>	: Dakikadaki devir sayısı
<b>SDS-PAGE</b>	: Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforezi
<b>Ser2056</b>	: Serin 2056
<b>SIRT</b>	: Sirtuin
<b>Thr2609</b>	: Threonin 2609
<b>TRPV5</b>	: Geçici Reseptör Potansiyel Katyon Kanalı Alt Ailesi V
<b>WB</b>	: Western Blot
<b>WHO</b>	: Dünya Sağlık Örgütü
<b>WRN</b>	: Werner Sendromu
<b>XRCC4</b>	: X-ray çapraz tamamlayıcı protein 4
<b>XLF</b>	: XRCC4-Benzer Faktör
<b>XTT</b>	: 2,3-bis-(2-Metoksi-4-Nitro-5-Sülfenil)-2H-Tetrazolyum-5-Karboksianilid



## 1.GİRİŞ VE AMAÇ

Yaşlanma, strese cevap verme yeteneğinin azalması ve büyük oranda artmış morbidite ve mortalite riski ile birlikte normal vücut fonksiyonlarının kademeli biyolojik bozulması olarak tanımlanmaktadır (Kirkwood, 2005). Ortaya çıkan bozulma, kanser, kardiyovasküler hastalıklar ve nihayetinde yaşlı organizmaları ölüme götüren nörodejeneratif hastalıklar dahil yaşa bağlı patolojiler için ana risk faktörünü temsil etmektedir (Nicolai ve ark. 2015).

Dünya Sağlık Örgütü'nün 2013'te yayınladığı çalışmada 60 yaş ve üstü kişilerde ilk sırada sırt boyun ağrıları, kronik obstrüktif akciğer hastalığı, depresyon, düşmeler, demans, diyabet ve osteoartrit en fazla fonksiyon kaybı ve mali yüke neden olan hastalıklardır (WHO 2013, 2015). Benzer şekilde ülkemizdeki yaşlılarda da ölüm sebeplerinin başında kronik hastalıklar gelmektedir. Fonksiyonel bağımlılık ve işlev kaybına yol açan ilk 10 hastalık arasında ise iskemik kalp hastalığı, serebrovasküler hastalıklar, kronik obstrüktif akciğer hastalığı, diabetes mellitus, alzheimer ve diğer demanslar, osteoartrit ilk sıralarda yer almaktadır (TC. Sağlık Bakanlığı 2014).

Yaşlanma konusundaki birbirini dışlayan farklı teorilerin varlığına rağmen (Wilson ve ark. 2008) son zamanlarda bu sürecin ana nedeninin kademeli, ömür boyu süren moleküler ve hücresel hasar birikimi olduğu kabul edilmektedir (Kirkwood, 2005; Vijg ve ark. 2008 ; Gems ve Partridge, 2013). Lopez-Otin ve arkadaşları “yaşlanma fenotipini” tam olarak DNA hasarı, telomer kaybı, başlangıçta yaşlanma sürecini tetikleyen epigenetik değişiklikler, Reaktif Oksijen Türleri (ROS) ve hasar birikmesine neden olan süreç olarak tanımlamışlardır (Lopez-Otin ve ark. 2013). Genomik dengesizlik yaşlanma sürecinin ana nedenlerinden biri olarak kabul edilmektedir (Moskalev ve ark. 2013). Aslında genomik DNA hücrenin ömrü boyunca sürekli olarak bütünlüğünü ve işlevselliğini zayıflatan; oksidatif stres, genotoksik ilaçlar ve iyonlaştırıcı radyasyon gibi eksojen çevresel faktörler ile normal mitokondriyal metabolizmanın yan ürünleri ROS, replikasyon hataları ve spontan hidroliz reaksiyonları gibi endojen kaynaklı farklı tehlikelere maruz kalmaktadır (Marnet ve ark. 2001; Hugles ve ark. 2005).

DNA lezyonları uygun şekilde onarılmazsa, DNA hasarı, hücre yaşlanmaya veya hücre ölümüne yol açan replikasyon durmasına neden olmakta bu da yaşlanma sürecinin başlangıcına katkıda bulunmaktadır (Hoeijmakers, 2009). Hücreler DNA hasarı ile başa çıkabilmek ve onarımlarını teşvik etmek için lezyonların varlığını algılayan ve işaret eden karmaşık ve h39assas bir şekilde düzenlenmiş tamir mekanizmaları geliştirmiştir. Tamir mekanizmaları; replikasyon, transkripsiyon, hücre döngüsü ilerlemesi, kromatin remodeling, farklılaşma veya apoptozis gibi önemli hücresel süreçleri etkileyen çeşitli kontrol noktaları, sinyal iletimi basamakları ve efektör sistemleri içermektedir ( Zhou ve Elledge, 2000; Harper ve Elledge, 2007).

DNA çift zincir kırıkları (DSB) nadir oluşan, fakat çok ciddi olumsuz sonuçları olan bir mutasyon şeklidir (Sebastian ve Raghavan, 2016). DSB, iki tip yolak sayesinde onarılabilir. Homolog rekombinasyon (HR) ve homolog olmayan uç birleştirme (NHEJ). HR, tipik bir genetik rekombinasyondur ve homolog DNA sekansların varlığını gerektirir. Hücre döngüsünün S/G2 fazında meydana gelerek direk onarımı gerçekleştirmektedir. DSB onarımının diğeri olan NHEJ ise kırılan uçlarda homolog sekansların yönlendirmesi olmadan direkt olarak bağlanmasıyla karakterize bir tamir mekanizmasıdır (Lieber ve ark. 2010).

Son yıllarda, gittikçe artan sayıda analitik teknik, yaşlanma sürecinin altında yatan yollar hakkında daha iyi bilgi sahibi olmayı ve insan ömrünü uzatma hedefi ile yaşlanmanın moleküler temelini daha iyi anlaşılmasını sağlamıştır (Nicolai ve ark. 2015). Genetik faktörler arasında farklı metabolik yolları kontrol eden birçok gen yer almaktadır. Farklı metabolik yollarla ilgili bu genler, yaşam sürecini pozitif ve negatif yönde etkilemektedir. Yaşlanma ile bağlantısı olabileceği saptanan genetik faktörlerden Klotho (*Kl*) geninin kodladığı Klotho proteininin fazla miktarda sentez edilmesinin anlamlı olarak oksidatif strese direnç kazandırarak yaşlanma sürecini yavaşlattığı ve yaşam süresini uzattığı daha önce gösterilmiştir (Zeldich ve ark. 2014). Kenyon tarafından yapılan çalışmada Klotho geninin aşırı ifade edilmesinin insülin/IGF sinyal yolağını baskıladığı ileri sürülmüştür (Kenyon 2011). İnsülin/IGF sinyal yolağı inhibisyonunun NHEJ tamir mekanizmasını geciktirdiği bulunması (Chitnis ve ark. 2014) ile Klotho'nun NHEJ mekanizması üzerinde etkisinin olabileceğini aklı

getirmiştir. Fakat literatürde Klotho protein ile NHEJ yolağı arasındaki ilişkiyi inceleyen çalışma bulunmamaktadır.

Klotho proteininin NHEJ yolağında etkisini araştıran çalışmamızda elde edilen verilerin, yaşlanma esnasında gelişen moleküler ve hücresel olayların aydınlatılmasına katkı sunması beklenmektedir. Çalışma kapsamında, literatürde ilk defa olarak Klotho proteininin NHEJ yolağında etkisi, bu yolakta iş yaptığı bilinen Ku70/Ku80 ve DNA-PK genlerinin ekspresyonu ve proteinlerin işlevi araştırılarak belirlenmesi hedeflenmiştir. Bunun için kullanılan hippokampal hücre serileri ile bu hücrelerde de NHEJ yolağının ve aynı zamanda NHEJ tamir yolağının yaşlanma patogenezindeki rolünün anlaşılması hedeflenmiştir. Yapılacak çalışmaların sonucunda yaşlanmanın önlenmesine ya da geciktirilebilmesine yönelik ışık tutacak bilgiler elde edilmesi amaçlanmıştır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1.YAŞLANMA (AGING)

#### 2.1.1. Yaşlanma Tanımı

Yaşlanma ayrıcalıksız her canlıda görülen, tüm işlevlerimizde azalmaya neden olan süregen ve evrensel bir süreçtir. Vücudumuzun molekül, hücre, doku, organ ve sistemlerinde zamanın ilerlemesi ile ortaya çıkan, geriye dönüşü olmayan yapısal ve işlevsel değişikliklerin tümü “Yaşlanma” olarak tanımlanmaktadır (Kutsal, 2008).

Yaşlılık konusunda çoğu kuruluş tarafından kronolojik yaş sınırı 65 yıl olarak benimsenmektedir. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) yaşlılık dönemi için kronolojik tanımlamayı dikkate almaktadır. Birleşmiş Milletler bu alandaki çalışmalarında 60 ve üzeri yaş grubunu temel almaktadır. Ancak, ulusal ve uluslararası yaşlılık çalışmalarının genelinde DSÖ’ nün tanımı esas alınmaktadır (Ünalın ve ark. 2012).

#### 2.1.2.Yaşlılığın Genel Özellikleri

Görme, işitme, iskelet sistemi, beyin ve ürogenital sistemde oluşan değişimler, menapoz ve andropoz dönemleri yanında önceki yıllarda yaşanmış değişik sağlık olayları, sağlıkla ilgili davranışlar ve genetik faktörler de yaşlılıkta ortaya çıkan kaçınılmaz fizyolojik değişikliklerdir. Yaşlanmayla birlikte kişilerin fiziksel ruhsal işlevlerinde ve sosyal ilişkilerinde azalma ya da kayıplar oluşur. Bunun yanında yaşlı grup olarak ele alınan kişilerin bütün özelliklerinin benzer olduğunu da söylemek mümkün değildir. Aktif ve üretken iş yaşamında olanlar yanında özürü ve bağımlı olan yaşlılar da bulunmaktadır (Bilir ve ark. 2007).

Organ sistemlerinde oluşan değişiklikler normal koşullarda vücudun işlevlerini etkilemez ancak sistemlerin yedek kapasitelerini azaltır ve stres altında ise yaşlı bünye işlevini arttıramayabilir. Sağlıklı bir yaşlılık ve yaşlının sağlığının korunması önemli bir durumdur ve yaşlanma ile beraber hücre yıpranması, vücut direncinde azalma, kronik hastalıklarla beraber fiziksel ve zihinsel gerilemeyle karşılaşılması kaçınılmaz bir durumdur (Onat, 2007).

Yaşlanma, neredeyse tüm doku ve organların disfonksiyonu (cilt elastikiyetinin kaybı, yağların birikmesi ve ateroskleroz, bağışıklık sisteminin gerilemesi, kırıklara eğilimli kemikler gibi) ve bununla birlikte vücut işlevlerini bozan karmaşık bir süreçtir (Sharpless ve ark. 2007; Artandi ve ark. 2015). Hücre çoğalmasının sürekli inhibisyon durumu, hücrenel yaşlanmayı başlatır ve Alzheimer hastalığı, kanser, böbrek hastalığı ve dejeneratif hastalık, obezite, diyabet, ateroskleroz gibi çeşitli yaş ile ilişkili kronik hastalıklar, kronik enflamasyon teşvik etmektedir (Campisi, 2011 ; Zhu ve ark. 2014) .

### **2.1.3.Yaşlılığın Sınıflandırılması**

DSÖ'nün 1983 yılında yapmış olduğu sınıflamada; 45-59 yaşları “orta yaş”, 60-74 yaşları “yaşlılık” 75-89 yaşları “ihtiyarlık” 90 ve üzeri yaşları “ileri ihtiyarlık” dönemi olarak kabul edilmiştir.

DSÖ ve Bilim insanlarının kabul ettiği gerçek yaşı bulmamıza yardımcı olacak yaşlılığın bilimsel anlamda sınıflandırılmasında ise 65-74 yaş arası erken yaşlılık evresi, 75-84 yaş arası orta yaşlılık evresi, 85 yaş ve üzeri ileri yaşlılık evresi şeklindedir (Dönmez, 2010).

### **2.1.4.Yaşlılığın Organizmaya Etkileri**

Yaşlılıkla birlikte insan vücudunda bir takım fizyolojik değişiklikler meydana gelmektedir. Sağlıksız davranışlar ve bazı çevre faktörleri, bu fizyolojik değişikliklerin etkisini daha da olumsuz hale getirmektedir.

Fizyolojik değişiklikleri: endokrin, immün, genitoüriner, santral sinir, kardiyovasküler, deri, solunum ve kas-iskelet sistemimdeki değişiklikler olarak sınıflayabiliriz. Endokrin sistemde yaşlanma ile birlikte pankreas ve tiroid dukusu bozulmaktadır. Tümör insidansı artmaktadır. İmmün sistem değişiklikleri genellikle humoral yanıtta azalmaya bağlı olarak lösemilerin görülmesi şeklinde olabilmektedir (Taşar ve ark. 2012).

### 2.1.5.Yaşlılık Epidemiyolojisi

Son yıllarda nüfusun artması ile beraber, sağlık alanındaki bilimsel ve teknolojik gelişmeler sonucu yaşlı olarak kabul edilen nüfusun oranı giderek artmaktadır.

Gelişmiş ülkelerde 65 yaş ve üzerindeki nüfus, toplam nüfusun % 12-22'sini oluştururken bu oran gelişmekte olan ülkelerde % 4-8'dir. Dünya Sağlık Örgütünün 1970-2025 yılları arasındaki öngörülerine göre beklenen yaşlı insan oranı % 22,3 ile 624 milyon olarak belirlendiği; 2025 yılında yaklaşık 1,2 milyon insanın 60 yaş ve üzeri yaşta olacağı ve 2050 yılında ise 2 milyona ulaşacak olan yaşlı nüfusunun %80'inin gelişmekte olan ülkelerde yaşayacağı ifade edilmektedir. Ülkemiz de yaşlanma sürecinin hızlı olduğu gelişmekte olan ülkeler arasındadır. 1955 nüfus sayımında yaşlı nüfusun toplam nüfusa oranı %3,4 tespit edilirken 2010'daki nüfus sayımında bu oran %7,1'e yükselmiştir. Mevcut demografik eğilimlerin devam edeceği varsayımından hareketle yapılan hesaplamalar, 21. yüzyılın tüm dünyadaki beklentilere paralel olarak Türkiye'de de yaşlı yüzyılı olacağına işaret etmektedir.

### 2.1.6. Yaşlanma Mekanizmaları

Yaşlanma ile ilgili 1990 yılında yapılmış bir çalışmada, çok fazla teorinin bulunduğu belirtilmiştir (Medvedev,1990). Bu konudaki bilgi birikimi her geçen gün artmaktadır. Hemen her yaşlanma modeli, yaşlanma ile ilgili tek bir mekanizmaya odaklansa da, yaşlanma oldukça karmaşık bir olay olduğundan tek bir mekanizma ile açıklanması mümkün gözükmemektedir. Bu nedenle yaşlanmayı açıklayan mekanizmaların bugün için en güncel ve kapsamlı olanlarından söz edilecektir.

Bunlar:

- İmmünolojik Yaşlanma Teorisi
- Telomer Hipotezi
- Serbest Radikaller Teorisi
- Çevresel Faktörler ve Kalori Kısıtlaması
- DNA Hasarı
- Yaşlanma ve Apoptoz

### ***2.1.6.1. İmmünolojik Yaşlanma Teorisi***

İnsanların doğum esnasında bağışıklık sistemleri yeterince gelişmemiştir. Vücutta zaman içinde karşılaşılan patojenlere karşı oluşturulan antikorlar ve yapılan aşılarda hastalıklara karşı bağışıklık artmaktadır. Bağışıklık sisteminin bu gelişimi insanda yetişkinlik döneminde zirveye ulaşmaktadır. Bu teoriye göre yaşlanmanın nedeni, yaş ile birlikte bazı hormonların düzeyindeki azalma ya da ilerleyen yıllarda bağışıklık sistemi gerilemesi, etkinliğini kaybetmeye başlamasıdır (Lüleyap ve ark. 2008). Yani immun sistem yaşlanınca, vücudun kendi hücreleri ve dokuları ile yabancı hücreler ve maddeler arasındaki farkı tanıma yeteneğini kaybetmeye başlamakta ve kendi vücuduna saldırarak hastalıklara neden olmaktadır (Lüleyap ve ark. 2008). T hücrelerinin olgunlaştığı timus bezinin gerilemesi yaşlanmadan çok daha hızlı bir prosestir. Yaşlılarda proliferasyon azalmasına rağmen T hücre sayısı genelde değişmemektedir. Olgunlaşan T hücrelerinde azalan BCL-2 ekspresyonu ile apoptoz gerçekleşmektedir. Sonuç olarak B hücreleri daha az antikor üretirler. Monositlerin IL-1'e duyarlılığı azalmıştır. IL-1 ve TNF $\alpha$  seviyelerinin arttığı görülmüştür (Masliah ve ark. 1993; Aydemir, 2013).

### ***2.6.1.2. Telomer Hipotezi***

Herbir kromozomun iki ucunda bulunan fonksiyonel olmayan DNA'ya telomer denmektedir. Kromozomların birbiriyle birleşmesini önleyen ve genom yapısının kromatin iplikler şeklinde ayrılabilmesini sağlayan ve kromozom oluşumuna zemin hazırlayan yapılardır. Her hücre bölünmesinde kısalmaktadır. Telomeraz bir reverstranskriptaz enzimidir. İnsan embriyo hücrelerinde ve kanser hücrelerinin %85'inde bulunmaktadır. Eğer hücreler telomerlerini kaybettikleri halde çoğalmaya devam ederlerse kromozom uçları diğer kromozomlara yapışır, birçok anormallik oluşur (Lodish ve ark. 2010).

Genetiği değiştirilmiş hayvan modelleri ile yapılan birçok çalışma telomer kaybı, hücresel yaşlanma ve organizmal yaşlanma arasında nedensel bağlantılar kurmuştur. Böylece, kısaltılmış veya uzatılmış telomere sahip fareler, sırasıyla, azalmış veya arttırılmış yaşam ömrü sergilemektedir (Armanios ve ark. 2009; Rudolph ve ark.

1999; Tomas-Loba ve ark. 2008). Son kanıtlar ayrıca, yaşlanmanın telomeraz aktivasyonu ile geri alındığını göstermektedir. Özellikle, telomeraz eksik farelerin erken yaşlanması, bu yaşlı farelerde telomeraz genetik olarak yeniden aktif hale getirildiğinde geri döndürülebilmektedir (Jaskelioff ve ark, 2011). İnsanlarda, son zamanlarda yapılan meta-analizler, özellikle daha küçük yaşlarda, kısa telomerlerle ölüm riski arasında güçlü bir ilişki olduğunu göstermiştir (Boonekamp ve ark. 2013).

### **2.1.6.3. Serbest Radikaller Teorisi**

Günümüzde en çok rağbet gören yaşlanma teorilerinden biridir. Oksidan maddeler olan reaktif oksijen ürünleri (ROÜ) ve reaktif nitrojen ürünleri (RNÜ), birincil olarak mitokondrilerde üretilirler. Yaşlanma ile birlikte oksidan maddelerin miktarı artar ve oluşturacakları hasarı engellemeye çalışan antioksidan sistemler yetersiz kalır (Vina ve ark. 2007). Yapılan bir çalışmada  $\alpha$ Klotho'nun, antioksidan enzimlerin kodladığı genlerin ekspresyonunu düzenleyerek oksidatif strese karşı direnci arttırdığı bulunmuştur. Mekanizma, transkripsiyon faktörü FoxO fosforilasyonunun düzenlenmesi, çekirdeğe nüfuz etmesinin uyarılması ve süperoksit dismutaz 2 ve katalaz ekspresyon seviyelerinin yükselmesi yoluyla gerçekleştirilir. Hücre kültürüne  $\alpha$ Klotho proteinin ekstraselüler domaininin eklenmesi, süperoksit dismutaz 2 ekspresyonunu indüklediğini, paraquat veya hidrojen peroksit tarafından indüklenen oksidatif hasara ve apoptoza karşı hücre direncini arttırdığını göstermiştir (Yamamoto ve ark. 2005 ; Ikushima ve ark. 2006).

Oksidan maddeler, hem yaşlılıkla ilişkili dejeneratif hastalıkların (Alzheimer hastalığı ve ateroskleroz gibi) patogenezinde, hem de doku atrofisi gibi yaşlılık sürecinin sonucu olan durumlarda önemli rol oynamaktadır (Martin, 1997). Bununla birlikte ROÜ ve RNÜ, büyüme, apoptoz ve nörotransmisyonunda görevli sinyal molekülleri olarak da fizyolojik görevler üstlenmektedirler (Gilca ve ark. 2007).

Yaşlanma ile ilişkili oksidatif strete en kritik hedeflerden biri de DNA'dır. Bir taraftan DNA bazları ROÜ tarafından modifiye edilirken, diğer taraftan DNA tamir enzimleri bu lezyonları tamir etmeye çalışmaktadır (Ames ve ark. 1993). Ancak tamir edilemeyen lezyonlar yaşla birlikte birikirler. Yaşlanma ile birlikte mitokondriyal DNA'da (mtDNA) görülen oksidasyon, nükleer DNA'dakine göre çok daha ön



plandadır (Vina ve ark. 2007). Bunun ana nedenleri mtDNA'nın nükleer DNA gibi histonlar tarafından korunmaması ve oksidan maddelerin temel üretim yerinin mitokondri olmasıdır (Gilca ve ark. 2007). Bu mtDNA'da mutasyonların daha sık oluşmasına yol açar.

#### **2.1.6.4. Çevresel Faktörler ve Kalori Kısıtlaması**

Kalori kısıtlamasının fizyolojik ve davranışsal işlevleri düzenlediği ve birçok yaş bağlı hastalığı geciktirdiği bilinmektedir. Kalori kısıtlaması ile daha az besin ya da enerji kaynağı ATP üretilmesi için krebs döngüsüne girecek, daha az oksidatif fosforilasyon gerçekleşecek ve böylelikle oluşan reaktif oksijen türlerinin miktarı azalacaktır. Ortam sıcaklığı ve diyet gibi faktörlerin yaşlanma konusunda önemli yeri olduğuna dair birçok bilgi vardır. 1929 yılında yapılan bir çalışmada *Drosophila*'da yaşam uzunluğunun ortam sıcaklığı ile ters orantılı olduğu gösterilmiştir. Metabolizma yavaşladığı zaman, yaşlanmada önemli rolü olan reaktif oksijen ürünleri üretimi de azalmaktadır (Karan ve Tufan, 2010).

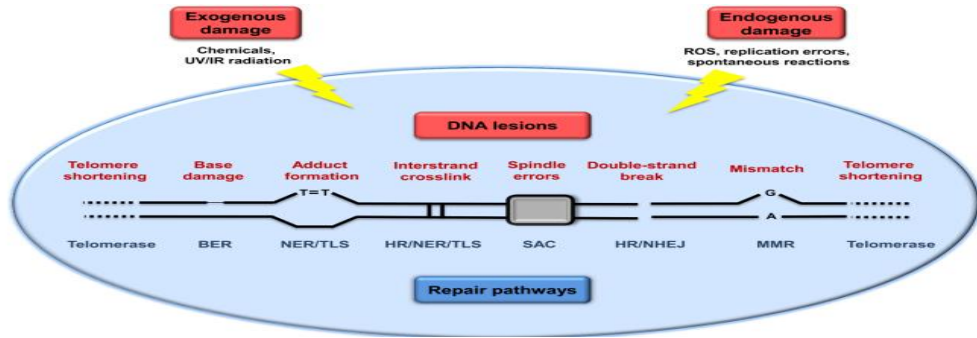
Besin alımı kısıtlanmasının, *S. cerevisiae*, *D. melanogaster*, *C. elegans*, kemirgenler ve köpekler üzerinde yapılan birçok çalışmada, ömür uzunluğunda bir artışa neden olduğu gösterilmiştir. Bu çalışmalardan yola çıkarak Kuro-o ve arkadaşları yaptıkları çalışmalarda Klotho geninin, insulin/IGF-1 sinyalini ve oksidatif stresi baskılayarak etkili olduğunu göstermişlerdir. Yapılan çalışmalarda insulin-benzeri sinyalleşmenin baskılanması ömrün uzamasını indüklemektedir. Bu durum oksidatif strese (Oxr) ve diğer stres uyaranlarına direnç oluştururken, mitokondride reaktif oksijen türlerinin yok edilmesini sağlayan Mn superoksit dismutaz (SOD) gibi birçok stres-savunma-ilişkili enzimin sentezlenmesini de arttırmaktadır (Kuro-o ve ark. 2009).

Bununla birlikte son yıllarda yapılan çalışmalarda, diyetin (özellikle kalori kısıtlamasının) yaşlanma ile ilişkili birçok hastalığın geciktirilmesi veya önlenmesi de dahil olmak üzere yaşam süresini önemli ölçüde etkilediği gösterilmiştir (Mirzaei ve ark. 2016 ; Geller ve ark. 2005). Diyet kısıtlaması birçok türde yaşam süresini destekler ve telomeraz aktivitesini stabilize ederek genetik düzeyde yaşlanmayı geciktirmektedir. Daha düşük kalori alımı ile beslenen fareler, yaşa bağlı hastalıkların insidansında bir azalma göstermişlerdir (Mirzaei ve ark. 2016 ; Vera ve ark. 2013).

### 2.1.6.5. DNA Hasarı

Yaşın artmasıyla hücrelerin yapısal özellikleri değişmektedir. Moleküler yaşlanma, hücrenin ana bileşeni olan proteinlerin ilerleyen hasarı ve istenmeyen hücre içi artıkların birikimi ile ilgilidir. Bu hipoteze göre kendiliğinden oluşan hidroliz ve serbest radikallerin etkileriyle DNA'nın yapısında yaşa bağlı hatalara neden olmaktadır. Bu etkiler aynı zamanda genetik olarak kontrol edilen bilgi akışını da etkilemektedir.

İnsan genomik DNA'sının bütünlüğü endojen ve ekzojen faktörlerin etkisiyle sürekli olarak tehdit altındadır (Hoeijmakers, 2009) . Endojen faktörler; DNA'da kendiliğinden meydana gelen hatalar olabildiği gibi hücrel metabolizmanın yan ürünü olarak üretilen reaktif oksijen ve nitrojen türleri, lipid peroksidasyon ürünleri, endojen alkilasyon ajanları, östrojen ve kolesterol metabolitleri ve reaktif karbonil türleri de olabilmektedir (Hoeijmakers, 2009 ; Iyama ve Wilson, 2013). Ekzojen faktörler ise ultraviyole ışığı, iyonize radyasyon, ağır metaller, hava kirliliği, sigara dumanı, kemoterapötik ilaçlar olarak sayılabilmektedir (Hoeijmakers, 2009; Iyama ve Wilson, 2013; Ciccia ve Elledge, 2010). Şekil 2.1'de DNA hasarı ve onarım mekanizmaları gösterilmektedir.



Şekil 2.1: DNA Hasarı ve Onarım Mekanizmaları (Lopez-otin ve ark. 2013)

Bir memeli genomunda her gün yaklaşık olarak  $10^4$ 'ten daha fazla DNA hasarının ortaya çıktığı tahmin edilmektedir (Iyama ve Wilson, 2013 ; Slupphaug ve ark. 2003). DNA'daki hasarlar; tek baz değişimi (deaminasyon, depürinasyon, baz alkilasyonu, delesyon, insersiyon vs), tek veya çift zincir kırıkları, aynı veya farklı DNA

zincirleri arasında çapraz bağlanma gibi çeşitli şekillerde olabilmektedir (Sancar ve ark. 2004). Bütün bu DNA değişim biçimleri, temel genleri ve transkripsiyonel yolları etkileyebilir, bu da apoptoz veya yaşlanma ile ortadan kaldırılmadığı takdirde dokuyu tehlikeye sokabilecek işlevsiz hücrelere yol açabilir. Hasarın yoğunluğuna ve tipine bağlı olarak; hücre döngüsünün durdurulması, gen ifadesinin değişmesi, DNA tamirinin uyarılması, programlı hücre ölümü, kanser ya da yaşlanma gibi olaylar meydana gelebilmektedir (Hoeijmakers, 2009 ; Sancar ve ark. 2004).

Genomik hasardaki yaşam boyu artış ile yaşlanma arasındaki önerilen bağlantılara ilişkin nedensel kanıtlar, farelerde ve insanlarda yapılan çalışmalardan ortaya çıkmış, DNA onarım mekanizmasındaki eksikliklerin farelerde yaşlanmaya ve birkaç insan progeroidinin (Werner sendromu, Bloom sendromu, xeroderma pigmentosum sendromu ve Cockayne sendromu) altında yatan neden olduğunu göstermiştir (Gregg ve ark. 2012; Hoeijmakers, 2009; Murga ve ark. 2009). Son zamanlarda yapılan bir çalışmada, kromozomların doğru şekilde ayrılmasını sağlayan bir mitotik kontrol noktası bileşeni BubR1'i aşırı eksprese eden transgenik farelerin, anöploidi ve kansere karşı daha fazla koruma ve daha uzun sağlıklı yaşam süresi göstermekte olduğunu ileri sürmüştür (Baker ve ark. 2012).

#### **2.1.6.6. Yaşlanma ve Apoptoz**

Apoptoz; gelişmiş organizmalarda hücreler arası ilişkilerin gereği olarak gereksinim duyulmayan, fonksiyonları bozulan, biyolojik görevini tamamlamış veya hasarlanmış hücrelerin çevreye zarar vermeden ortadan kaldırılmasını sağlayan ve genetik olarak kontrol edilen programlı hücre ölümüdür (Derici, 2007).

Çin'de yaygın olarak kullanılan dokuz farklı pestisit (paraquat, rotenon, klorpyrifos, pendimethalin, endosülfan, fenpyroksimat, tebufenpyrad, triklorfon ve karbaril) nörotoksik mekanizması incelenmiştir. Sonuçlar, pestisitlerin mitokondri ve doza bağlı apoptotik hücre ölümünün morfolojik değişikliklerini indüklediğini ortaya koymuştur (Chen ve ark. 2017).

Başka bir çalışmada endosülfanın neden olduğu üreme toksisitesinin mekanizmalarını araştırmak için farelerin spermatojenik hücre hatları (GC-1 spg), *in vitro* olarak incelenmiştir. Sonuçlar, endosülfana maruz kalmanın, spermatojenik

hücrelerin apoptozunu, mitokondriye bağlı yapı ve mitokondriyal disfonksiyonun zarar görmesine neden olan oksidatif stresin aracılık ettiği mitokondriye bağımlı yol yoluyla uyarabildiğini göstermiştir (Xu ve ark. 2016).

P53' ün DNA hasarına karşı oluşan hücresel yanıtta önemli bir rol oynadığı çok iyi bilinmektedir. Telomerlerin yıpranması p53 artışını tetiklediğinden, aynı zamanda yaşlanma tepkisinde de önemli bir aracı olduğu da ortaya çıkarılmıştır (Tasaki ve ark. 2012; Senturk ve Manfredi, 2013). Normal hücreler içindeki onkogenlerin uygun olmayan biçimlerde aktivasyonu, p53 aktivasyonu yoluyla erken yaşlanmayı hücresel koruyucu tümör baskılayıcı cevap olarak indükler (Walerych ve ark. 2012). Bazı hücrelerde tek başına p53 aktivasyonunun, yaşlanma fenotipini geri döndürmede yetersiz olduğu görülmektedir. Farkı yaratan nokta p16 ifadesinin varlığı ya da yokluğudur. Stres p16 ifadesini arttırırken sonuç olarak ortaya çıkan pRB artışının kromatinin yeniden organize olmasına yardım ettiği ve bu durumun hücre siklusu regülatörlerini kodlayan genin yaşlanma ile bağlantılı replikatif inhibisyonu ile sonuçlandığı bilinmektedir (Mackenzie ve ark. 2012; Mijovic ve ark. 2013).

## 2.2. YAŞLANMA GENETİĞİ

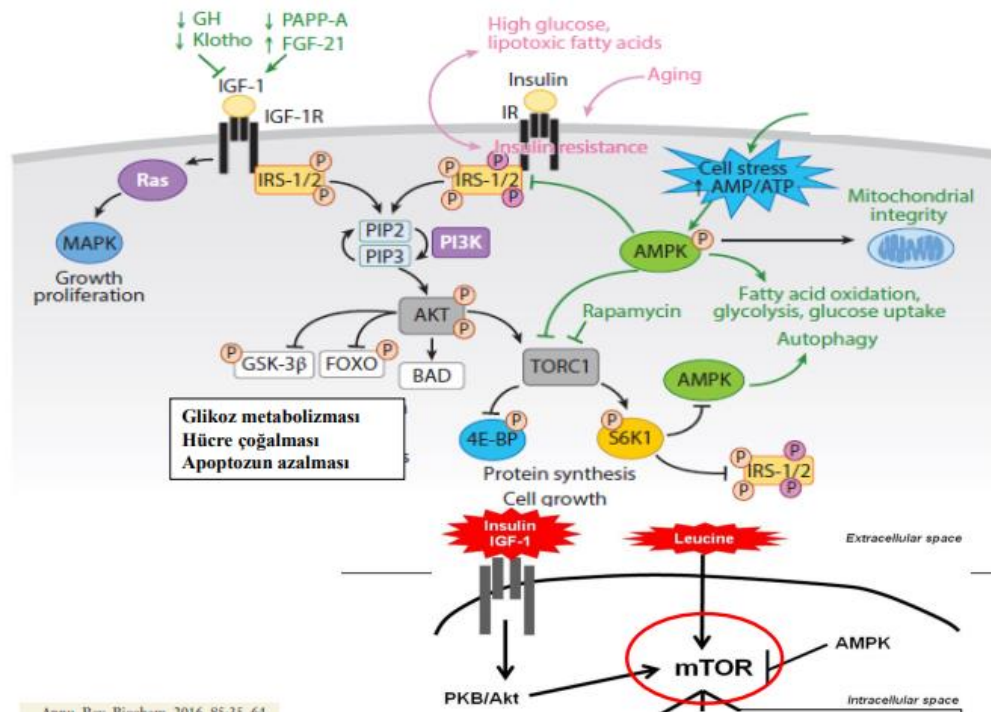
Yaşlanma, genetik ve edinilen faktörler arasında sıkı bir şekilde düzenlenmiş ve karmaşık bir etkileşim tarafından yönlendirilmektedir ( Mirzai ve ark. 2016).

Yaşlanma sürecini etkileyen birçok faktör arasında, çevresel etkenler (toksinler, kirleticiler, iklim değişiklikleri, sigara içme, stres, sosyal yük ve depresyon) önemli risk faktörlerinden biridir. Özellikle kirleticiler ve kimyasallar birlikte yaşlanmayı etkilemekte, sıklıkla belirli hastalıkların beklenenden daha erken yaşlarda gelişmesine neden olmaktadır (Geller ve ark. 2005; Mirzai ve ark. 2016). Sisplatin ve alkilleyici ajanlar gibi kemoterapötik ilaçlar ile bazı pestisitler, DNA'da çift zincir kırıklarına ve zincir içi çapraz bağların oluşumuna neden olmaktadır. Reaktif oksijen türlerinin (ROS) neden olduğu 100'den fazla oksidatif DNA hasarı tanımlanmıştır (Balajee ve Bohr, 2000). İn vivo ve in vitro model sistemleri endosülfana maruz kalmanın ROS'u indüklediğini göstermektedir (Sebastian ve Raghavan, 2016).

Tüm canlıların kendilerine özgü yaşam süreleri vardır ve canlıların yaşlanmaları bir genetik plan dahilindedir. Canlıların yaşlanma sürecini genetik açılayan pek çok

teori geliştirilmiştir. Ancak bunların her biri esas olarak, genetik yapıdaki ve bunun kontrolünde olan hücresel olaylardaki çeşitli değişimleri, biyolojik yaşlanmaya sebep göstermektedir. (Arı ve ark. 2008 ; Öksüzokyar ve ark. 2016). Dış faktörlerden etkilenmekle birlikte, canlının ne zaman yaşlanma sürecine gireceğini ve bu sürecin nasıl işleyeceğini temelde bu genler belirlemektedir (Arı ve ark. 2008 ; Öksüzokyar ve ark. 2016).

Aynı zamanda yaşlanma, karmaşık bir dizi spesifik sinyalleşme kaskadları tarafından düzenlenmektedir. Hormonal sinyalleşme yolları, yaşam süresinin son derece güçlü düzenleyicileridir ve diğer yollarla birlikte sistemik bir şekilde hareket ederek birkaç kilit organın ömrünü koordine ederler. Bunlar arasında steroid sinyalleri, sirtuin deasetilazlar, AMP ile aktive olan protein kinaz, Klotho gibi genler, ROS sinyalleri, tümör baskılayıcı, insülin benzeri büyüme faktörü 1'i (IGF1) ve stres kaynaklı protein kinazları bulunmaktadır (Greer ve Brunet ; 2008). Şekil 2.2' de yaşlanma ve genetik arasındaki ilişki gösterilmiştir.



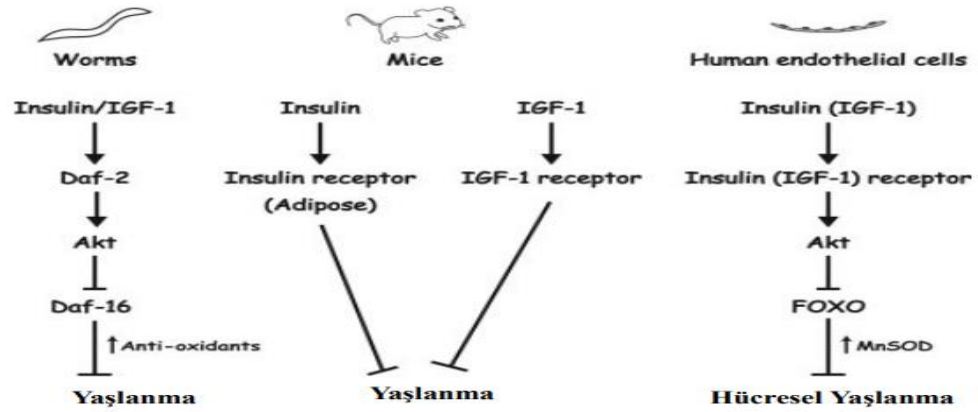
Şekil 2.2. Yaşlanma ve Genetik Arasındaki İlişki (Annu Rev Biochem; 2016)

Yaşlanmanın çok faktörlü doğası, bir şekilde yaşlı organizmalarda tipik olan aşamalı fonksiyonel bozulmayı taklit eden çoklu mutasyonları taşıyan genetik olarak modifiye edilmiş hayvan modellerinin bulunmamasından dolayı, kısmen karmaşık organizmalarda bu sürecin çalışmasını engellemiştir. *Saccharomyces cerevisiae* (ekmek mayası), *Caenorhabditis elegans* (bir nematod) ve *Drosophila melanogaster* (meyve sineği), yaşlanma genetiği çalışmalarında sıkça kullanılan organizmalardır ve bu organizmalar üzerinde yapılan araştırmalarda yaşam süresinin genetik kontrolü hakkında birçok genetik mekanizma bulunmuştur (Bishop ve ark. 2007).

Hücreyi yaşlanma bağlantılı fonksiyon azalmasından korumada önemli rol oynayan bir protein sınıfı sirtuinlerdir. Sirtuin proteini, orijinal olarak *Saccharomyces cerevisiae*'de keşfedilmiştir. Guarente ve arkadaşları kromatin modifikasyonu yoluyla genomik kararsızlığı inhibe ederek uzun süre yaşayan maya hücrelerini yalıtırlar ve onların uzun süre yaşamasını sağlayan bir grup geni, “sirtuinler” olarak adlandırdılar (Guarente, 2011). İlk olarak mayaların kullanılmasının ardından, özellikle farelerle yapılan sonraki çalışmalarda görülmüştür ki, sirtuinler stres ortamlarında organizmayı korumak amacıyla devreye giren genlerdir. Yiyeceğin az olduğu zamanlarda, bu genler devreye girer ve organizmayı yavaşlatır, ayrıca onu, DNA'sını tamir etmeye yöneltir ve üremesini durdurur. Bu genleri aktifleştiren en tetikleyici faktör ise kalori sınırlamasıdır (Horio ve ark. 2011).

*Caenorhabditis elegans*'ın genlerinin yaklaşık %1'i yaşlanma ve uzun ömür sürecine katılabilmektedir (Tissenbaum, 2012). *Caenorhabditis elegans*'ta, insülin benzeri sinyallemenin düzenlenmesi yaşam ömrünün uzamasına (Yaş) ve yapısal dauer larvalarının (Daf-c) oluşumuna neden olmaktadır. Bu aynı zamanda oksidatif strese (Oxr) ve diğer stres uyarıcılarına karşı direnç sağlar ve mitokondride reaktif oksijen türlerini uzaklaştırmaya yarayan Mn süperoksidismutaz (SOD) gibi strese bağlı birçok enzimin ekspresyonunu artırır. Bu canlılarda MnSOD sistemleri, hem uzun ömür hem de dauer oluşumunun insülin benzeri sinyalleme bazlı düzenlenmesini, antioksidanlar olarak değil, fizyolojik-redoks sinyalleme modülatörleri olarak hareket etmektedir. İnsan IGF-1 Reseptörü geni ile karşılaştırılan ve antioksidan etkide yer alan bir gen olan *C.elegans*'taki daf 2 gen mutasyonu, bu türlerde %30'luk bir yaşam ömrünü

göstermektedir. Yapılan çalışmalarda benzer bir mekanizmanın diğer canlılarda da etkili olduğunu göstermiştir. Şekil 2.3' de farklı canlılarda yaşlanma mekanizması gösterilmiştir.



Şekil 2.3: Farklı Canlılarda Yaşlanma Mekanizması

TGF- $\beta$  sinyal yolunda veya TGF- $\beta$  reseptörlerinde (TGF- $\beta$ R1 / R2) aşağı regülasyon ve mutasyonlar, solucan ömrünü yaklaşık % 20 oranında uzattığı bulunmuştur (Shaw ve ark. 2007). İn vitro çalışmalar SKI'in reseptör aktivasyonunu, Smad3 fosforilasyonunu ve Smad3 transkripsiyon aktivitesini inhibe eden TGF-21 bağlanmasını azaltmak için tip II TGF $\beta$ 1 reseptörünü bağladığını ortaya koymuştur (Doi ve ark. 2011).

Daha yüksek hayvan modellerinde, araştırmacılar birkaç genin ekspresyonunu modüle ederek yaşam süresini önemli ölçüde uzatmıştır. Klotho, böyle bir genin bir örneğidir. Klotho geninin keşfi, yaşlanma süreci hakkındaki şu anki anlayışımızı önemli ölçüde artıran muazzam araştırma ilgisi yaratmıştır. İnsanlarda serum  $\alpha$ Klotho seviyeleri 40 yaşından sonra yaşla birlikte düşmektedir (Yamazaki ve ark. 2010; Siahaidou ve ark. 2012).  $\alpha$ Klotho seviyelerindeki bu azalma, kanser, hipertansiyon ve böbrek hastalığı gibi yaşlanma ile ilgili birkaç hastalığı olan hastalarda gözlenebilmektedir (Wang ve Sun 2009; Wang ve ark. 2010). Klinik bir çalışma,  $\alpha$ Klotho geninin promotör bölgesindeki G395A tek nükleotid polimorfizminin (SNP), özellikle 60 yaşın üzerindeki hastalarda, esansiyel hipertansiyon ile ilişkili olduğunu

göstermiştir (Wang ve ark. 2010). Klotho eksikliği aynı zamanda insandaki kronik böbrek yetmezliği ile de ilişkilidir (Koh ve ark. 2001) ve farelerde erken diyabetik nefropatiyi teşvik etmektedir (Lin ve ark. 2013). Son zamanlarda yapılan çalışmalar, Klotho'nun pankreas  $\beta$ -hücrelerinde de ifade edildiğini, insülin salınımını desteklediğini ve tip II diyabette koruduğunu göstermiştir (Lin ve Sun 2012 ; Lin ve Sun 2014). Klotho eksikliği kardiyovasküler hasarı hızlandırmakta endotel fonksiyonunu bozmakta vazodilatasyona, dwindles anjiyogenezine, hücrel kalsiyum hemostazını değiştirmekte ve zamanla erken yaşlanma ile sonuçlanan kemik-matriks yapısını bozmaktadır (Artandi ve ark. 2015 , Fan ve ark. 2016). Klotho, birçok hayvan modelinde yaşamın uzatılması için en iyi çalışılmış genlerden biridir (Wang ve ark. 2009). Semba ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada; çözünebilir  $\alpha$ Klotho konsantrasyonu sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kullanılarak Alzheimer hasta modellerinde serebrospinal sıvıda bulunan Klotho konsantrasyonlarını cinsiyete ve yaşa göre değerlendirmişlerdir. Ekstrasellüler Klotho domain konsantrasyonunun AD'li hastaların serobinal sıvısında bir hayli azaldığı gösterilmiştir (Semba ve ark. 2014).

DNA tamir mekanizmasında meydana gelen bozukluklar sonucu oluşan segmental erken yaşlanma (progeri) sendromları, yaşlanmanın genetik kontrolüyle ilgili önemli delillerden biridir (Karan ve Tufan; 2010). Hutchinson – Gilford Progeria, Werner ve Cockayne sendromları gibi bazı genetik hastalıklar, insanlarda normal yaşlanma sürecinde görülen belirtilerin aynısına neden olmaktadır. Farklı DNA onarım mekanizmalarının aktifleştirilmesi yoluyla yaşlanma sürecinin önlenmesinde genom stabilitesinin korunmasının temel rolü, Werner sendromu, Hutchinson-Gilford progeria sendromu ve Cockayne sendromu gibi progeroid sendromları tarafından önerilmektedir (Navaro ve ark.2006).

NHEJ ve yaşlanma arasındaki ilişki ilk olarak Werner sendromunun (WS) tanımlanmasıyla başlamıştır. WS, DNA nükleaz WRN'deki mutasyonların neden olduğu bir hastalıktır ve kanser ve erken yaşlanmayı temsil eden bir sendromdur. WRN proteini, NHEJ-aracılı DNA DSB onarımında detaylı rolü belirsiz olmasına rağmen, Ku70 / 80 ile güçlü bir şekilde etkileşime giren RECQ benzeri bir helikazdır (Chen ve ark. 2003).



DSB'lerin tamir mekanizması olan NHEJ, hücre döngüsünün tüm aşamalarında çalışsa bile G0 / G1 hücrelerinde baskındır, dolayısıyla ökaryotik hücrelerde en çok kullanılan onarım mekanizmasını temsil etmektedir (Sonoda ve ark. 2006). Bu mekanizma son derece sınırlı dizi homolojisi kullanarak iki kırık ucu birleştirmektedir. Bu, hataya açık NHEJ mutasyonların birikmesine ve yaşlanmaya neden olmaktadır (Lieber ve ark. 2010).

NHEJ yolağının bileşenlerinden olan XRCC4 ve Ligase IV gibi proteinlerde eksiklik erken yaşlanmaya ve yüksek derecede apoptozise neden olmaktadır (Difilippantonio ve ark. 2000; Ferguson ve ark. 2001). İnsan yaşlanan fibroblastlarda yapılan başka bir çalışmada NHEJ, yaşlanma sırasında daha fazla hata eğilimli ve daha az verimli hale geldiği bulunmuştur (Seluanov ve ark. 2004). Araştırmacılar Ku80- veya Ku70 / Ku80-mutant farelerde yaşlanma patogenezi olduğunu bildirmişlerdir. Ku seviyelerindeki bir düşüş NHEJ'in azalmasına, yaşlanan hücrelerde onarılamayan DNA hasarına yol açarak yaşa bağlı genomik instabiliteye katkıda bulunduğunu açıklamışlardır (Li ve ark. 2007; Selunov ve ark. 2007).

Lee ve arkadaşları sıçan akciğerinde NHEJ aktivitesinin, yaşlanma ile önemli ölçüde azaldığını bildirmiştir (NHEJ aktivitesini ölçmek için tüm akciğer homojenatları kullanılmıştır). Sağlıklı yaşlanma için faydalı olduğu düşünülen kalorik kısıtlama (CR), bu akciğerlerde NHEJ aktivitesinin azalmasını önemli ölçüde bastırmıştır ve CR, akciğerdeki Ku70 seviyelerini arttırdığı bulunmuştur (Lee ve ark. 2011).

Yapılan başka bir çalışmada NHEJ'de (XRCC4 ve Ku80) yer alan genlerin mRNA ekspresyonunun, yaşlı farelerin akciğerlerinde, genç farelere kıyasla, NHEJ aktivitesindeki düşüşün, aslında yaşlanmanın bir sonucu olarak önemli ölçüde azaldığı bildirilmiştir. Özellikle, yakın zamanda yapılan bir çalışmada, Ku70 ekspresyonunun azalmasının amfizemi teşvik ettiği hipotezini destekleyen, amfizemli fare akciğerinde sigara dumanı ile Ku70 protein seviyelerinin azaldığını göstermiştir (Zahn ve ark. 2007; Yao ve ark. 2013).

Chitnis ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada IGF-1R inhibisyonunun, NHEJ yolağını etkileyip etkilemediğini araştırmışlardır. Çalışma sonucunda IGF-1R azalması

radasyon indüklü DNA çift zincir kırıklarının tamirini geciktirdiği bulunmuştur. IGF-1R inhibisyonu özellikle NHEJ onarım defektini azaltmaktadır (Chitnis ve ark. 2014).

Gelişmekte olan beyindeki NHEJ aktivitesinin kaybı, prenatal ölüme neden olmaktadır. Yetişkinlerde ise nörodejeneratif hastalıklara yol açabilmektedir. AD olan kişilerde yapılan çalışmalarda reaktif oksijen/nitrojen türleri, deregülyasyona ve replikasyon stresi olarak bilinen yetersiz DNA replikasyonuna neden olduğu bulunmuştur. AD patogenezindeki replikasyon stresi, deregüle olan hücre döngüsü ve tercihen A $\beta$  birikiminden kaynaklanan genomik kararsızlığa yol açabilmektedir. Bu durumlara ek olarak post mitotik nöronlarda defektif DNA onarım sistemlerin varlığı da daha çok DNA hasarları ve daha çok genomik kararsızlığa neden olmaktadır. Aynı zamanda AD beyinlerinde gözlemlenen DNA içeriğindeki intrasellüler artış bu kombine olaylardan kaynaklanabilmektedir. Yapılan çalışmalarda DNA-PK mutant hücrelerin stres altında replikasyonu durdurmada başarılı oldukları rapor edilmiştir. AD beyinlerinde DNA-PK ve Ku protein seviyelerinin yanı sıra azalan NHEJ aktivitesi gösterilmiştir. Aynı zamanda normal yaşlı beyinlerde DNA-PK ve Ku protein seviyelerinin azaldığı gösterilmiştir (Shackelford ve ark. 2006 ; Chitnis ve ark. 2014; Kanungo, 2016).

DNA-PK ve p38 MAPK kombine olarak, Alzheimer sisteminin bir aşamasını belirleyebilmektedir. Normal yaşlanma esnasında, DNA-PK komponentleri azaltıldığından onarılmamış DSB'ler, sürekli p38 MAPK aktivasyonunu başlatmak için yeterli olmayan bir düzeyde oluşabilmektedir. Aksine, Alzheimer vakalarında, DSB'lerin eşik seviyesi, p38 MAPK aktivasyonunu indükleyerek A $\beta$  üretimini arttırabilmektedir (Kanungo, 2017).

Litarürde antiaging gen olan Klotho ve DSB onarım mekanizmasının (NHEJ) yaşlanma ile bağlantısı ayrı ayrı birçok çalışmada gösterilmiştir. Fakat literatürde Klotho protein ile NHEJ yolağı arasındaki ilişkiyi inceleyen çalışma bulunmamaktadır. Çalışma kapsamında, literatürde ilk defa olarak Klotho proteininin NHEJ yolağında etkisi, bu yolda iş yaptığı bilinen Ku70/Ku80 ve DNA-PK genlerinin ekspresyonu ve proteinlerin işlevi araştırılarak belirlenmesi hedeflenmektedir. Bunun için kullanılan hippokampal hücre serileri ile bu hücrelerde de NHEJ yolağının ve aynı zamanda NHEJ tamir yolağının yaşlanma patogenezindeki rolünün anlaşılması hedeflenmiştir.

### 2.3. ANTI-AGING VE ANTI-AGING GENLER

Medikal anlamda antiaging bir yandan yaşam tarzı değişiklikleri, koruyucu hekimlik uygulamaları, eğitim ve hijyen, modern ve alternatif tıbbı ait ilaç ve yöntemlerle kişinin yaşam kalitesini veya ortalama yaşam süresini artırmayı amaçlarken; bir yandan da moleküler ve genetik anlamda çalışmalarla insanın maksimum yaşam süresinin uzatılması konusunda çalışmaları hedeflemektedir.

Yaşlanma kaçınılmaz fakat uzatılabilir bir süreçtir. Genler ve kodlanmış proteinleri, önemli büyüme faktörleri, sitokinler ve enzimlerin salgılanmasını değiştirerek yaşam süresinin uzamasında önemli bir rol oynamaktadır (Michaud ve ark. 2013). Bu konuda memelilerde çok fazla bilgi olmamakla beraber, bu organizmalarda, TOR (Target of Rapamycin) sinyalinin yaşlanmayı hızlandırdığı; sirtuin ve Klotho gibi genlerinin yaşam süresini uzattığı; AMPK (adenozin monofosfata bağımlı protein kinaz) aktivitesinin yaşlanmayı yavaşlattığı gösterilmiştir (Hoffmann ve ark. 2008).

#### 2.3.1.AMPK (Adenozin Monofosfata Bağımlı Protein Kinaz):

AMPK, ATP tükenmesinin bir sonucu olarak yüksek AMP / ATP oranlarına cevap olarak aktive edilen, enerji algılayan bir kinazdır. AMPK, AMP bağlaması ile tamamen aktif hale getirilmiş bir trimerik kompleks işlevi görmektedir. AMPK 1970'lerde 5'-AMP ile aktive olan bir protein kinaz olarak keşfedilmiştir (Kahn ve ark. 2005). AMPK, bir katalitik  $\alpha$  alt birimi ve iki düzenleyici alt birim ( $\beta$  ve  $\gamma$ ) tarafından oluşturulan evrimsel olarak korunmuş bir heterotrimerdir. Alt birim, AMPK'ya AMP: ATP oranını algılama yeteneğini vermektedir. Sonuç olarak, AMP'ye bağlı  $\gamma$  alt birim, AMPK heterotrimer kompleksinde,  $\alpha$  alt ünitesinin katalitik cebinin açığa çıkmasına ve AMPK kinazın aktivasyonuna izin veren büyük bir konformasyonel değişikliğe yol açmaktadır (Hardie ve ark. 2012).  $\alpha$  alt birimi ayrıca glikoz kıtlığı veya enerji krizi sinyalini, fosforilasyon olayları yoluyla sayısız alt protein hedeflerine iletmektedir. Örneğin, AMPK, lipid ve kolesterol sentezini baskılamak için asetil-CoA

karboksilazı 1 (ACC1) ve sterol düzenleyici element bağlayıcı protein 1c'yi (SREBP1c) fosforile etmektedir. AMPK, hasarlı mitokondri ve mitokondri biyogenezinin otofajisini arttırmak için ULK1'i fosforile etmektedir (Egan, 2011). Sonuç olarak, hücreler AMPK, glikoz ve enerji sensörü yardımıyla enerji homeostazını korumaktadır.

### 2.3.2. Sirtuinler

Hücreyi yaşlanma bağlantılı fonksiyon azalmasından korumada önemli rol oynayan bir protein sınıfı da sirtüinlerdir. Sirtüinlerin NAD-bağlı deasetilaz ve ADP-riboziltransferaz aktivitesine sahip olan bir protein sınıfı olduğu bilinmektedir. Memelilerde, hücre içinde farklı yerlerde lokalize olan 7 tane sirtüin bulunmaktadır (Haigis ve Guarente, 2009). Memelilerde, yedi sirtuin homoloğu (SIRT1–7), DNA sekanslarına göre dört sınıfa ayrılır. Sirtuinler tipik olarak korunmuş bir katalitik alan ve değişken N ve C terminal alanlarından oluşmaktadır. Sirt1, Sirt2, Sirt3 ve Sirt5 NAD-bağlı deasetilaz, Sirt4 ve Sirt6 ADP-ribozil transferaz aktivitesine sahiptir. Sirt7 için henüz hiçbir enzimatik aktivite tanımlanmamıştır (Yu ve ark. 2009).

Memeli sirtüinleri arasında Sirt2 proteinine en yakın homolog olarak gösterilen Sirt 1' dir (Yu ve ark. 2009). Sirt1 nükleus, Sirt2 sitoplazmada, Sirt3, Sirt4 ve Sirt5 mitokondride, Sirt3 ise hem nükleus hem mitokondride bulunur. Sirt6 ve Sirt7 ise nükleer sirtüinlerdir (Yamamoto ve ark. 2007).

Sirtuinler, bakterilerden insanlara geniş ölçüde korunan proteinlerdir. Memeli sirtüinlerinin DNA onarımı, metabolik regülasyon, yaşlanma ile ilgili hastalıklar ve diğer birçok konuda rolü olduğu bilinmektedir (Finkel ve ark. 2009). Birçok çalışma, sirtuinlerin çeşitli nörodejeneratif hastalıklara aracılık ettiğini göstermiştir (Guarente, 2011). Bu çalışmalarda sirtuinlerin ekspresyon seviyeleri yaşlanma ve patolojik değişikliklerden etkilenmiş gibi görünmektedir.

### 2.3.3. Antiaging Gen Klotho

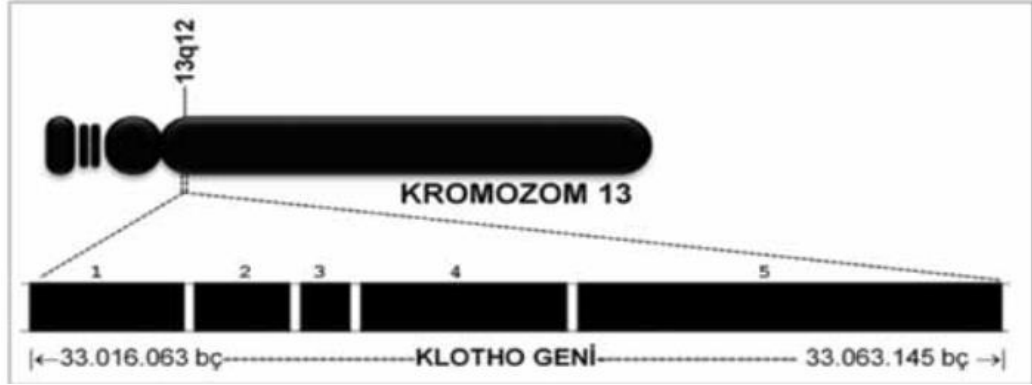
Yaşlanma mekanizmalarını araştıran bir Japon araştırmacı grubu 1997'de buldukları bir gene Klotho'nun adını verdiler. Yunan mitolojisinde Klotho, Lachesis ve Atropos adlı üç tanrıça, yaşamın ipliğini belirlemekte, karar vermekte ve kontrol etmektedir. Bunlar arasında, Klotho ilk kez farelerde tanımlanan gendir ve ‘yaşam ipliğini eğirmek’ anlamına gelmektedir. Farelerde Klotho geninin mutasyonuna bağlı olarak 3 haftaya kadar normal gelişme göstermekte daha sonra gelişmeleri yavaşlamakta ve yaşlanma belirtilerindeki artışla birlikte 8-9 hafta içerisinde öldükleri bir tablonun ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Moleküler düzeyde yapılan analizler, farelerde bu fenotipik özelliklerin ortaya çıkmasında KL geninin normal işlevini yapamadığını göstermiştir (Kuro-o ve ark. 1997).

Farede 5. Kromozom üzerinde lokalize olan KL geninin, insan genomunda 13. kromozomun q kolunda yer aldığı saptanmıştır. Bu gen tarafından kodlanan insan KL proteini fare proteini ile % 86 oranında homoloji göstermektedir (Matsumura ve ark. 1998). Klotho proteini Klotho geni tarafından kodlanmaktadır. Fare KL gen lokusu, kromozom 5, sıçanlarda kromozom 12 ve insanlarda kromozom 13'te bulunmaktadır. Tablo 2.1'de Klotho gen ve proteinin insan ve rodentler arasında karşılaştırılması gösterilmiştir.

Tablo 2.1’de Klotho Gen ve Proteinin İnsan ve Rodentler Arasında Karşılaştırılması

	İnsan	Rat	Mouse
<b>Klotho Gen</b>			
Kromozom	13q12	12q12	5q12
Gen boyutu (kb)	50		50
Ekzon sayısı	5	5	5
cDNA (kb)	5.2	5.2	5.2
<b>Klotho Protein</b>			
Membran Protein (aa)	1012	1014	1014
Salgılanan Protein(aa)	549	NA	550
Soluble Protein (Kd)	130	130	130

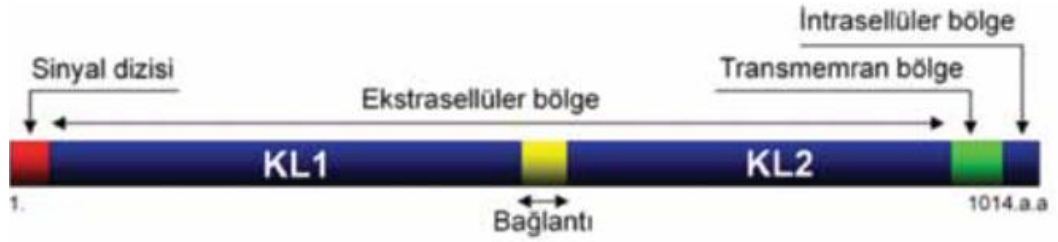
İnsan KL geni 5 ekzon ve 4 introndan oluşmakta ve 13. kromozom üzerinde yaklaşık 50 kilobaz çift’lik (kbc) bir bölgeyi işgal etmektedir. Klotho, plazma membranında ve golgi aparatında bulunmaktadır. Yaşlanmayı geciktirici olan bu gen tip 1 tek geçişli transmembran glikoproteinini (farelerde 1014 aminoasit, insanlarda 1012 aminoasit) kodlamaktadır (Kuro-o ve ark. 1997, Shiraki-Iida ve ark. 1998, Imura ve ark. 2004). KL geninin yeri, komşu genler, farede olduğu gibi her iki türde de aynı olduğundan, sinerjiktir (Matsumura 1998). Şekil 2.4’ de insan KL geni gösterilmektedir.



Şekil 2.4: İnsan KL geni

KL geni üzerinden kodlanan hnRNA'ların alternatif işlenmesi sonucunda oluşan iki farklı mRNA'dan membrana bağlı (130 kD ağırlığında) ve salgılanan formda (70 kD ağırlığında) iki farklı KL proteini sentez edilmektedir (Shiraki-Iida ve ark. 1998). Membran KL proteini amino-terminalinde kısa bir sinyal dizisi, karboksi-terminalinde ise transmembran bölgesi taşır. Bu proteininin yaklaşık 980 amino asitlik bir kısmı ekstraselüler bölgeyi oluşturmaktadır. Hücre içerisinde kalan intraselüler bölge ise sadece 21 amino asitlik kısımdan oluşmaktadır. Membran KL proteinin ekstraselüler kısmı, KL-1 ve KL-2 olarak adlandırılan iki internal tekrar bölgesinden oluşur. KL-1 ve KL-2 tekrarları arasında kalan bölgede dört bazik amino asitlerden oluşan (Lys-Lys-Arg-Lys), proteolitik kesim için potansiyel hedef dizi yer alır (Chen ve ark. 2007; Bloch ve ark. 2009). KL1 ve KL2 katalitik domainlerin aminoasit sekansları glikolis hidrolaz (beta glikozidas) familyasının sekanslarıyla homologtur. Ancak insan ve farede bulunan  $\alpha$ Klothonun aktif merkezi glikozid hidrolazların aktif merkezine benzememektedir. Enzimatik kataliz için gerekli iki glutamat kalıntısı içermemektedir. Şekil 2.5 'de insan KL geni üzerinden alternatif işlenme sonucu kodlanan membran bağlı KL proteini ve salgılanan KL protein yapısı gösterilmektedir.

A



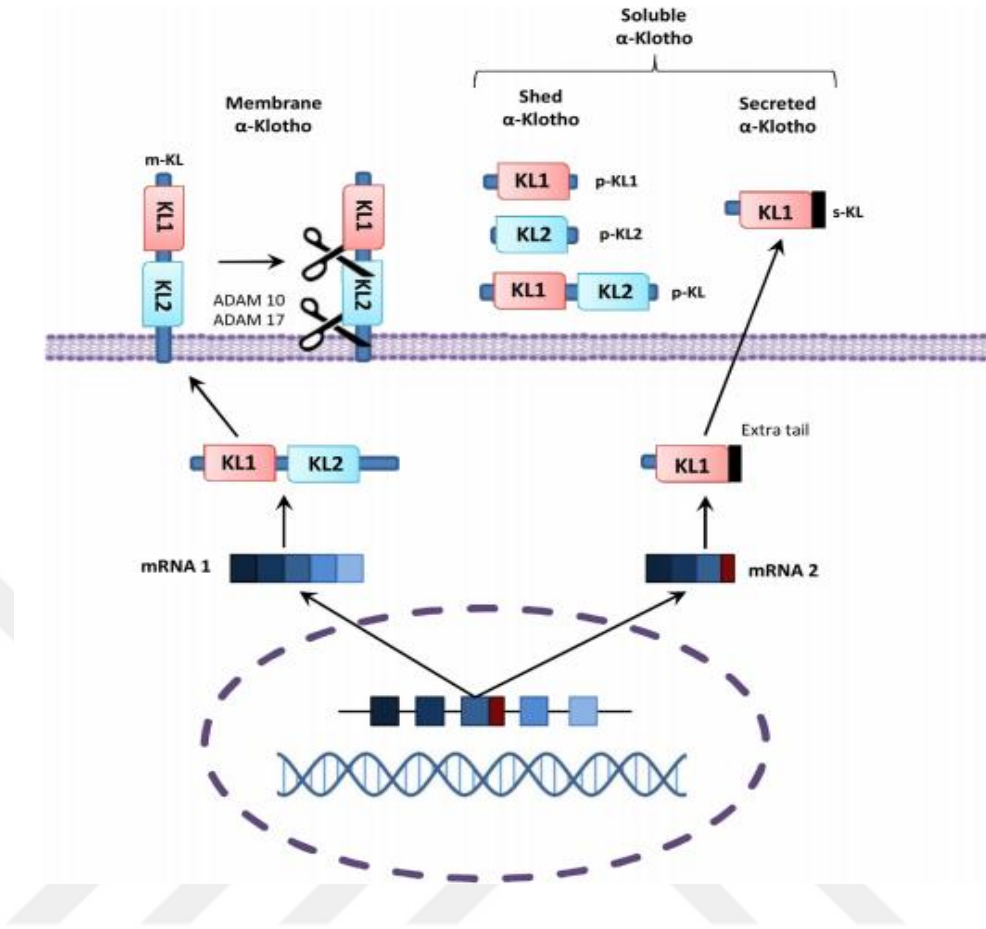
B



Şekil 2.5 :İnsan KL Geni Üzerinden Alternatif İşlenme Sonucu Kodlanan Membran Bağlı Kl Proteini (A) ve Salgılanan Kl Proteini (B) Yapısı (Çağlayan ve Turan, 2014)

Klothonun ekstrasellüler domaini ADAM10, ADAM17 ve  $\beta$ -sekretaz  $\beta$ -APP yarma enzimi 1 (BACE1) gibi metalloproteinaz enzimleri ile kesilebilmektedir ve kanda ürede ve serebrospinal sıvı içine salınmaktadır (Kurosu ve ark. 2005; Imura ve ark. 2004). Kl proteinin salgılanan bu formu ekstrasellüler KL2 tekrarı, transmembran bölge ve intrasellüler bölgeyi taşımaz (Bloch ve ark. 2009). Klotho'nun büyük ekstrasellüler domaini fonksiyonunu yerine getirmek için ayrılır ve kan içine salgılanır. Böylece hücre membran Klotho reseptörü tarafından tanınan hormonal bir faktör olarak davranarak bağlanma gerçekleşir (Çağlayan ve Turan, 2014). Şekil 2.6' da farklı Klotho formları ve oluşumları gösterilmektedir.





Şekil 2.6: Farklı Klotho Formları ve Oluşumları (Cararo-Lopes ve ark. 2017)

Tam uzunluktaki  $\alpha$ Klotho proteini (mK1), esasen böbreklerde ve beyin koroid pleksusunda eksprese edilmektedir. Tam uzunluktaki  $\alpha$ Klotho proteini hücre zarında bulunmaktadır. Pek çok membran bazlı protein, N veya O bağlı glikosilasyon ile modifiye edilmektedir ve daha sonra hücre zarına translokasyona tabi tutulmaktadır. Bununla birlikte,  $\alpha$ Klotho proteininin glikosilasyon modifikasyonu için herhangi bir kanıt yoktur. Amino asit sekansına dayanarak birkaç N-glikozilasyon bölgesi öngörülmüştür (Xu ve Sun, 2015). mK1, kemik türevli fosfatürik hormon FGF23 için koreseptörler oluşturmak üzere fibroblast büyüme faktörü reseptörleri (FGFR'ler) ile birleşmektedir. FGF23'ün N-terminal bölgesi FGFR'lerle etkileşime girer ve FGF23'ün C-terminal bölgesi  $\alpha$ Klotho (Ichikawa ve ark. 2007 ; Yamazaki ve ark. 2008 ; Goetz ve ark. 2010 ) ile etkileşime girmektedir.

Çözünebilir  $\alpha$ -Klotho, zardaki hem geçici reseptör potansiyel katyon kanalı alt ailesi V'in (TRPV5) hem de renal dış medüller potasyum kanalı (ROMK) l'in ekspresyonunu arttırmaktadır. Bu proteinler, böbrek epitel hücre zarında önemli hem  $Ca_2^+$  hem de  $K^+$  emilim kanallarıdır (Xu ve Sun, 2015). TRPV5 ve  $\alpha$ Klotho ile cotfekte edilmiş HEK293 hücrelerinde,  $Ca_2^+$  alımı,  $\alpha$ Klotho ifadesi ile orantılı olarak artmaktadır (Asai ve ark. 2012). Çözünebilir  $\alpha$ Klotho'nun çoklu iyon kanallarını nasıl düzenlediğini ve iyon akışının yaşlanma sürecine nasıl katkıda bulunduğunu değerlendirmek için gelecekteki çalışmalarda ilgi çekici olacaktır.

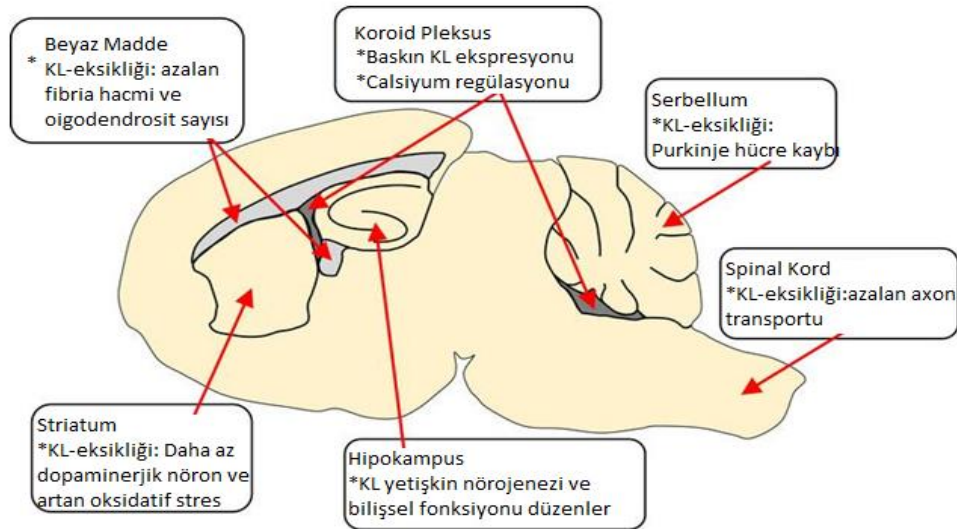
Salgılanan  $\alpha$ Klotho (sKl), dolaşımdaki Klotho'nun ana şeklidir. Hücre zarından salınmasından sonra, dolaşımdaki sKl uzak organları veya dokuları üzerindeki biyolojik etkilerini uygulamaktadır. Salgılanan  $\alpha$ Klotho proteini, KL1 alanında, asit / baz bölgesinin mutasyona uğradığı ve nükleofil sahasının korunduğu sadece bir sinyal peptidi içermektedir (Xu ve Sun, 2015). Salgılanan Klotho'nun oluşumunun ve düzenlenmesinin doğasını ve salgılanan Klotho'nun etki mekanizmasını belirlemek için, Klotho'nun bağlayıcı bölgelerinin veya alıcılarının tanımlanması ve karakterizasyonu dahil olmak üzere daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

Klotho geninin ekspresyonu dokuya özgüdür. Beyinde ve koroid pleksus gibi dokularda yüksek ekspresyon seviyesi gözlemlenmiştir. Beyindeki  $\alpha$ Klotho formlarının lokalizasyonu ve dağılımı henüz bilinmemektedir. Klotho formları ve Klotho gen ekspresyonunun değerlendirilmesi  $\alpha$ Klotho kodlayan türlerin mRNA lokalizasyon verilerine dayanmaktadır.

İnsutu hibridizasyon ve immünohistokimyasal çalışmalar koroid pleksus ependimada Klotho genin en yüksek ekspresyon seviyesini göstermiştir (Li ve ark. 2004). Koroid pleksusun yanı sıra,  $\alpha$ Klotho kodlayan mRNA birçok beyin yapısında (serebellum içindeki purkinje hücreleri, beyin korteksi, hipokampus striatum ve medulla oblangata) bulunmaktadır. Clinton ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışma, Klotho protein ve mRNA'nın erken postnatal gelişim sırasında oligodentritler ve nöronlarda bulunan beyin parankima boyunca belirlenebildiğini göstermiştir (Clinton ve ark. 2013). Daha sonra yapılan çalışmalar Klotho'nun, CNS olgunlaşma ve yaşlanma sırasında çeşitli yapıları ve fonksiyonları etkileyebilen bir protein olduğunu ileri sürmüştür (Dubai ve ark. 2014). Aynı zamanda  $\alpha$ Klotho beyindeki beyaz maddede de

bulunmaktadır. Farelerde ve sıçanlarda beyaz maddenin analizi ,  $\alpha$ Klotho seviyesindeki azalmanın yaşlı hayvanlar için ortak bir özellik olduğunu göstermiştir (German ve ark. 2012). Protein markırları ile  $\alpha$ Klothonun kolokalizasyonu ile ilgili deneysel verilere göre,  $\alpha$ Klotho proteini nöronlarda ve oligodendrositlerde bulunmaktadır.  $\alpha$ Klotho, hipokampal nöronların dendritlerinde lokalizedir (Li ve ark. 2017).

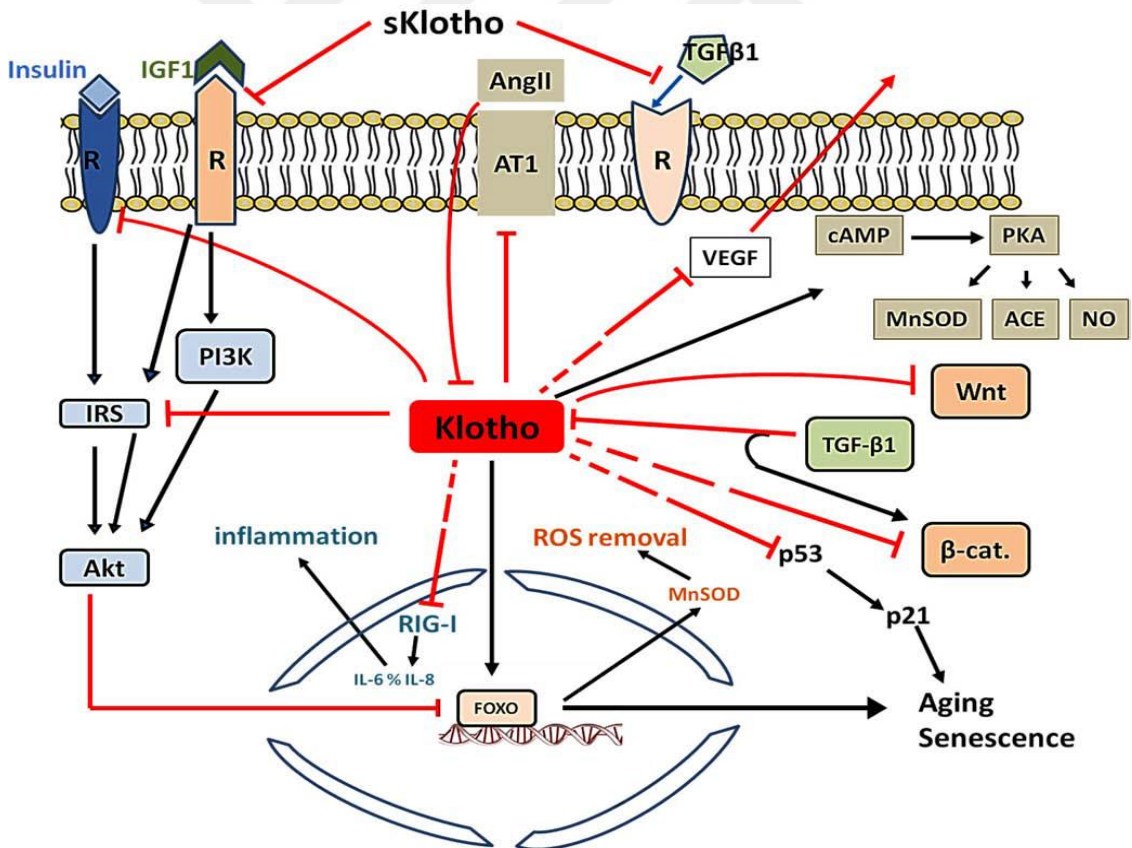
Hipokampus beynin öğrenme ve hafıza işlevi için kritik bir merkezdir. Hipokampus da normal yaşlanma ve nörodejeneratif hastalıkların neden olduğu fonksiyon bozukluğuna duyarlılığı için yoğun bir şekilde çalışılmıştır. Bu nedenle, hipokampus KL protein fonksiyonunu anlamak ve biliş ve hafıza fonksiyonunu artırma potansiyelini belirlemek için önemli bir bölge olmaya devam etmektedir. KL eksikliği olan hipokampusun erken karakterizasyonu, oksidatif stresin arttığına, apoptozis markörlerinin artışına ve artmış stokastik nöron ölümüne dair kanıt göstermiştir (Nagai ve ark. 2003;Shiozaki ve ark.2008). Beyindeki Klotho gen ekspresyonunun bölgesel ve hücresele özgüllüğü ve bunun bilinçsel fonksiyonlarına etkisi göz önüne alındığında,  $\alpha$ Klotho'nun bir organizmanın gelişimi ve yaşlanması sırasında beyin yapılarını ve fonksiyonlarını belirgin bir şekilde etkilediği düşünülmektedir. Şekil 2.7' de KL ile ilişkili beyin bölgeleri ve KL proteinleri, beynin nöronal ve nöronal olmayan bölgelerinde etkisi gösterilmektedir.



Şekil 2.7: KL İle İlişkili Beyin Bölgeleri ve KL Proteinleri, Beynin Nöronal ve Nöronal Olmayan Bölgelerinde Etkisi (Voa ve ark. 2018).

Farklı hücre dışı sinyallerin çokluğu, onların reseptörleri ve hücre içi sinyal iletim yolları oldukça az sayıda sınıfa ayrılır ve esas amaç, benzer sinyal yollarının genellikle farklı hücrel süreçleri nasıl düzenlediğini anlamaktır. Aksine aynı hücre içindeki aynı sinyal iletim bileşenlerinin farklı reseptörlerle aktive edilmesi sıklıkla farklı hücrel cevaplara yol açmaktadır. Sinyal yollarının ve yollarla proteinlerin bağlantılı olması özgül tedavilerin tasarlanması için önemli moleküler ipuçları sağlayacaktır (Lodish ve ark. 2011).

Klotho, bazı önemli intrasellüler sinyal yollarının (IGF-1, FGF23, cAMP, PKC, TGF- $\beta$ , p53/p21 ve Wnt) regülasyonuna katılmaktadır. Araştırma sonuçları KL geninin, memelilerde yaşlılık sürecinde ve yaşlanma ile ilgili hastalıklarda önemli rol oynadığını göstermiştir. Şekil 2.8’de Klotho proteininin hücre içi sinyal yollarına katılımının şematik görünümü gösterilmiştir.



Şekil 2.8: Klotho Proteininin Hücre İçi Sinyal Yollarına Katılımının Şematik Görünümü (Sopjani J. ve ark. 2015).

Çeşitli çalışmalarda hücre yüzeyinde FGF23-Klotho kompleksinin oluşumunu ve ardından Erk1/ 2, p38, JNK, AKT, IκB ve GSK-3β (Li ve ark. 2011; Urakawa ve ark. 2006) fosforilasyonu da dahil olmak üzere aşağı yöndeki sinyal yollarının aktivasyonu gösterilmiştir (Medici ve ark. 2008). FGF23'ün sinir dokusunun gelişiminde herhangi bir rol oynayıp oynamadığı hala bilinmemektedir. Bununla birlikte, FGFR substrat 2'nin (FRS2) fosforilasyonunun, eksojen αKlotho ile hücrelerin tedavisi altında uyarıldığı, FRS2, Akt ve ERK'dan yukarı doğru bir FGF aracılı sinyal yolunun bir pozitif regülatörü olduğu ve daha sonra FGF reseptörünün aktivasyonu sırasında oligodendrositlerde fosforile edildiği bulunmuştur (Bryant ve ark. 2009).

αKlotho'nun katalitik olarak aktif domeni ayrıca β glikosidaz aktivitesinden dolayı Na<sup>+</sup> / K<sup>+</sup> ATPaz'ı aktive etmektedir (Sopjani ve ark. 2011). Özellikle beyindeki koroid pleksusta, membran Na<sup>+</sup> / K<sup>+</sup> ATPazları αKlotho'nun β glikosidaz aktivitesi için substratlardır (Imura ve ark. 2007). Na<sup>+</sup> / K<sup>+</sup> ATPazlar, Src tirozin kinazlar ve IP3 alıcıları (inositol 1,4,5 trisfosfatla aktive Ca<sub>2</sub><sup>+</sup> kanalları) ile etkileşime girmektedir. Src kinaz ve Ca<sub>2</sub><sup>+</sup>'ya bağlı olarak Src kinazları ve hücre içi sinyal basamaklarını aktive etmektedir (Aperia ve ark. 2016). Ayrıca ERK'nin katılımını içeren Src bağımsız sinyal basamakları da aktive etmektedir (Madan ve ark. 2017).

Chen ve arkadaşları, αKlotho'nun hücre içi Akt ve ERK1 / 2 (MAPK) üzerindeki etkisine ilişkin bilgilere dayanarak, HEK293 ve göğüs kanseri hücreleri üzerinde in vitro çalışmalarda αKlotho'nun bu kinazlarla protein fosforilasyonunu ve bu kinazların fare beyninden OPC kültüründe fosforilasyonunu indükleyip indüklediğini çalışmışlardır. αKlotho'nun PTEN, 3-fosfinosit, bağımsız protein kinaz 1 (PDK1), Akt protein kinaz ve glikojen sentaz kinaz 3 (GSK3) gibi kinazların ve substratların fosforilasyonunu uyardığını bulmuşlardır. Bunun yanısıra ERK1 / 2'nin fosforilasyonu da indüklenmektedir. Bu çalışma, Akt sinyal yolunun ve daha az oranda ERK1 / 2 yolunun, αKlotho etkisi altında in vitro oligodendrosit farklılaşmasının artırılmasındaki katılımını göstermektedir (Chen ve ark. 2013).

P53 proteini hücre döngüsünün durması, apoptozis, senesens ve sağ kalmanın regülayonuna katılan kompleks sinyalleme ağının merkezinde bulunur. Klotho eksikliği,

yeni hücrelerin oluşumunu inhibe ederek ve yaşlanan hücrelerin sayısını artırarak p53 / p21'nin aşırı ekspresyonuna neden olmaktadır (Olivera 2006). SKI vasküler endotel hücrelerinde bir hormon gibi davranmaktadır. Çalışmalar sKI'in insan göbek dokusunda kaspaz 3 / kaspaz 9 ve p53 / p21 yollarını inhibe ederek vasküler endotel hücrelerinde H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kaynaklı apoptozu ve senesensi azalttığını göstermiştir. Bu nedenle, Klotho takviyesi, p53 / p21 sinyal yolunu inhibe ederek hücrel yaşlanmayı azaltmaktadır (Ikushima ve ark. 2006). Bununla ilgili olarak p53/p21 bağımlı yolak sayesinde hücrel yaşlanmanın Klotho duyarlı inhibisyonu, Akt/PKB inaktivasyonunu direk ya da indirek gerçekleştirebilmektedir (Miyachi ve ark. 2004).

Klotho geninin aşırı ifade edilmesinin yaşam sürecini uzatma mekanizmasındaki temel etkinin insülin/ IGF sinyal yolağını baskılaması üzerine olduğu ileri sürülmektedir (Kenyon, 2011). İnsülin-benzeri sinyalleşmenin baskılanması ömrün uzamasını indükler. Bu durum oksidatif strese (Oxr) ve diğer stres uyaranlarına direnç oluştururken, mitokondride reaktif oksijen türlerinin yok edilmesini sağlayan Mn superoksit dismutaz (SOD) gibi birçok stres-savunma-ilişkili enzimin sentezlenmesini de artırır. Böylece, değişmiş IGF sinyalleşme yolağında ortaya çıkan insan IGF1R'deki genetik değişiklikler, insan ömrünün modülasyonunda bu yolağın bir rolü olduğunu düşündürecek şekilde, insan ömrünün uzamasına yakınlıkta bir artış sağlar (Kuro-o ve ark. 2009). Klotho aynı zamanda insülin/IGF sinyal yolağı tarafından baskılanan forkhead transkripsiyon faktörünü (FoxO) aktive etmektedir (Kops ve ark. 2002). Yapılan son çalışmalarda, Klotho FoxO3a'nın PI3K/AKT aracılı fosforilasyonunu inhibe ettiği ve böylece FoxO3a'nın manganez süperoksit dismutaz (MnSOD) promotörüne bağlanmasını hızlandırdığı bulunmuştur. Sonuç olarak mitokondride MnSOD mRNA ve protein seviyeleri arttığı ileri sürülmüştür (Lim ve ark. 2017).

$\alpha$ Klotho'nun beyindeki sinyal iletim yolları ile etkileşimi hakkında nispeten az veri vardır ve  $\alpha$ Klotho'nun transkripsiyon faktörlerinin sentez / aktivite seviyelerini nasıl değiştirdiği hakkında çok az şey bilinmektedir. Son yıllarda Alzheimer hastalarında insülin / IGF sinyal yolağı ile bağlantılı çalışmalar bulunmaktadır. Yokoyama ve arkadaşlarının yaptığı çalışmalarda KL varyantlarının uzun ömürlülüğe olan genetik etkileri araştırılmış ve bu varyantların beyin yapısal ve fonksiyonel bütünlüğünü desteklediği bulunmuştur (Yokoyama ve ark. 2015). Ayrıca, yüksek serum Klotho

düzeyleri Alzheimer ve yaşlanmaya karşı savunmasız olan beynin önemli fonksiyonel ağlarındaki daha büyük intrinsik bağlantılı ölçümlerle ilişkilendirilmiş ve yükselen Klotho seviyelerinin kritik beyin bölgelerinin ağ bağlantısının artmasıyla güçlü bir beyni teşvik ettiği ileri sürülmüştür (Yokoyama ve ark. 2017). Yapılan bir çalışmada insulin / İGF sinyal yolağı inhibisyonunun homolog olmayan uç birleştirme yolağı tamir mekanizmasını geciktirdiği bulunmuştur (Chitnis ve ark. 2014).

Yapılan çalışmalarda oksidatif stres ve sonucunda oluşan serbest oksijen radikallerinin hücre ölümüne neden olduğu belirtilmiştir. Klotho proteininin fazla miktarda sentez edilmesi anlamlı olarak oksidatif strese direnç kazandırarak yaşlanma sürecini yavaşlatmakta ve yaşam süresini uzatmakta olduğu bilinmektedir. Bunun yanı sıra oksidatif hasara ve nöronal hücre ölümüne yol açan reaktif oksijen türlerinin üretimi, Alzheimer hastalığını içeren nörodejeneratif hastalıkların patogenezinde önemli bir rol oynamaktadır (Zeldich ve ark. 2014). Fareler ile yapılan çalışmalarda yüksek  $\alpha$ Klotho gen ekspresyonunun dopaminerjik nöronları, apoptoz sinyali düzenleyici kinazı 1 (ASK1) ve p38MAPK sinyal yollarının modülasyonu yoluyla oksidatif hasardan koruduğuna dair kanıtlar vardır (Brobey ve ark. 2015).

#### **2.4. DNA TAMİRİ VE YAŞLANMA**

Doğal şartlar altında, DNA sürekli olarak ya ekzojen çevreden gelen (UV ışığı, iyonize radyasyon ve kimyasal ajanlar) ya da endojen metabolik süreçlerden kaynaklanan (reaktif oksijen türevleri, replikasyon çatal kırıkları vb.) sayısız risk faktörüne maruz kalmaktadır. Bu risk unsurları, sürekli olarak normal DNA kodlanmasını tehdit eder ve DNA hasarına neden olur. Bu yüzden hücreler genomik bütünlüğünü korumak amacıyla çeşitli onarım mekanizmaları geliştirmişlerdir. Bunlar doğrudan ve doğrudan olmayan onarım mekanizmaları olarak iki ana gruba ayrılır (William ve ark. 2002). Doğrudan olmayan onarım; proof-reading ile onarım, kesip çıkarma ile onarım (baz kesip çıkarma ve nükleotid kesip çıkarma), çift zincir kırıklarının onarımı (homolog rekombinasyon ve homolog olmayan rekombinasyon ile onarım), yanlış eşleme onarımı ve SOS onarımı şeklinde sıralanırken; doğrudan onarım

ise; fotoreaktivasyon ile onarım, O6-MGMT ile onarım, basit tek zincir kırıklarının onarımı şeklinde olabilmektedir.

DNA hasarının pek çok tipi arasında DNA çift zincir kırıkları (DSB) nadir oluşan, fakat çok ciddi olumsuz sonuçları olan bir mutasyon şeklidir. DSB, iki tip yolak sayesinde onarılabilir. Homolog rekombinasyon (HR) ve homolog olmayan uç birleştirme (NHEJ).

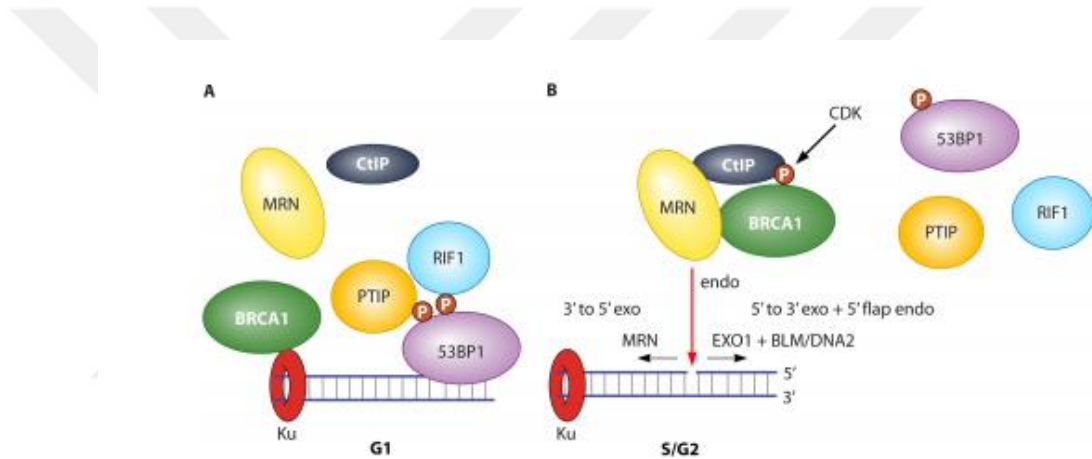
Son yıllarda yapılan çalışmalarda, maya ve diğer ökaryotlarda korunan DNA son rezeksiyonu yollarının genetik gereksinimlerinin anlaşılması konusunda büyük ilerleme kaydedilmiştir. Önemli olarak, maya ve insan proteinleri ile DNA uç rezeksiyon reaksiyonlarının in vitro olarak oluşturulması ile önemli sonuçlar elde edilmiştir. DSB onarım yolu seçiminin muhtemelen kromatine bağlı faktörler, hücre döngüsüne bağlı düzenlemeler, NHEJ ve HR onarım makineleri arasındaki koordineli etkileşim dahil olmak üzere çoklu düzenleme mekanizmaları tarafından belirlendiğine dair çalışmalar vardır.

HR tercih edilen DSB onarım yolu olduğunda DNA-PK kompleksi hızlı bir şekilde tüm hücre döngüsü fazlarında DSB'lere yerleşmektedir. S aşamasında Ku, Ku70'in sütununda ve köprü bölgelerinde DNA-PKcs ile fosforile edilmektedir. Bu fosforilasyon, daha az katı bir DNA bağlanmasına yol açan ve DSB uçlarından Ku'nun salınımını teşvik eden yapısal bir değişime neden olmaktadır. Ku yer değiştirmesi, ya dsDNA'ya düşük bir afinite aracılık eder ya da MRN / CtIP proteinleri tarafından desteklenir. Bu, DSB uçlarını serbest bırakır ve sonuçta S fazında DSB onarımı HR-aracılı olarak sonuçlanan DNA uç rezeksiyonunun başlatılmasını sağlamaktadır (Shim ve ark. 2010).

NHEJ'in teşvik edilmesi DNA hasarı tepki faktörü 53BP1 ile homolojiye yönelik onarımı (HDR) engelleyerek işlev görmektedir. 53BP1, iki efektör proteini yoluyla rezeksiyon üzerindeki inhibisyonuna aracılık etmektedir : RIF1 ve PTIP, her ikisi de 53BP1 ile etkileşime giren 53BP1'in (Callen ve ark. 2013 ; Zimmermann ve ark. 2013) ATM'ye bağımlı fosforilasyonunu gerektirmektedir. Bu efektörlerin NHEJ'e neden olan rezeksiyonu nasıl bloke ettiği henüz bilinmemektedir. Rezeksiyon nükleazlarını, DNA uçlarına erişmelerini önleyerek ve / veya nükleazlar veya



kofaktörleri ile katalitik aktivitelerini hafifletmek için doğrudan etkileşimler yoluyla inhibe edebilirler. Başka bir çalışma ATM kinazın bir fosforilasyon hedefi olan 53BP1'i, DNA son rezeksiyonu negatif düzenleyicisi olarak tanımlamıştır. 53BP1'in G1'de (Bothmer ve ark. 2011 ) rezeksiyonu negatif olarak düzenlediği gösterilmiştir. BRCA1 ise rezeksiyona izin vermek için S fazında 53BP1'in çıkarılmasını desteklemektedir. Böylece rezeksiyonun oluşmasına izin verilmektedir (Bunting ve ark. 2010). Sonuç olarak, BRCA1'den yoksun hücrelerde, rezeksiyon S fazında yukarı doğru düzenlenmez ve replikasyonla ilişkili DSB'lerde uygunsuz NHEJ oluşur ve bu da büyük kromozomal düzenlemelere yol açmaktadır. Şekil 2.9'da DSB onarım yolu seçimi gösterilmiştir.



Şekil 2.9: DSB Onarım Yolu Seçimi (James ve Patric, 2014)

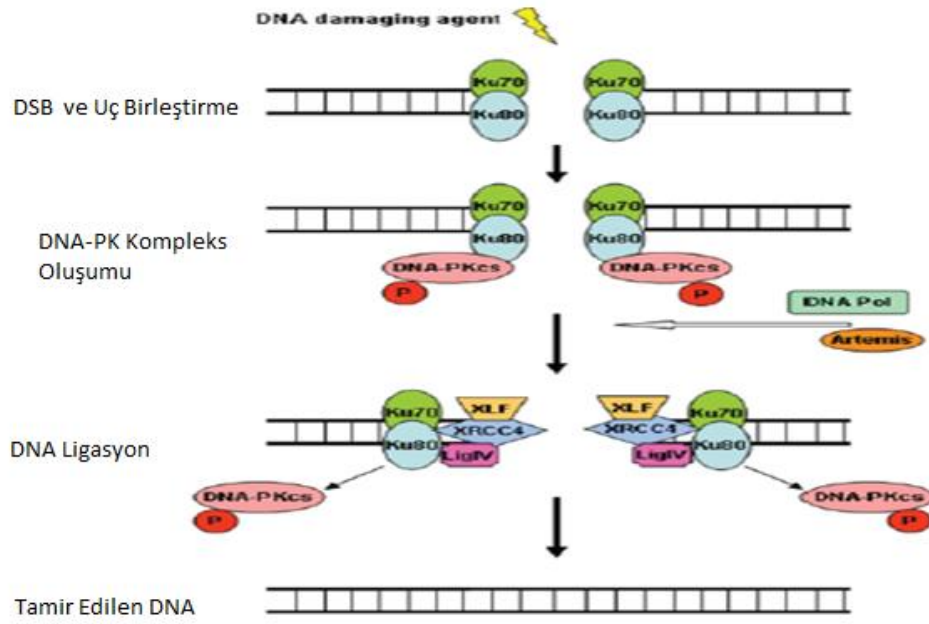
#### 2.4.1. Homolog Rekombinasyon (HR)

HR, tipik bir genetik rekombinasyondur ve homolog DNA sekansların varlığını gerektirmektedir. Hücre döngüsünün S/G2 fazında meydana gelerek direkt onarımı gerçekleştirir. Homolog rekombinasyon, DNA replikasyonunda DSBlerin hatasız bir şekilde tamir edilmesini sağlamaktadır. Bu işlemi şablon olarak birbirine yakın diğer kardeş kromatiti kullanarak yapar. Çoğalan hücrelerde bir kardeş kromatit bulunması durumunda bu işlem hücre döngüsünün geç S ile G2/M fazında HR'nin kısıtlanmasıyla gerçekleşmektedir. Ayrıca HR, mayoz I'de replikasyon çatallarının korunması, telomerlerin bakımı ve kromozom ayrımının korunması için de gereklidir.

HR, embriyonik sinir sistemi gelişiminin erken çoğalma aşamasındaki baskın DSB onarım yolu olarak bilinmektedir (Jeppesen ve ark 2011; Orii ve ark.2006).

#### **2.4.2.Homolog Olmayan Uç Birleştirme (NHEJ)**

DSB onarımı olan NHEJ; kırılan uçlarda homolog sekansların yönlendirmesi olmadan direkt olarak bağlanmasıyla karakterize bir tamir mekanizmasıdır. NHEJ hücre döngüsünün tüm fazlarında meydana gelebilmektedir (Lieber ve ark. 2010). NHEJ'in ilk aşaması, iki çift zincir kırıklı DNA bölgesine yakın ve uzak uçlardan doğrudan bağlanarak onu yıkılmaktan koruyan Ku70 ve Ku80 heterodimerik protein kompleksini gerektirmektedir. Ku70 ve Ku80 kompleksi aynı zamanda DNA-bağımlı protein kinaz katalitik alt birimi (DNA-PKcs) ile birleşmektedir. Bu multiprotein kompleksi DNA uçlarını stabilize eder ve hizaya sokar. Her bir çift zincir kırık uçlarında çift zincir kırıkların kompleksliliği ve uçların doğasına bağlı olarak farklı NHEJ faktörleri sürece dahil edilir. DNA-PKcs bir endonükleaz olan Artemisi aktive eder. Artemis komplementer nükleotid uzantılarını ortaya çıkarmak için kırık 3' ve 5' tek zincir çıkıntılarını düzeltir. Artemis tarafından sarkan uçların oluşturulmasından sonra XRCC4/ligaz 4 kompleksi tarafından ligasyon yapılarak NHEJ onarımının son adımı gerçekleştirilmektedir (Iyama ve Wilson 2013). Şekil 2.10'da Homolog olmayan uç birleştirme (NHEJ) mekanizması gösterilmiştir.



Şekil 2.10: Homolog Olmayan Uç Birleştirme (NHEJ) Mekanizması (Kanungo, 2016)

Ku proteini, 70 kD (Ku70/XRCC6) ve 80 kD (Ku80/XRCC5) alt ünitelerden oluşan bir heterodimerdir. NHEJ'deki ilk adım, Ku heterodimerin DSB'yi tanınması ve bağlanmasıdır. Ku heterodimeri DSB uçlarına bağlandığında, hasar alanına diğer NHEJ faktörleri olan DNA-PKcs, Xray çapraz tamamlayıcı protein 4 (XRCC4) ve DNA Ligaz IV proteinlerini toplamaktadır (Davis ve Chen, 2013).

Yapılan bir çalışmada hücre hatlarından biri olan Jurkat hücrelerinde Ku70 yüksek oranda eksprese edildiğinden shRNA ile Ku70 ifadesi düşürülerek, apoptoz ve hücre döngüsü ile ilişkisi araştırılmıştır. DNA hasarı onarım kapasitesi analiz edilerek ilginç bir şekilde hem NHEJ hem de HR onarım verimliliğinin Ku70 susturma işleminden sonra azaldığı bulunmuştur. Ek olarak, Ku70 eksikliğinin, apoptozun düzenlenmesindeki rolünü gösteren BAX gibi proapoptotik genlerin aşırı ekspresyonuna yol açtığını tespit edilmiştir. Ku70'in susturulmasının, Jurkat hücrelerinde birikmiş DNA hasarı ve DSB bozukluğu ile sonuçlandığı, daha fazla apoptoz, hücre çoğalmasını ve hücre döngüsü durmasını azalttığı gözlemlenmiştir (Yu ve ark. 2018).

NHEJ, DSB'nin Ku70 ve Ku80 alt birimlerinden oluşan Ku heterodimer tarafından algılanması ve bağlanması ile başlatılmaktadır (Mari ve ark. 2006; Uematsu

ve ark. 2007). Ku, dsDNA uçları için son derece yüksek bir afiniteye sahip bol miktarda bulunan bir proteindir, kırılmış DNA molekülünün uçları üzerine sekans bağımsız olarak kayan halka şeklindeki bir proteini oluşturmaktadır (Mimori ve ark. 1986; Dovns ve Jackson 2004). Ku70 / 80 DNA'nın şeker omurgasına bağlanır ve böylece DNA'ya bağlanma kabiliyetini açıklamaktadır (Walker ve ark. 2001). Bir DSB'nin indüksiyonunu takiben, Ku70 / 80, DNA hasara uğradığı bölgeye birkaç saniye içinde bağlanmakta ve bunu tüm hücre döngüsü fazlarında yapmaktadır (Shao ve ark. 2012 ; Britton ve ark.2013). Ku, DSB'ye bağlandıktan sonra, birincil işlevini, NHEJ makinesini DNA lezyonuna almak için bir iskele görevi gören NHEJ'de gerçekleştirir. Ku heterodimerinin DSB'lerde gerçekleştirdiği ikincil bir fonksiyon, kırık DNA molekülünün uçlarının tüm hücre döngüsü fazlarında bağlanma ve korunmalarında genel bir rol oynamaktır (Shao ve ark. 2012). Ku, kırık DNA molekülünün iki ucunu, in vitro bir sinaptik kompleksi oluşturarak bir arada tutar ve in vivo olarak DSB uçlarının pozisyonel stabilitesi için de gereklidir (Soutoglou ve ark.2007). Ku'nun DSB uçlarını sürdürme ve stabilize etmedeki rolünün onları spesifik olmayan işlemlerden korumaları olasıdır. Spesifik olarak Ku'nun, ekzonükleaz 1 ve Mre11 / Rad50 / Nbs1 kompleksini içeren DNA son işlem enzimlerini bloke ettiği gösterilmiştir (Sun ve ark. 2012).

Yapılan çalışmalar Ku70'in fosforile olduğunu ve bu fosforilasyonun, Ku heterodimerinin DNA'dan S fazında yer değiştirmesine yol açtığını göstermiştir. Fosforilasyon bölgeleri köprünün ilmek bölgelerinde ve Ku70'in sütun bölgelerinde bulunmaktadır. Bu kalıntılardaki fosforilasyon, dsDNA bağlanma kanalının genişlemesine ve daha az katı DNA afinitesine neden olmaktadır. Bu sonuçta Ku'nun dsDNA uçlarından kolayca kaymasına neden olmaktadır.

Lee ve arkadaşlarının yaptığı son bir çalışma, Ku70'in sütun ve köprü bölgelerinin birleşme yerindeki fosforilasyonun, Ku'nun DSB'lerden ayrışmasına aracılık ettiğini kanıtlamaktadır. Bu bölgelerdeki fosforilasyon, Ku70'in DSB uçlarına olan afinitesini azaltmaktadır. Ku70'in fosforilasyonunun, Ku heterodimerinin DNA uçlarından ayrılmasından sorumlu bir konformasyonel değişikliği indüklediğini düşündürmektedir. Ku70'in fosforilasyonunun ortadan kaldırılması, Ku'nun DSB'lerde sürekli tutulmasına yol açar, bu da DNA ucu rezeksiyonu ve HR'de, özellikle S fazında önemli bir düşüşe yol açmaktadır. HR'deki bu azalma, bu fosforilasyon bölgelerinin

NHEJ için gerekli olmadığından spesifiktir. Sonuçlar, Ku70 / 80'in DSB'lerden fosforilasyon aracılı ayrışmasının DNA uçlarını serbest bıraktığını, S fazında HR'nın başlamasına izin verdiğini ve memeli hücrelerinde bir DSB onarım yolu seçimi mekanizması sağladığını göstermektedir (Lee ve ark. 2016).

Ku80'in C-terminal bölgesi için protein / protein etkileşimleri yoluyla DNA-PK aktivitesini uyarmada rol oynamıştır; ancak, bu uyarıcı etkileşimlerin yeri ve kapsamı tartışılmaktadır. Yapılan çalışmalar, Ku80'in C-terminal bölgesinin, Ku heterodimer-DNA etkileşimi üzerinde büyük yapısal değişikliklere uğradığını ve Ku80'in C-terminalinin DNA-PKcs ile doğrudan etkileşime girdiğini göstermiştir (Harris ve ark.2004, Hammel ve ark. 2010).

Yapılan son bir çalışmada, Ku80'in C-terminalindeki farklı bölgelerin, Ku'nun bağlı olduğu DNA substratının yapısına bağlı olarak DNA-PK aktivitesinin uyarılmasından sorumlu olduğunu göstermektedir. Bu, Ku'nun DNA uzunluğuna, çıkımların varlığına ve çıkımların oryantasyonuna dayanan farklı DNA yapılarını tanıdığını ve ardından DNA-PK'yi farklı şekilde aktive ettiğini göstermektedir. Ek olarak, 5 'çıkıntılarındaki DNA substratları dizisinin DNA-PK aktivitesini değiştirebildiği de gösterilmiştir. İlginçtir ki, bu modülasyon Ku80 C-terminali yapısal bölgelerinden bağımsızdır ve ayrımcılığın DNA-PKcs ile içsel olduğunu göstermektedir. Ayrıca, DNA-PK aktivasyonu, in vivo olarak NHEJ yoluyla artan DNA onarımı ile paraleldir (Woods ve ark. 2015)

DNA hasarına bir yanıt olarak, PI3 kinaz ailesi üyelerini içeren pek çok kinazın ekspresyon ve aktivitesi değişmektedir. Bu kinazlardan biri olan DNA-PK 'nın enzimatik aktivasyonunun rolü tam olarak bilinmemekle beraber NHEJ'de önemli bir role sahiptir. DNA-PK, türler boyunca korunmuştur ve transkripsiyon, DNA rekombinasyon ve onarımına katılmaktadır. DNA-PK, katalitik altüniteden (DNA-PKcs) , p460 ve düzenleyici altüniteden (KU) oluşan bir holozenzimdir.

DNA-PKcs fosfatidilinositol-3 (PI-3) kinaz benzeri kinaz familyasının (PIKK) bir üyesidir, İki DNA hasarı duyarlı proteinleri ATM ve ATM / Rad3 ile ilgili proteini ATR de içermektedir (Abraham, 2004; Bakkenist, 2004). DNA-PKcs'nin N-terminal bölgesi, bir protein-protein etkileşim arayüzü olarak işlev gören HEAT (Huntington-

elongation-A-subunit-TOR) tekrarlarından oluşmaktadır. Proteinin C-terminal bölgesi PI3 kinaz alanını içerir, bunlar N-terminal olarak FAT (FRAP, ATM, TRRAP) alanı ile ve C-terminal olarak FATC (FAT C-terminali) alanı ile çevrilidir (Perry ve ark.2003, Hartley ve ark. 1995). DNA-PKcs'nin yapısal çalışmaları, proteinin N-terminal kısmının, muhtemelen dsDNA'ya bağlanan bir merkezi kanal oluşturan bir kısaç şeklinde bir yapı ürettiğini ve C-terminal alanlarının, kısaçların üzerinde oturan bir taç yapısını oluşturduğunu göstermektedir (Williams ve ark. 2008; Sibanda ve ark. 2010).

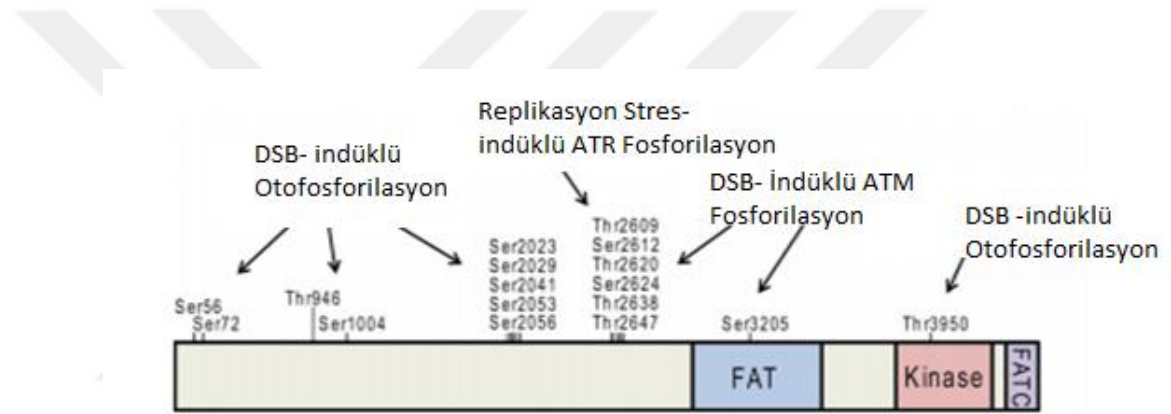
DNA-PK, memeli hücrelerinde DSB'nin onarımını başlatır ve kinaz aktivitesi ile NHEJ'i düzenlemektedir. DNA-PK, hem protein / DNA etkileşimlerini hem de protein / protein etkileşimlerini gerektirmektedir (Drouet ve ark.2006; Pawerczak ve Turchi, 2008). Aktivasyonun ardından DNA-PK, p53 ve RPA dahil olmak üzere birçok önemli hedefi fosforile etmektedir (Furuta ve ark. 2002 ;Woods ve ark. 2013). Daha önce DNA-PK'nın bağlı olduğu DNA'nın DNA-PK aktivasyonunu değiştirdiğini bildirilmiştir (Pawelczak ve ark. 2005 ). DNA'nın her dizisinin DNA-PK aktivasyonu üzerinde benzersiz bir etkisi vardır, çünkü 5 'ucu doğrudan kinazı aktive ederken, 3' ucu kopma boyunca DNA terminalini kavramaktadır. Bununla birlikte, DNA-PK'nın farklı DNA substratlarını tanıdığı ve bunlara tepki verdiği mekanizma bilinmemektedir (Pawerczak ve Turchi, 2008).

DSB'ye DNA-PKcs alımı, DNA-PKc'lerin doğrudan enzimin katalitik aktivitesinin aktivasyonu ile sonuçlanan DSB sonuna erişmesine izin veren dsDNA üzerinde içe doğru Ku heterodimerinin yer değiştirmesine neden olmaktadır (Calsou ve ark. 1999). Ku-DNA kompleksine bağlanmanın, DNA-PKcs'nin katalitik aktivitesini uyardığı mekanizma açıkça anlaşılmamıştır. Ku-DNA kompleksine bağlanmanın, PIK3 kinaz alanını çevreleyen FAT ve FATC alanlarında bir konformasyonel değişikliğe yol açtığını ve bu konformasyon değişikliğinin, katalitik grupların ve / veya ATP bağlama cebinin değişmesine neden olacağı tahmin edilmektedir (Davis ve Chen, 2013).

NHEJ'deki DNA-PKcs'nin fonksiyonu, protein kinaz aktivitesine sıkı sıkıya bağlıdır. DNA-PK' ların in vitro olarak çok sayıda proteini (Ku 70, Ku80, XRCC4 ve Ligaz 4) fosforile edebildiği gösterilmiştir. En iyi karakterize edilmiş DNA-PKcs substratı, DNA-PKcs'in kendisidir. in vitro yapılan ilk çalışmalar, DNA-PKc'lerin otofosforilasyona maruz kaldığını göstermiş ve bu, otofosforile edilmiş

DNA-PKc'lerin DNA'ya bağılı Ku'dan ayrılmasına neden olduğu gösterilmiştir (Lees-Miller ve ark.1990; Block ve ark. 2004). SAXS (Single Angle X-ray Acattering) kullanılarak yapılan bir çalışmada, DNA-PKc'lerin otoposforilasyonu konformasyonel değişikliğe neden olarak DNA-PK'lerin DNA'ya bağılı Ku'dan otoposforilasyonla indüklenen DNA-PKc'lerin salınımını teşvik edebileceğini gösterilmiştir (Dobbs ve ark.2010; Hammel ve ark. 2010).

Çok sayıda fosforilasyon bölgesi, DNA-PKcs 'in farklı bölgelerinde kümelenmiştir. Şekil 2.11'de DNA-PKcs proteini içinde fosforilasyon bölgeleri gösterilmiştir.



Şekil 2.11: DNA-PKcs Proteini İçinde Fosforilasyon Bölgeleri (Davis ve ark. 2014)

Fosforile edilmiş ve otoposforile edildiği tespit edilen iki önemli fosforilasyon bölgesi, threonine 2609 (T2609) ve serin 2056 (S2056)'dır. En iyi karakterize edilen DNA-PKcs fosforilasyon kümesi, treonin 2609 (T2609) kümesidir. T2609 bölgesinin fosforilasyonu DNA-PKcs kendisi, ATM ve ATR tarafından fosforile edilmiştir. Bu grupların fosforilasyonu NHEJ için önemlidir çünkü fosforilasyon yerlerinin mutasyonu sonucu DSB onarımı daha az etkili olmaktadır (Yajima ve ark. 2006; Chen ve ark. 2007). Ayrıca Ser2056 ve Thr2609 fosforilasyon kümeleri, DSB'nin uçlarının korunmasında rol oynayabilir. Ser2056'daki fosforilasyon DNA uç işlemlerini sınırlandırırken Thr2609 bunu desteklemektedir (Cui ve ark. 2005; Meek ve ark. 2007).

Thr2609 küme fosforilasyonu ve DNA-PKcs'nin konformasyonel değişimi, diğer DNA tamir molekülleri ile ilişkisini kolaylaştırmaktadır. DSB onarımında ATM ve Artemis arasındaki koordinasyon, Thr2609 kümesinde DNA-PKcs fosforilasyonunu

gerektirmektedir. Çünkü fosforlanmış DNAPKcs, Artemis'i DNA uçlarına alıp endonükleaz aktivitesini kolaylaştırmaktadır (Goodarzi ve ark. 2006).

DNA-PKcs'deki en kapsamlı çalışılan fosforilasyon olaylarından biri, ABCDE kümesinin otofosforilasyonudur (T2609, S2612, T2620, S2624, S2056, T2638 ve T2647). ABCDE bölgelerinde etkili bir otofosforilasyon yapamama yetersizliği, Rad51 odakları (HR'nin başlatılması) ABCDE / alanin mutantlarını eksprese eden hücrelerde geciktirildiği için alternatif DSB onarım yoluna müdahale edebilmektedir (Shibata ve ark. 2011).

Yapılan çalışmalarda, işlevsel bir Thr2605 kümesi (insan Thr2609) bulunmayan DNA-PKcs3A nakavt mutant farelerde erken ölümcül ve doğuştan kemik iliği yetmezliği görülmektedir. DNA-PKcs3A farelerinden türetilen hücreler, replikasyon stres maddelerine karşı oldukça hassastır ve birçok onarım yolunda bozulma göstermektedir. Bu bulgular, fizyolojik koşullar altında *in vivo* Thr2609 küme fosforilasyonunun kritik fonksiyonunu ve gereksinimini göstermiştir (Zhang ve ark. 2011).

DNA-PKcs'nin diğer iyi karakterize edilmiş fosforilasyon kümesi, serin 2056 (Ser2056) kümesidir Serine 2056, *in vivo* olarak DSB'lere yanıt olarak iyi niyetli bir otofosforilasyon bölgesidir ve Ser2056 kümesinin fosforilasyonu, NHEJ için bu kümenin fosforilasyonunun azaltılmasında, radyoaktif duyarlılığın artmasına ve daha az verimli DSB onarımına neden olduğundan önemlidir ( Cui ve ark. 2005; Chen ve ark. 2005). Meek ve arkadaşları tarafından S2056, bir *in vitro* DNA-PK fosforilasyon bölgesi ve bir *in vivo* otofosforilasyon sahası olarak tanımlanmıştır (Cui ve ark. 2005; Meek ve ark.2007). Gerçekten de, S2056'nın DNA hasarına cevaben fosforilasyonu, hücrelerde DNA-PK aktivasyonunun güvenilir bir göstergesi olarak yaygın şekilde kabul edilmektedir.



### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma için, Gaziosmanpaşa Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Komisyonun'dan (2018/38) kayıt numarası ile destek alınmıştır. Çalışmanın tamamı Gaziosmanpaşa Üniversitesi Tıp Fakültesi Hücre Kültürü Laboratuvarı ve Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Laboratuvar'ında yapılmıştır. Çalışmamızda Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalından (Doç.Dr. Betül Karademir) sağlanan hipocampal nöronal hücre hattı olan HT22 kullanılmıştır.

Çalışmamız hücre kültürü ve moleküler analizler olmak üzere iki kısımdan oluşmaktadır. Deneyin hücre kültürü aşamasını, hücre hatlarının pasajlanması ve hücrelerin testler için hazırlanması; moleküler analiz aşamasını da, kontrol ve etken madde verilmiş hücrelerden Klotho, Ku70, Ku80, DNA-PK ve Aktin Beta (housekeeping gen) gen ekspresyonları için total RNA izolasyonu, total RNA konsantrasyonunun hesaplanması, total RNA'lardan cDNA sentezlenmesi, Real Time PCR (RT-PCR) analizi ve aynı genler için Western Blot yöntemi ile Klotho, Ku70, pKu70, Ku80, DNA-PK, pDNA-PK ve Aktin Beta protein ekspresyonları oluşturmaktadır.

#### 3.1. ÇALIŞMADA KULLANILAN ARAÇ VE GEREÇLER

1. CO<sub>2</sub> İnkübatörü (Membert)
2. Laminar Akımlı Kabin (Labgard Class II)
3. Santrifüj ( Rotofix 32/ 1205 WorkNR)
4. Işık Mikroskobu (İnverted Microscope)
5. Buzdolabı (+4 °C Uğur)
6. Hassas Terazı (Kern, ABJ 220-4M)
7. -20°C Buzdolabı (Hoier Bio- Medical )

8. -86°C Buzdolabı (Nuare NU-9483E)
9. -196 °C Azot Tankı (Cryogenics 43355)
10. Sıcak Su Banyosu (Membert WNB14)
11. Steril filtre (Sartorius lot: 70975103)
12. Flask: TC Flask, 75 cm<sup>2</sup>/ 25 cm<sup>2</sup> (SPL 18B70TM110002)
13. Falcon Tüp (Labsolute lot: 50CB027)
14. Kriyo Tüp (Biologix 81-8204)
15. Serolojik Pipet (5 ve 10 ml / Costar strpipette lot: 31815007)
16. Mikropipet (1000, 200, 10µl / Gilson)
17. Mikroplate Okuyucu (Heales MB-530)
18. Soğutmalı Santrifüj (Mikro 200R)
19. RT-PCR (Life Technologies (ABI) marka Stepone Plus cihazı)
20. Buffer Core Dikey Jel Sistemi Tankı

## **3.2. ÇALIŞMADA KULLANILAN KİMYASALLAR VE ÇÖZELTİLER**

### **3.2.1. Hücre Kültüründe Kullanılan Kimyasallar**

1. DMEMHA Hücre Besiyeri Ortamı (Capricorn lot: CP18-2212)
2. PBS (Capricorn CP18-2007)
3. Tripsin EDTA (Gibco lot: 25200056)
4. Fötal Dana Serumumu (Capricorn lot:CP18-2138)
5. L-Glutamin (Capricorn lot: CP17-1725)
6. Penisilin/Streptomisin (Gibco lot: 1953092)
7. DiMetil Sülfoksit (Sigma S2BE1610V)

8. Etanol (Tekkim lot: 020118185001)
9. XTT (Biotium lot: 30007)
10. 6 Well Hücre Kültür Plate (Costar lot: 31712035)
11. 96 Well Hücre Kültür Plate (Costar lot:199120301)
12. Endosülfan (Sigma Pesnatal lot: BCBT1374)
13. Klotho (rm klotho 50mg lot: QWL1117081)

### **3.2.2. mRNA Ekspresyonu Saptanmasında Kullanılan Kimyasallar**

1. GeneAll Hybrid -R<sup>TM</sup> RNA Kiti ile RNA izolasyonu (GeneAll /Korea)
2. GeneAll 2X HyperScript<sup>TM</sup> One- step cDNA Kiti (GeneAll / Korea)
3. Syber Green temelli Eva Green PCR Master Mix (Biotium)

### **3.2.3. Protein Ekspresyonu Saptanmasında Kullanılan Kimyasallar**

1. Protein İzolasyonu (ProtinEx<sup>TM</sup>/ GeneAll Cat No.701-001)
2. NuPAGE 4-12%Bis-Tris Gel (İnvitrogen, CaT: NP0321BOX, Lot: 120471)
3. 20x MES Running Buffer (ThermoFisher,B0002)
4. Marker (NZY Colour Protein Marker II)
5. Iblot Transfer Stack Nitrocellulose (NC) Kiti (İnvitrogen, IB23001 )
6. Western Breeze Kit: (İnvitrogen, Chromogenic Immunodetection System, Rabbit Primary Antibody Cat:WB7105, Lot: 1692385)
7. SAEP003 (Goat Anti Rabbit-elabscience) Antikoru
8. Klotho -Elabscience (E-AB-17396)
9. Ku70 -Elabscience (E-AB-31883)
10. Phospho Ku70-XRCC6 (E-AB-21439)

11. Ku80 (NBP2-37583)

12. PRKDC(DNA-PK) -Elabscience (E-AB-31220)

13. DNA-PKcs (p Thr2609) / DNA-PKcs (NBP1-02456)

### 3.3. YÖNTEM

Klotho'nun, NHEJ yolağında etkili olan Ku70, pKu70, Ku80, DNA-PK ve pDNA-PK genlerinin etkilerinin gözlemlenmesi açısından HT22 ölümsüzleştirilmiş mouse hipokampal hücre serisi kullanılmıştır.

#### 3.3.1. Hücre Kültürü

Hücre kültürü; canlı bir doku veya organdan alınan küçük bir parçanın in vitro ortamda büyütülmesi ve çoğaltılması işlemine verilen isimdir. Hücre kültürü ile ilgili çalışmalar 1907 yılında Ross Harrison'un kurbağa embriyolarında yapmış olduğu çalışmalara dayanmaktadır. İlerleyen yıllarda uygun kültür besi ortamlarının geliştirilmesi ve besi ortamının içine antibiyotik eklenmesi kontaminasyon sorununu çözmüş ve bu teknolojinin, hastalıkların patogenezinin araştırılmasında, ilaç denemelerinin ve tedavi yöntemlerinin geliştirilmesinde birinci basamak çalışma içine girmesinin yolunu açmıştır ( Özçimen 2005).

##### 3.3.1.1. Hücre Kültürü Yönteminin Temel Aşamaları

Hücre kültürü çalışmaları için gerekli donanımdaki araç–gereçler, laminar akımlı kabin, karbon dioksit (CO<sub>2</sub>) etüvü, faz kontrast mikroskop, hücreleri saklama ve koruma için sıvı azot tankı ve hücrelerin üremek için tutunma ve hareketlerine olanak sağlayacak toksik olmayan, biyolojik olarak inert ve optik olarak saydam, tek kullanımlık steril plastik kaplardır (Uçar ve Ovalı 2003).

Kültürler günlük olarak kontrol edilmelidir. Besiyerinin rengi ve morfolojisi ile hücrelerin yoğunluğu gözlemlenmelidir. Hücrelerin nüfus yoğunluğu üremeyi baskıladığı zaman besiyerinden alınırlar. Hücrelerin kültür kabından alınmaları için değişik yöntemler kullanılabilir:

**Mekanik:** Bir spatül kullanarak hücreler yüzeyden fiziksel olarak ayrılabilir. Ancak hızlı bir yöntem olmasıyla birlikte bu yöntemde hücreler zarar görebilirler. Bu nedenle ancak hücre canlılığının önemli olmadığı koşullarda bu yöntem tercih edilebilir.

**Proteolitik enzimler:** Tripsin, kollajenaz ya da pronaz genellikle EDTA ile kombine edildiğinde hücrelerin üreme yüzeyinden ayrılmasına neden olur. Bu yöntem de hızlı ve güvenilir olmasına karşın hücre yüzeyine zarar verebilir. Proteolitik reaksiyon serum içeren tam kültür ortamının katılmasıyla hızlı bir biçimde sona erdirilebilir.

**EDTA:** Tek başına EDTA kullanılarak da hücreler yüzeyden ayrılabilir.

Hazırlanması zor, son derece titizlik gerektiren ve hassas çalışmaları içeren hücre kültür teknolojisi, bugün birçok alanda uygulanabilmesi nedeniyle büyük öneme sahiptir. Günümüzde çok sayıda insan, organ kayıplarının ya da çeşitli organların fonksiyonel bozukluğunun sonuçlarına maruz kalmaktadır. Bunların tedavisindeki alternatif çözümlerden birisi de doku ve organ transplantasyonlarının yapılmasıdır. Doku mühendisliğindeki gelişmeler ile bu artık bütün bir organ ya da dokunun transplantasyonu yerine, izole edilen fonksiyonel hücrelerin doğrudan veya çeşitli polimerik matriksler içinde canlıya implantasyonu şeklinde olmaktadır. Bütün bu yapıların elde edilebilmesi, hücre kültürü teknolojisindeki gelişmeler ile olabilmektedir (Uçar ve Ovalı 2003).

Hücre kültürleri kaynaklarına ve büyüme biçimlerine göre sınıflandırılırlar.

**Kaynaklarına göre;**

**Primer kültürler:** Hücre kültürü hazırlamak için alınan küçük doku veya organ parçasına **eksplant** denir. Çalışmalarda daha çok diploid hücreler kullanılır. Eksplantın doku veya organdan alınıp ilk ekiminin yapıldığı kültüre **primer kültür** denir. Primer hücre kültürlerinin kültürde belirli süre ömürleri vardır. Primer kültürde hücre soyu sonludur yani pasajlamalar sonunda hücreler yaşlanarak ölürlür. Bu nedenle primer hücrelerle belirli bir sayıda pasajlama yapılabildiğinden deneyler bu dönemde yapılmalıdır (Alberts ve ark. 2004).

**Sekonder hücre kültürü:** Normal kromozom sayısına sahip diploid hücrelerden elde edilen ve en fazla 50 kez pasajları yapılabilen kültürlere denir. Örneğin: WI-38, MRC-5 vb (Çiçek ve Bilgiç, 2006).

**Sürekli hücre kültürü veya Hücre hatları (Cell line'lar):** Primer kültürden spontan mutasyonlar sonucunda kendiliğinden ya da kimyasal ajanlar ya da virüsler eklenerek insan eliyle oluşturulurlar. Tümör dokusundan alınan hücrelerden de elde edilirler. Özetle **Sürekli hücre kültürleri**; anormal, transforme olmuş ve ölümsüz hücrelerdir. Hücre hatları primer kültürden şu özellikleri ile farklılık gösterirler;

- Kültürde yüksek yoğunluğa ulaşabilmeleri,
- Büyüme faktörleri ve seruma daha az gereksinim duymaları,
- Çoğalmak için bir zemine tutunma gereksinimlerinin daha az olması,
- Sonsuz çoğalma yetenekleri (bu özellikleri ile tümör hücrelerine benzerler).

Ölümsüzleştirilmiş hücre hatları mekanik çalışmalar için değerli araçlardır. Doğru kullanılırsa, moleküler ve hücresel mekanizmaları tanımlamak ve test etmek için hızlı, ucuz ve basit bir yol sağlayabilirler. Çeşitli araştırma araçları arasında, nöronal hücre hatları en temel, en yaygın ve ilgili mekanik ve farmasötik çalışmalar için *in vitro* modeldir. Hafıza ve Alzheimer hastalığına bağlı çalışmalara ilişkin hipokampal nöronal hücre hatları çok sınırlıdır; bunlardan HT22 en sık kullanılanlardan biri olarak görünmektedir (Davis ve ark. 1994; Schubert ve ark.1992; Suo ve ark. 2003). Tablo 3.1 yaygın olarak kullanılan nöronal hücre hatlarını göstermektedir.

Tablo 3.1:Yaygın Olarak Kullanılan Nöronal Hücre Serileri

Hücre kültürü	Hücre tipi ve kökeni
PC-12	Adrenal feokromositoma hücre dizisi (sıçan)
HT22	Hipocampal nöronal hücre dizisi (fare)
SHSY-5	Nöroblastom hücre dizisi (fare)
ND7 / 23	Dorsal kök ganglionu nöron türevi hücre dizisi (insan)
F-11	Dorsal kök ganglionu nöron türevi hücre dizisi (insan)
U-87 MG	Glioblastoma astrositom hücre dizisi (insan)
T98G	Glioblastom hücre dizisi (insan)

Çalışmamızda temel deney materyeli olarak HT22 hücre serisi tercih edilmiştir. Bu hücre serisinin kültüründe DMEMHA besiyeri, FBS, PBS, L-Glutamin, Penisilin-Streptomisin, Tripsin-EDTA solüsyonları kullanılmıştır.

### 3.3.1.2 HT22 Hücre Serisi

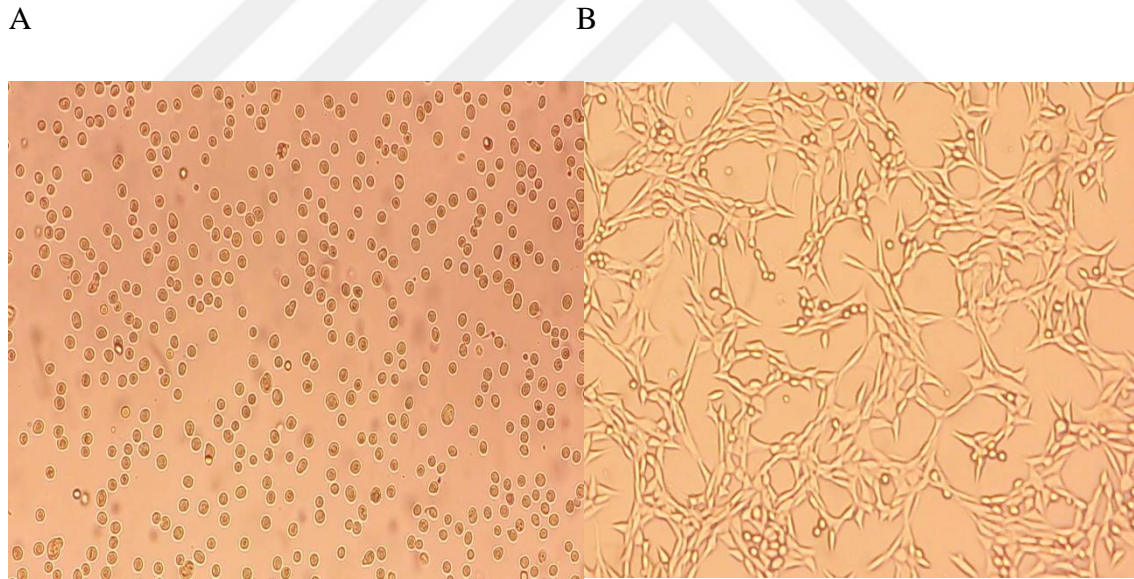
HT22, ölümsüzleştirilmiş fare hipokampal nöronal öncü hücreleri olan ana hattından HT4 alt klonlanmış bir hücre hattıdır (Jeong ve ark. 2010; Donovan ve ark.2010; Kaizaki ve ark.2006). Doku kökenlerinden dolayı, HT22 hücreleri birçok çalışmada hipokampal nöronal hücre modeli olarak kullanılmıştır (Atlante ve ark. 2001; Liu ve ark. 2009 ; Clement ve ark. 2010; Yang ve ark.2013 ; Brossaud ve ark. 2013).

HT22, glutamat'a karşı oldukça hassastır ve bu nedenle nöronal hücrelerde glutamatın neden olduğu toksisiteyi incelemek için sıklıkla bir model sistem olarak kullanılmaktadır. Glutamat, sinir hücreleri arasında bir sinyal molekülü olarak kullanılan ve biliş, öğrenme ve hafıza gibi normal beyin fonksiyonlarının çoğunda rol oynayan önemli bir uyarıcı nörotransmitterdir. Beyinde çeşitli glutamat reseptörleri (NMDA, AMPA mGluR) bulunmaktadır. Normal glutamat seviyeleri normal beyin

fonksiyonu için gereklidir, ancak yüksek seviyeler sinir hücrelerinin aşırı uyarılmasıyla sonuçlanabilir ve bu da nihai hücre hasarına veya hücre ölümüne neden olabilmektedir (Takeuchi, 1987; Okubo ve ark. 2010; Lau ve ark. 2010).

Bir çalışmada, HT22 hücrelerinin kolinerjik nöronların (Salgıladıkları asetilkolinle efektör organları uyaran nöronlar) özelliklerini gösterdiği ve aktif kolinerjik belirteçleri eksprese ettiği ve bunları Alzheimer hastalığının iyi bir hücre modeli haline getirdiği gösterilmiştir. Bu çalışmada HT22 hücreleri farklılaşmamış ve farklılaşmış durumda araştırılmıştır. Farklılaştırılmış HT22 hücreleri, N-metil-D-aspartat reseptörlerini (NMDA) eksprese ettiği ve eksitotoksositeye daha duyarlı hale gelmiştir. Bu nedenle, bu hücreler daha iyi bir hipokampal nöron modelidir (He ve ark. 2013).

HT22 hücre hattı morfolojik olarak aderent, bir yüzeye tutunarak büyüyen nöronal hücrelerdir. Şekil 3.1'de HT22 hücre serisini morfolojik görüntüsü gösterilmektedir.



Şekil 3.1: HT22 Hücre Serisini Morfolojik Görüntüsü: A: Ekimi yapılmış HT22 hücreleri B: Ekimi yapılan HT22 hücre serisinin 24 saat sonra görüntüsü



### **3.3.1.3. Hücre Kültürü Medyumunun Hazırlanışı**

DMEMHA hücre besiyeri ortamı 500 ml için:

Serum inaktivasyonu için FBS ( fetal bovine serum) 55°C su banyosunda 30 dakika inkübe edildi. Besiyeri ve Penisilin/Sreptomisin 37 °C’de 15-20 dakika inkübe edildi. Serumun total hacme oranı %10 olarak ayarlandı. Buna göre 50ml FBS besiyerine eklendi. %1 Pen/Strep olacak şekilde 5-6 ml antibiyotik besiyerine ilave edilerek %1 L-glutamin eklendi. Son olarak besiyeri homojen bir şekilde karıştırıldı.

### **3.3.1.4. Hücrelerin Çözdürülmesi ve Ekimi**

Ökaryotik hücreler genelde serum ve dondurma işleminde kullanılan katkı maddesi içeren ortamda, sıvı nitrojen içinde -196°C’de saklanmaktadır. Donmuş hücreler, maksimum canlılık elde etmek için en kısa zamanda hızlı bir şekilde çözülmelidir. Dondurmak için kullanılan katkı maddesinden kurtulmak için ortam 24 saat sonra değiştirilmelidir.

Çalışmamızda; Ampül içinde bulunan HT22 hücre serisi, 37°C’lik su banyosunda hızlı bir şekilde yaklaşık 1 dakika içinde buzlu çözdürüldü. Buzları çözülmüş olan ampül, laminar akımlı kabine yerleştirildi ve ampülün içi 15’lik falkona boşaltıldı. Daha sonra bir miktar besiyeri ile ampül temizlendi ve falkona aktarıldı. 1500 rpm’de 3 dk santrifüj yapıldı ve süpernatant uzaklaştırıldı. (Peleti kaldırmamaya özen göstererek hepsi alınmaya çalışılmıştır). Peletin üzerine 5ml besiyeri eklendi ve pipetaj yapıldı. Hücre sayımı yapılarak T25 flask 3-5x10<sup>4</sup> etiketlenen flaskın hücrelerin yapışacağı kısmına bırakıldı. Flask dik konuma getirilerek T25;5ml besiyeri eklendi. Yatay konuma getirildikten sonra hafifçe karıştırıldıktan sonra mikroskopta incelendi ve CO<sub>2</sub> inkübatöre bırakıldı.

### **3.3.1.5. Hücrelerin Beslenmesi**

Hücreler ne kadar sık büyüyorsa o kadar sık beslenmeli ve yeni ortama aktarılmalıdır. Bu nedenle çalışmamızda kullandığımız HT22 hücre serisi ekimi yapıldıktan 24 saat sonra ortamı değiştirilmiştir. Bunun için flask dik konuma getirilerek hücre tabakasının üzerindeki ortam çekildi. Besiyeri 37°C’ye ısıtıldı. Ortam, doğrudan hücrelerin üzerine değil kültür şişesinin duvarına doğru pipetlendi.

(Böylelikle tam yapışmamış hücreleri yerinden oynatmaktan kaçınılmıştır) Kültür şişesi nazikçe çevrilerek hücrelerin eşit şekilde dağılması sağlandı. Kapağın kapalı olduğundan emin olunduktan sonra hücreler inkübatöre yerleştirildi.

### **3.3.1.6. Hücrelerin Pasajlanması (Subculturing)**

Hücreler sıkışık (konfluent) duruma gelince hem besi ortamı hücreler için yetersiz hale gelir, hem de kültür kabında yer olmadığı için kontakt inhibisyon adı verilen mekanizma ile hücrelerin çoğalmaları durur. Bu nedenle hücrelerin pasajlanmaları gerekmektedir.

Çalışmamızda kullandığımız HT22 hücre serisi %90 konfluent olduğunda pasajlanması yapılmıştır. Bunun için DMEMHA hücre kültür ortamı, PBS ve %25 tripsin-edta su banyosunda 37°C'ye ısıtıldı. Hücreler CO<sub>2</sub> inkübatöründen alınarak mikroskopta incelendi. Flask dik konuma getirilerek hücre tabakasının olduğu yüzeye pipet değdirilmeden ortam yavaşça çekildi. Hücre tabakasına pipet değdirilmeden flask alt köşesine 6ml PBS eklenerek yüzey yıkandı ve 1-2 dakika sonra PBS yavaşça çekildi. Daha sonra ortama %25 tripsin-edta eklenerek flask 7-8 dakika CO<sub>2</sub> inkübatöründe tutuldu. (Üzerini biraz geçmesi yeterli T25; 3 ml T75; 5ml) Mikroskopta hücrelerin flask tabanından serbestleşip serbestleşmediği kontrol edildi. Hücreler serbest ise flaska eklenen tripsinin 3-4 katı olacak şekilde DMEMHA besiyeri eklendi ve santrifüj tüpüne aktarıldı. Hücreler 1500 rpm de 3dk santrifüj edildi. Supernatant tüpün tabanında 1 mL kadar bırakılacak şekilde uzaklaştırıldı. Hücre pelletini çözmek için homojen bir şekilde pipetaj yapıldı. Tüpe 5ml taze ortam eklenerek pipetlenerek 1500 rpm de 3 dk santrifüj yapıldı ve süpernatant uzaklaştırıldı. Hücrenin yoğunluğuna göre besiyeri eklenerek seyreltilmiş ve hücre sayımı yapıldı. Flask üzerine hücre hattı ismi, pasaj numarası, pasaj tarihi yazıldı. Hesaplanan miktarda hücre ekildikten sonra üzerine besiyeri eklendi. Hücreler mikroskopta incelenerek flask CO<sub>2</sub> inkübatörüne yerleştirildi.

### **3.3.1.7. Canlı Hücrelerin Mikroskopta Sayılması**

Hücreler, thoma lamı olarak adlandırılan bir çeşit bölmeli lama damlatılır ve bunun üzerinde mikroskop altında tek tek sayılır. İncelenecek olan HT 22 hücreleri tripan mavi ile boyanmıştır. Bu boya, canlı hücreler tarafından dışarı atılırken ölü hücreleri koyu mavi renge boyamaktadır.

Çalışmamızda hücre sayımı için, tripsinle muamele edilen HT22 hücreleri 1200 rpm'de 5 dk santrifüj olduktan sonra kalan hücre pelleti, 1-2 ml besiyerine alındı. Homojenize edilerek alınan 10µL hücre üzerine 10µL. trypan blue koyularak ışık mikroskobunda Thoma lamının alt ve üst hanelerinde bulunan 16 küçük karede boya almayan hücreler sayılarak hücre sayımı yapıldı ve ortalamaları alınarak canlılık belirlendi. Thoma lamında sayım sonucu **A x SF x16 x 10.000** formülü ile hesaplanmıştır.

**A** : Bir orta boy karede sayılan hücre adedi

**SF** : Seyreltme faktörü

**16** : 16 adet orta boy kare olduğundan tüm kare sonucuna erişmek için kullanılan çarpan

**10.000** : 0,1 mm<sup>3</sup>' deki sayım sonucunu 1 ml' deki sayıya dönüştürmek ve standart sonuç elde etmek için kullanılan bir değişmez.

### ***3.3.1.8. Hücrelerin Dondurulması ve Saklanması***

Hücreler büyüdükçe fenotipleri değişebilir. Hücrelerin değişmeden tahmin edilebilir bir durumda bulunmaları gerektiği için hücreler en kısa zamanda dondurularak saklanmalıdır.

Hücreler her zaman büyütüldükleri ortam ve serumda logaritmik faza kadar büyütülür. Canlı hücre sayımı yapılır. Dondurulacak hücrelerin %20'sinden fazlasının ölü olmamasına dikkat edilir. Ne kadar hücreye ve ampüle ihtiyaç duyulacağına karar verilir. Her ampül, 1ml ortam içinde  $1 \times 10^7$  hücre alabilir. Dondurma ortamı genelde normal kültür ortamı, %10-20 serum ve %5-10 gliserol ve DMSO içerir. Eğer hangi dondurma ortamı kullanılacağına karar verilemiyorsa hücreler %20 serum ve %10 DMSO'da dondurulabilir. Çalışmamızda 1:9 oranında DMSO ve Besiyeri ile hücreler donduruldu. Bunun için pelet, dondurma ortamında pipetaj yapılarak çözüldü. Hücreler, her ampüle 1ml düşecek şekilde ampüllere dağıtıldı ve kademeli olarak dondurma işlemi gerçekleştirildi. En son olarak hücreler -196°C sıvı azot tankına yerleştirildi.

### 3.3.1.9. Sitotoksit Testleri

Kimyasal ve biyolojik maddeler ya da fiziksel etkenler, hücreleri değişik derecelerde etkileyerek sitotoksositeye yol açabilirler. Bir maddenin biyolojik davranışının anlaşılabilmesi için hücreler üzerindeki toksik ya da non-toksik etkisinin belirlenmesi gereklidir (Tokur ve Aksoy 2017). İn vitro sitotoksit testleri, ilaç niteliği taşıyan veya toksik profili araştırılan maddelerin değerlendirilmesi amacıyla hücre kültüründe gerçekleştirilen ölçüm metotlarıdır. Bu testlerle çok sayıda maddenin kısa sürede analiz edilmesi mümkün olmaktadır. Farklı mekanizmalara ve hassasiyetlere sahip çok sayıda sitotoksit testi bulunmakla birlikte sıkça tercih edilen tetrazolyum testleri MTT, WST ve XTT'dir. Hücre canlılığı ve proliferasyon miktarı ve ilacın IC50 (%50 İnhibitör Konsantrasyon) değerini sayısal verilerle ifade etmeye yardımcı olur (Tokur ve Aksoy 2017).

**MTT TESTİ:** MTT (3-[4,5-Dimethylthiazole-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide; Thiazolyl blue) yöntemi ile bir hücre topluluğundaki canlı hücreler, kolorimetrik yöntemle kantitatif olarak saptanabilmektedir. Bu yöntem sağlam mitokondrianın MTT boyasının tetrazolium halkasını parçalayabilmesi ilkesine dayanmaktadır (McGahan ve ark.1995 ). Çoğalan hücreler proliferasyon olmayan hücrelerden metabolik olarak daha çok aktivite gösterdiği için, bu yöntemle sadece hücre canlılığı ve sitotoksit değil hücre aktivasyonu ve proliferasyonu da belirlenmektedir (Mosman. 1983).

**WST:** WST ise suda çözünür formazan boyalarını içerir. Oluşan formazanlar farklı absorpsiyon yapma kabiliyetindedir. WST-1 ve özellikle WST-8 (2 - (2-metoksi-4-nitrofenil) -3 - (4-nitrofenil) -5 - (2,4-disülfofenil)-2H-tetrazolium) MTT'ye göre fazla avantajlıdır. Son olarak, WST analizi MTT'ye göre daha etkili bir sinyal verir, hücrelerde daha az toksik etki yaratır ve doğrudan ölçülebilir (Tokur ve Aksoy 2017).

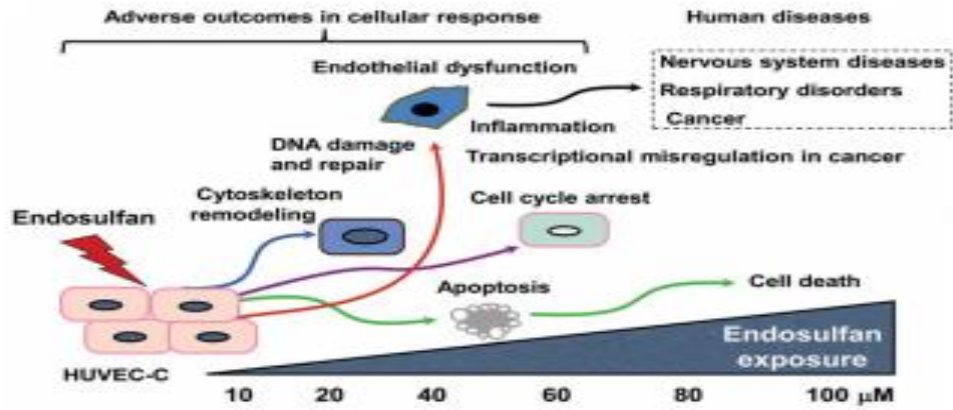
**XTT TESTİ:** XTT (2,3-bis-(2-metoksi-4-nitro-5-sülfofenil)-2H-tetrazolyum-5-karboksianilid), hücre enzimlerinin aktivitesini ölçmek için kullanılan kolorimetrik bir metottur. MTT'ye göre daha yüksek bir hassasiyetle çalışılan analiz metodu olarak değerlendirilmektedir. Oluşan formazan bileşikler suda çözünebilir (Tokur ve Aksoy 2017).

### ***3.3.1.10. Toksikite Değerlendirmesi İçin XTT Metodu***

Çalışmamızda HT22 Hücrelerine XTT Hücre Canlılığı Test Kiti (Biotium) uygulanmıştır. XTT, standart mikropilaya absorban okuyucular kullanarak canlı hücre sayısının belirlenmesi için basit bir yöntem sağlamaktadır. Canlı hücre sayısının tespiti sıklıkla hücre proliferasyon oranını değerlendirmek ve sitotoksik etmenleri taramak için kullanılmaktadır. Kültür ortamının son hacmi her kuyucuk için 100 uL olmalıdır ve ortam %10 kadar serum içermelidir. Kullanımdan hemen önce çalışma çözeltisi hazırlanmaktadır. Eğer XTT solüsyonunda sediment varsa solüsyon 37°C'de ısıtılmalı ve berrak bir çözelti elde edilmelidir. Test edilecek her 96 kuyucuklu plak için, aktive edilmiş XTT çözeltisini elde etmek için 25 mL Aktivasyon Reaktifi 5 mL XTT Solüsyonu ile karıştırılmalıdır. Her bir kuyucuktaki 100 uL ortamına aktive edilmiş XTT çözeltisinin 25 ul veya 50 ul'si eklenmektedir. (50 uL aktive edilmiş XTT solüsyonu daha net bir sinyal artışı oluşturur ancak aktive edilmiş XTT solüsyonu 25 uL'den düşük bir hücre sayısında sinyal doygunluğuna ulaşmaktadır. 25 uL aktive edilmiş XTT solüsyonu daha geniş bir dinamik algılama aralığı sağlamaktadır.) Plate bir inkübatörde 2-24 saat inkübe edilmektedir. (Genellikle 2-5 saat yeterli) Reaksiyon karışımı ile inkübasyon süresi, hücrelerin türüne ve konsantrasyonuna göre değişmektedir.

### ***3.3.1.11. Endosülfan (DNA Çift Zincir Kırığı Oluşturan Ajan) Dozunun Belirlenmesi***

Endosülfan (6,7,8,9,10,10-heksakloro-1,5,5a, 6,9,9a-heksahidro-6,9-metano-2,4,3-benzodiyoksathiepin-3-oksit),  $\alpha$  ve  $\beta$  izomerlerinden oluşan siklodien OCP (3: 1 oranı), insan sağlığı üzerinde olumsuz etkileri olan çevresel bir kirletici maddedir (Usenko ve ark. 2007; Saiyed ve ark. 2003). Şekil 3.2' de endosülfanın insan hastalıkları ile ilişkisi gösterilmektedir.



Şekil 3.2: Endosülfanın İnsan Hastalıkları ile İlişkisi (Xu ve ark. 2016)

Endosülfan'ın insanlarda sağlık kusurları ile olan ilişkisi aktif kullanım alanlarında öngörülse de, genomik dengesizlikle sonuçlanan etki mekanizmasını, DNA hasarını anlamak için kapsamlı moleküler çalışmalar yapılmaktadır. Son zamanlarda in vitro, ex vivo ve in vivo çalışmalar, Endosülfan'ın moleküler etkisini ortaya çıkarmıştır. Son bir çalışmada endosülfanın, bir ROS üreticisi ve ROS bağımlı bir şekilde DNA hasarı oluşturduğu bulunmuştur (Sebastian ve Raghavan, 2016).

Endosülfan uygulaması için uygun dozun belirlenmesi amacıyla thoma lamında sayılan HT22 hücreleri 96 well platlerin her bir kuyucuğunda 10000 hücre /100 µl medium ile birlikte hücreler hazırlandı. 96 well plate CO<sub>2</sub> inkübatöründe 37 °C'de %5 CO<sub>2</sub> içeren ortamda 24 saatlik inkübasyona bırakıldı. Hücreler %70 konfluent olduğunda endosülfan için dozaj belirlenmesine karar verildi. 10 mM endosülfan (Pestanal) hazırlamak için 0.004 gr endosülfan hassas terazide tartıldı. Totalde 1ml olacak şekilde DMSO'da çözülerek ana stok hazırlandı (AS-10mM solüsyon). Bu stoktan alınan 50 µl endosülfan 950 µl besiyeri ile homojenize edilerek uygulama solüsyonu (US) elde edildi (500 µM solüsyon). Tablo 3.2'de gösterildiği şekilde 96'lık well plate 10, 25, 50, 75 ve 100 µM endosülfan konsantrasyonları için belirlenen kuyucuklara US'den hedef konsantrasyonu sağlayacak şekilde dağıtım yapıldı.

Tablo 3.2: HT22 Hücre Serilerinde Endosülfan Konsantrasyonlarının Sitotoksik Etkisi

X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
X	B	K	10µM	25µM	50µM	75µM	100µM	K	K	B	X
X	B	K	10µM	25µM	50µM	75µM	100µM	K	K	B	X
X	B	K	10µM	25µM	50µM	75µM	100µM	K	K	B	X
X	B	K	10µM	25µM	50µM	75µM	100µM	K	K	B	X
X	B	K	10µM	25µM	50µM	75µM	100µM	K	K	B	X
X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X

\*X:Boş, K: Kontrol, B: Besiyeri, Endosülfan konsantrasyonları: 10, 25, 50, 75 ve 100 µM

24 saat sonunda HT22 hücrelerinin olduğu eski besiyeri alınmıştır ve kuyucuklar PBS ile yıkandı. Hücrelere XTT Hücre Canlılığı Test Kiti (Biotium) uygulandı. Çalışmamızda kullandığımız HT22 hücreleri için XTT üreticinin protokolüne uygun olarak, XTT solüsyonu 60 kuyucuk için hazırlanarak 2 saat süre ile inkübe edildi. Solüsyonu kuyucuklara eşit şekilde dağıtmak için plate hafifçe çalkalandı. Mikroplate okuyucu (Heales MB-530) ile hücrelerin absorban sinyali 492 nm dalga boyunda ölçüldü ve okunan absorban değerine göre sitotoksikite düzeyi belirlendi. Sitotoksikite düzeyleri aşağıdaki formül ile hesaplanmıştır.

$$1 - \left( \frac{\text{Test kuyucugunun absorbanı}}{\text{Kontrol kuyucugunun absorbanı}} - \text{Medium kuyucugunun absorbanı} \right)$$

### 3.3.1.12. Klotho ve Endosülfan Uygulamaları

Dördüncü pasaj sonrası elde edilen HT22 hücreler altı kuyucuklu kültür kaplarına ekildi. Her bir kuyucukta yaklaşık 300.000 hücre olacak şekilde ekim yapıldı. Kuyucukların her birinde 2 ml hücre kültürü besi yeri eklendi. Hücrelerin lamellere yapışabilmesi ve bölünme fazına geçebilmesi için kültür kapları 24 saat, 37<sup>0</sup> C’de hücre kültürü koşullarında inkübe edildi. Kültür kapları 24 saat sonunda invert mikroskop ile incelenerek hücrelerin lamellere yapışma ve yüzeyi kaplama özellikleri kontrol edildi. Bu kuyucuklarda istenen ilaç etkilerini gözlemek için aşağıda belirtilen oranlarda Klotho ve endosülfan solüsyonları hazırlandı. HT22 hücrelerin bulunduğu kuyucuklarda istenen Klotho ve endosülfan etkilerini gözlemek için araştırma grupları oluşturuldu. Araştırma grupları oluşturulurken, Kontrol grubu ile birlikte, Klotho ve endosülfanın bulunduğu 5 grup Tablo 3.3’ de gösterildiği şekilde Klotho ve endosülfan eklendi.

#### **Klothonon Hazırlanması**

CO<sub>2</sub> inkübatöründe 37 °C’de %5 CO<sub>2</sub> içeren ortamda 24 saatlik inkübasyona bırakılan HT22 hücreleri %70 konfüluent olduğunda Klotho uygulamasına karar verildi. Bunun için 50µg Klotho (21.9µl ve 2.31µg/µl) dört eşit parçaya bölündü (21.9/4) ve çalışmada kullanılmak üzere -80 °C olan buzdolabına kaldırıdı.

5.47µl Klotho besiyerinde iyice homojenize edilerek son hacim 1263µl olacak şekilde besiyerinde çözdürüldü ve çalışma ara stoğu hazırlandı. Klotho konsantrasyonu (0.01µg/µl) olacak şekilde 60µl Klotho tablo 3.3’ de belirlenen grublara eklendi.

#### **Endosülfanın Hazırlanması**

CO<sub>2</sub> inkübatöründe 37 °C’de %5 CO<sub>2</sub> içeren ortamda 24 saatlik inkübasyona bırakılan HT22 hücreleri %70 konfüluent olduğunda endosülfan uygulamasına karar verildi. 20 mM endosülfan (Pestanal) hazırlamak için 0.0108gr endosülfan hassas terazide tartıldı. Totalde 1350µl olacak şekilde DMSO’da çözülerek ana stok hazırlandı (AS-20mM solüsyon). Bu stoktan 5µl alınarak hedef konsantrasyon 50 µM endosülfan olacak şekilde tablo 3.3’ de gösterdiği gibi belirlenen kuyucuklara dağıtım yapıldı.



Tablo 3.3: Araştırma Grubları ve Yapılan Uygulamalar

Grublar	Yapılan Uygulamalar
Kontrol Grubu (K)	Hiçbir işlem yapılmayan HT22 hücreleri (İzolasyondan 12 saat önce sadece 5 µl DMSO eklendi)
Klotho Uygulanan Grub (K12)	İzolasyondan 12 saat önce 60µl Klotho (0.01µg/µl) ve 5 µl DMSO eklendi
Klotho Uygulanan Grub (K16)	İzolasyondan 16 saat önce 60 µl Klotho (0.01µg/µl) ve izolasyondan 12 saat önce 5 µl (20mM) endosülfan eklendi.
Klotho ve Endosülfan Uygulanan Grub (K+E)	İzolasyondan 12 saat önce 60 µl Klotho (0.01µg/µl) ve 5 µl (20mM) endosülfan eklendi.
Endosülfan Uygulanan Grub (E)	İzolasyondan 12 saat önce 5 µl (20mM) endosülfan eklendi.

### 3.3.2.Gen Expresyon Deneyleri

Gen ekspresyonu, DNA'da mevcut olan genetik bilginin mRNA ve protein düzeyinde incelenmesidir. Farklı fizyolojik veya patolojik durumlarda hücrenin genetik bilgi akışı değişmektedir. Hücrenin genetik bilgi akışının incelenebilmesi, doku veya organizmada değişen durum karşısında hangi yolların çalışmaya başladığı ve hangi yolların kapandığı konusunda bilgi vermektedir (Bustin ve ark.2005; Okutucu ve ark. 2003). Gen ekspresyon analizleri; Northern blot, Mikroarray, RT-PCR tekniği ile gerçekleştirilebilmektedir (Başaran ve ark. 2010).

### 3.3.2.1. *Revers Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR)*

RT-PCR, hücrelerden izole edilen RNA moleküllerinin retrovirüslerden izole edilen Revers transkriptaz enzimi yardımıyla c-DNA sentezini gerçekleştirmesi sonucu, gen ekspresyonu analizlerinin yapılabildiği hızlı ve hassas bir yöntemdir. Bu yöntemle çok az miktarda RNA ile oluşan mesajlar saptanabilir ve genin ekspresyon miktarı da tespit edilebilir (Okutucu ve ark. 2003).

Genler etkilerini mRNA üretimi ile ortaya çıkarırlar. Normal koşullarda mRNA'lar RNAz enzimlerinin aktivitesi ile çok çabuk parçalandıklarından, mRNA'lar ile laboratuvar şartlarında çalışılması oldukça güçtür. Bu nedenle mRNA ile çalışılacağı zaman mRNA'nın DNA karşılığı olan c-DNA'ya çevrilerek kullanılır. Bu reaksiyonda revers transkriptaz enzimi ve DNA primeri kullanılır. RT-PCR iki aşamalı olup RNA'dan c-DNA sentezi ve c-DNA'nın da standart PCR yoluyla çoğaltılması aşamalarını kapsar. RT-PCR'da reaksiyonun ilk basamağı olan ters transkripsiyon aşamasında kullanılan primerler (oligo dT veya random) poliadenillenmiş bölgeye bağlanırlar. Bu nedenle RT-PCR ile 3'-poly (A) kuyruğuna sahip mRNA'ların çoğaltma işlemleri yapılmaktadır (Başaran ve Aras, 2010)

RT- PCR uygulamalarında ilgilenilen genin ekspresyon düzeyinin incelenebilmesi için, farklı fizyolojik veya patolojik şartlarda ekspresyonu değişmeyen bir başka gen ürünü mRNA ile normalize edilmesi gereklidir (normalizasyon). Normalizasyon amacıyla, çeşitli doku ve hücre tiplerinde ekspresyon düzeyi en az değişim gösteren housekeeping genler kullanılmaktadır. Bu amaçla en yaygın kullanılan genler Gliseraldehid3-fosfat dehidrojenaz (GAPDH) ve Beta Aktin genidir (Jung ve ark. 2007; Ohl ve ark. 2006).

Real Time PCR, döngüler sırasında reaksiyonlardan floresan sinyal toplayarak kesintisiz bir şekilde analize olanak verir. Ekspresyon analizlerinin yanı sıra, delesyonlar ve nokta mutasyonlarının da çalışılmasına imkan veren bu yöntemin üstünlüğü hızında ve ürünlerin gerçek zamanlı izlenebilmesinde yatmaktadır. Real-Time PCR da iki yöntem söz konusudur. Spesifik olmayan belirleme sistemi ve spesifik belirleme sistemi (Bustin ve ark. 2005).

Çalışmamızda spesifik olmayan çift zincirli DNA'nın çoğaltılmasında SYBR Green yöntemi kullanıldı. Bu yöntemde kullanılan floresan boya sadece çift zincirli DNA'ya bağlandığından çoğalan DNA miktarındaki artışa paralel olarak, Real-Time PCR cihazında okunan floresanın miktarı da eş zamanlı olarak artmaktadır. Reaksiyonun başında PCR bileşenleri olarak, çift zincirli DNA molekülü, primerler ve SYBR Green boyası bulunmaktadır. Reaksiyonun başlaması ile primerler DNA'ya bağlanıp uzama başladığında boya molekülü çift zincirli DNA'nın arasına girer ve floresan ışımaya başlar. Başlangıçtaki döngü boyunca sinyal zayıftır. Ürün miktarı arttıkça floresan miktarı hızla artar ve bu artış Real-Time PCR cihazının monitöründen izlenebilir. Bu yöntem floresan işaretli problemlere ihtiyaç göstermediği için maliyeti ucuz bir metoddur (Günel,2007;Logan ve Edwards 2009).

### **Real-Time Pcr Verilerinin Yorumlanması**

Real-Time PCR'da çoğaltılan DNA'nın istenilen bölge olup olmadığını, primer dimer oluşumunu ve özgül olmayan amplifikasyon ürünlerinin tespiti için erime eğrisi (melting curve) analizi yapılır. Her DNA'nın kendine özgül bir Erime Sıcaklığı (Melting Temperature= $T_m$ ) vardır. Amplifikasyondan sonra sıcaklık yavaş yavaş yükseltilerek belirli aralıklar ile floresans miktarı tespit edilir. Çift zincirli DNA denatüre olmaya başlayınca prop ya da interkale (çift zincirli DNA'ya önceden bağlanan floresan boya) olan boya serbest kaldığı için ölçülen floresans miktarı azalmaya başlar. Bu şekilde elde edilen erime eğrisinden yararlanılarak amplifikasyonun özgüllüğü belirlenebilir.  $T_m$  değerinin tam olarak saptanabilmesi için 17 erime eğrisinin zamana karşı grafiği çizilebilir. Çizilen bu grafik analizi, sıklıkla başvurulan bir yöntemdir (Kubista ve ark. 2006; Pfaffl 2001).

Eşik döngü değeri (Threshold Cycle= $C_t$ ) Real-Time PCR uygulamalarında önemli bir parametredir.  $C_t$  değeri, PCR reaksiyonu esnasında tespit edilen floresan ışımada eşik değerinin aşıldığı döngü sayısıdır. Başka bir ifade ile ürünün ilk anlamlı artışın olduğu noktayı belirtir. Farklı PCR reaksiyonlarında yer alan kalıp örneklerin miktarı  $C_t$  değerleri karşılaştırılarak öngörülebilir (Kubista ve ark. 2006; Pfaffl 2001).

Semi kantitatif Real-Time PCR'da faklı dokularda ki ve housekeeping gendeki  $C_t$  değerleri dikkate alınırken, kantitatif Real-Time PCR'da kontrol olarak kullanılan ve

kopya sayısı bilinen standartların seri dilusyonları kullanılarak elde edilen Ct değerleri dikkate alınıp değerlendirme yapılır (Kubista ve ark. 2006). Gen ifadesini ölçmek için ilgilenilen genin farklı örnekleri arasında RNA miktarı ve kalitesinde meydana gelebilecek değişiklikleri normalize etmek için bir referans gen kullanılır. Bu normalizasyon işlemi  $\Delta$ CT metodu olarak adlandırılır ve farklı örnekler arasında ilgilenilen genin ifadesinin karşılaştırılmasını sağlar (Scheffe ve ark. 2006).

### **3.3.2.2. GeneAll Hybrid –R<sup>TM</sup> RNA Kiti ile RNA izolasyonu**

Reverz Transkripsiyon-Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) yöntemi ile yapılan Klotho, Ku70, Ku 80, DNA-PK gen ekspresyon analizleri için kullanılacak olan total RNA hazır ticari kit (Hybrid –R<sup>TM</sup> RNA) kullanarak izole edildi. Bunun için;

250 $\mu$ L alınan HT22 hücre ile 750 $\mu$ L RiboEx pipetaj yapılarak eklendikten sonra 2 dk oda ısısında inkübe edildi. 1,5ml lik tüp üzerine 100 $\mu$ l kloroform eklendi. Kloroform, RiboEx ve hücre örneğine karışması için alt üst yapılarak 2 dk oda ısısında bekletildi. (Kloroform ile elde ettiğimiz lizat sulu ve organik faza kolayca ayrılmaktadır.) 12.000g de 4 $^{\circ}$ C de santrifüj yapıldı ve sulu faz başka EzPure filtreye aktarıldı. (DNA ve protein ara fazda ve organik fazda kalırken, total RNA sulu fazda bulunmaktadır.) 11.000 rpm de 1 dk oda ısısında santrifüj edildi. Alta geçen sıvının üzerine elde ettiğimiz hacmin yaklaşık 2 katı kadar RB1 Buffer eklendi. Pipetaj yapılarak elde edilen karışım type W kolona aktarıldı. 11.000 rpm de 1 dk oda ısısında santrifüj edildi. Collection tüp yenisi ile değiştirildi ve üzerine 500 $\mu$ L RBW Buffer eklendi. (Böylece membrana bağlanmış olan küçük RNA dışındaki artıklar uzaklaştırılır). 11.000 rpm de 1 dk oda ısısında santrifüj edilerek Collection tüp yenisi ile değiştirildi ve üzerine 500  $\mu$ L RNW Buffer eklendi. 11.000 rpm de 1 dk oda ısısında santrifüj edildi. Collection tüp yenisi ile değiştirildi ve üzerine tekrar 500 $\mu$ L RNW Buffer eklendi. 11.000rpm de 1 dk oda ısısında santrifüj edildi. Collection tüp yenisi ile değiştirilerek üzerine hiçbir şey eklenmeden 11.000 rpm de 2 dk santrifüj edildi. Daha sonra membranın tam merkezine gelecek şekilde 50 $\mu$ L RNase-free su eklendi ve 2dk oda sıcaklığında bekletildi. 11.000 rpm de 2 dk santrifüj edilerek RNA elde edildi. Elde edilen RNA'nın 20  $\mu$ l'si saflığının ölçülmesi için –20  $^{\circ}$ C'ye alınırken, kalanı cDNA eldesi için –80  $^{\circ}$ C'de saklandı.

Elde edilen RNA'ların miktarı ve saflığı Qubit floresan cihazı ile ölçüldü. Qubit seyreltilmiş BSA standartlarını içermektedir. Çalışmamızda 1.5 ml lik mikrosantrifüj tüpüne standart (3 adet) ve çalışılacak örnek miktarı (n) başına 199 µl Quant-iT buffer eklendi. Daha sonra Quant-iT buffer üzerine standart (3 adet) ve çalışılacak örnek miktarı (n) başına 1µl Quant-iT reagent eklendi. Böylece her örnek ve standart başına 200µl çalışma solüsyonu elde edildi. En az 5 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübe edildi ve ölçüm yapıldı.

### ***3.3.2.3. GeneAll 2X HyperScript™ One- step RT-PCR master mix ile cDNA Eldesi***

mRNA ekspresyon seviyelerini belirlemek için duyarlı bir metottür. Klasik PCR' dan farklı olarak başlangıç materyali RNA' dır. Ters transkriptaz enzimi, tek iplikli bir RNA molekülü okuyup (transkripsiyonunu yapıp) tek iplikli DNA üreten bir DNA polimeraz enzimidir. Bu enzim, ayrıca, RNA tek iplikli cDNA şeklinde okunduktan sonra çift iplikli DNA oluşmasında da görev alır. Normal transkripsiyon DNA'dan RNA sentezidir; dolayısıyla ters transkripsiyon bu sürecin tersidir. mRNA düzeyinde yapılacak analizlerde RNA molekülü ile çalışmak zor olduğu için complementary DNA (cDNA) gibi kararlı bir molekül ile çalışılır. Çalışmamızda kullandığımız bu kit mRNA ya da total RNA'dan tek zincirli DNA'nın sentezlenmesine yardımcı olmaktadır.

#### **Kit Bileşenleri**

- 10X RTaz reaksiyon buffer
- 0,1 M DTT
- Hyperscript Ters Transkriptaz Enzimi (200 U/ul)
- ZymAll Rnaz inhibitör
- OligodT primer
- Random hexamer
- dNTP

Çalışmamızda HT22 hücrelerinden elde edilen RNA kullanılmıştır. RNA (1pg-500 ng) başlangıç materyali olarak kullanılmaktadır. Araştırma grublarından (Kontrol, K12, K16, K+E ve E) elde edilen RNA kullanılarak cDNA sentezi yapıldı. Bunun için; Nukleaz free tüp içerisine tablo 3.4’ de verilen reaktifler eklendi.. En az 1 dakika buz üzerinde bekletilmiştir. 55°C’de 60 dakika ve 85 °C’ de 5 dakika inkübe edildi. İnkübe edilen cDNA -20°C’de saklandı.

Tablo 3.4 : cDNA Sentez Karışımı

<b>Bileşenler</b>	<b>Miktar</b>
RT PCR master mix	10 µl
RNA	3 µg
H <sub>2</sub> O	7 µl

#### **3.3.2.4. Realtime Revers Transkriptaz RT-PCR ile Gen Ekspresyonu Analizi**

cDNA’ ların Real Time PCR ile çoğaltımında Atlas firmasına ait EvaGreen PCR Mix kullanılmıştır. PCR tüplerine Eva Green PCR Master Mix ve primer çifti (oligonükleotid) protokollere uygun miktarlarda eklendi. Aynı PCR şartlarına farklı kuyucuklarda çalışmada kullandığımız genler için master mixleri hazırlanarak ayrı kuyucuklarda denemeler gerçekleştirildi. Klotho, Ku70, Ku80, DNA-PK ve Aktin Beta genleri için hazırlanan master mixler tablo 3.5’de gösterilmektedir.

Tablo 3.5: Real-Time PCR Bileşen ve Miktarları

<b>Bileşenler</b>	<b>Miktar (µl)</b>
SYBR temelli EvaGreen PCR Mix	10
Forward primer	1
Reverse primer	1
ROX	1
cDNA	5
H <sub>2</sub> O	2
TOPLAM	20

Primerler her bir transkripsiyon analizi için spesifik olup, daha önceki çalışmalar referans alınarak belirlenen baz dizgelerinin sentezi yaptırılarak elde edilmiştir. Çalışmamızda kullanılan primerler tablo 3.6' da gösterilmiştir.

Tablo 3.6: Çalışmada Kullanılan Primerler

Primer	Oligo sekansı	Baz sayısı
<b>Klotho</b>	F:5'-CAC AGA GGT TAC AGC ATC AG-3'	<b>20</b>
	R:5'CAGCAAAGT CAA CAC AGT AGGA3'	<b>22</b>
<b>Ku70</b>	F:5'-AAA AGA CTG GGC TCC TTG GT- 3'	<b>20</b>
	R:5'-TGT GGG TCT TCA GCT CCT CT- 3'	<b>20</b>
<b>Ku 80</b>	F:5'-CGA CAG GTG TTT GCT GAG AA- 3'	<b>20</b>
	R:5'-TCA CAT CCA TGC TCA CGA TT- 3'	<b>20</b>
<b>DNA-pk</b>	F: 5'-CAT GGA AGA AGA TCC CCA GA-3'	<b>20</b>
	R:5'-TGG GCA CAC CAC TTT AAC AA-3'	<b>20</b>
<b>Aktin Beta</b>	F:5'-GCA TGG GTCA GAA GGA TTC C-3'	<b>20</b>
	R:5'-CAC GCA GCT CAT TGT AGA AGG3'	<b>21</b>

Elde edilen cDNA örneklerinden Klotho, Ku70, Ku80 ve DNA-PK gen ekspresyonları Real-Time PCR, Life Technologies (ABI) marka Stepone Plus cihazı ile belirlendi.

Gerçek zamanlı PZR cihazları, her polimeraz zincir reaksiyonunda floresansın tespit edilmesini sağlayan fluorometre ve "thermal cycler" dan meydana gelmektedir. Çalışmaya ait floresan veriler RT-PZR cihazına bağlı bir bilgisayarda toplanmaktadır. Grafik haline getirilen bu veriler gerçek zamanlı PZR analizi için geliştirilen özel yazılımlarla analiz edilmektedir (Peters ve ark, 2004). Denatürasyon, primer yapışması ve zincir uzatma olmak üzere üç basamaktan oluşan amplifikasyon işleminden sonra elde edilen amplifikasyon eğrilerine ait döngü eşiği (Ct) değerlerinden hareketle, hedef genlerin mRNA ekspresyon düzeylerinin nisbi değişimleri  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  metodu ile hesaplanmıştır. (Pfaffl, 2001).

Bu hesaplamada;

$$\Delta\Delta Ct = (Ct_{\text{hedef gen}} - Ct_{\text{Aktin Beta}})_{\text{deney grubu}} - (Ct_{\text{hedef gen}} - Ct_{\text{Aktin Beta}})_{\text{kontrol grubu}}$$

formülü uygulanarak hesaplanan değer, her bir gen için  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  formülünde yerine konularak mRNA ekspresyon düzeyi, misli olarak azalma ya da artış şeklinde belirlenmiştir. Endojen kontrol olarak Aktin Beta geni kullanıldı.

### 3.3.3 Western Blot ve Protein Ekspresyonu Deneyleri

#### 3.3.3.1. Western Blot

Western blot elektroforez işlemiyle poliakrilamid jelde göç ettirilen proteinlerin, destek membrana transferi ve membrandaki proteinlerin immünojenik metodlarla gösterilmesidir (Burnette, 1981; Harlow ve Lane, 1988). Blotlamadan önce çalışılan numunedeki proteinler elektriksel ortamda jel üzerinde göç ettirilmektedir. Proteinlerin elektroforezleri sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jelde (SDS-PAGE) gerçekleştirilmektedir. SDS-PAGE proteinlerin ayrıştırılması ve saflaştırılmasında kullanılan temel biyokimyasal yöntemlerden biridir (Harlow ve Lane, 1988). Çalışılan numunedeki SDS-polipeptit kompleksleri, poliakrilamid jele yüklenip elektrik akımına maruz bırakıldıkları zaman, proteinin moleküler ağırlığıyla orantılı olarak, artı kutuba doğru göç etmekte ve jelde buldukları yerde bantlar halinde yığılım göstermektedir. Yapılan bu işlem elektroforezdir. Western blot tekniği elektroforez işlemi takip eden 4 adımda gerçekleştirilir. Bunlar jeldeki proteinlerin nitroselüloz membrana aktarımı (blotlama), spesifik olmayan reaksiyonları engellemek için nitroselüloz membranda protein bağlanmamış bölgelerin ilgisiz proteinlerle kaplanması (bloklama), özgül antikorlarla tepkime ve en son adımda ise proteinlerin görüntülenmesi aşamalarıdır. Çalışmamızda kullandığımız proteinler ve molekül ağırlıkları tablo 3.7'de gösterilmiştir.



Tablo 3.7: Çalışmada Kullanılan Proteinler ve Molekül Ağırlıkları

<b>Proteinler</b>	<b>Molekül Ağırlıkları ( kDA)</b>
Klotho	62
Ku70	70
Phospho Ku70-Xrcc6 (E-Ab-21439)	70
Ku80	86
DNA-PK	450
DNA-PKcs [p Thr2609]	460
Aktin beta	42

### **3.3.3.2. Protein İzolasyonu**

Araştırma grublarına uygulan Klotho ve endosülfanın etkilerini gözlemlemek için HT22 hücreleri 2500 rpm' de 5 dk santrifüj edildi ve pellet kısmı alındı. 1 ml soğuk PBS' de çözünen pelet pipetaj yapılarak çözdürüldü. 2500 rpm de 3 dakika santrifüj edildi. Soğuk PBS ortamdan uzaklaştırıldı. Pelet 1 ml protein Ex ile çözdürüldü. 5 dakika buz üzerinde inkübe edildi. 16000 rpm' de 10 dakika +4 °C'de santrifüj edildi. Süpernatant yeni bir tüpe alındı. Alınan tüp daha sonra kullanılmak üzere -20 °C ye kaldırıldı.

### **3.3.3.3. Protein Miktarı Ölçümü**

Qubit floresan cihazı ile Protein miktarı ölçüldü. Qubit assay total protein ölçümü yapar. Seyreltilmiş BSA standartlarını içermektedir. Çalışmamızda 1.5 ml lik mikrosantrifüj tüpüne standart (3 adet) ve çalışılacak örnek miktarı (n) başına 199 µl Quant-iT buffer eklenildi. daha sonra Quant-iT buffer üzerine standart (3 adet) ve çalışılacak örnek miktarı (n) başına 1µl Quant-iT reagent eklenildi. Böylece her örnek ve standart başına 200µl çalışma solüsyonu elde edildi. En az 15 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübe edildi ve ölçüm yapıldı.

### 3.3.3.4. Protein Örneklerinin Hazırlanması

Qubit fluorometer cihazı ile yapılan ölçüm sonrası elde edilen protein miktar değerine ve transfer sonrası kullanılacak deteksiyon Kemiluminesans yöntemine göre jele yükleyeceğimiz protein miktarı belirlendi. Deteksiyon yöntemine bağlı olarak Jele yüklenmesi gereken minimum miktarı, Qubitte ölçülen protein miktarına bölündü ve bu değer kadar proteini ul cinsinden mikrosantrifüj tüpüne ilave edildi. Tablo 3.8’de gösterilen oranlarda mix hazırlandı.

Tablo 3.8: Protein Örneklerinin Hazırlanması

Sample	50 µl
4X LDS	10 µl
10X Sample Reducing Agent	4 µl
H <sub>2</sub> O	-

Hazırladığımız örnekler 70 °C’de 10 dk boyunca denatüre edildi. Denatüre ettiğimiz örnekleri 2 dk buz üzerine alınarak soğuması sağlandı.

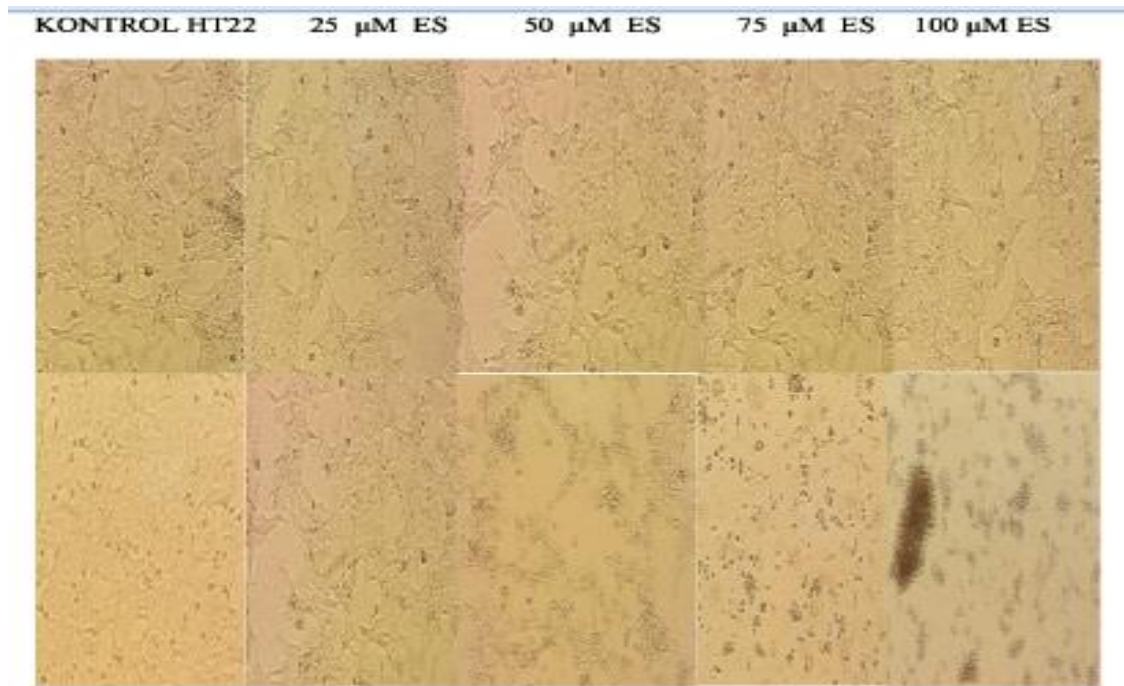
Çalışmamız için; Jel altındaki bantlar çıkarıldı kuyuları yıkandı ve boş bir şekilde 150 voltta 5 dakika elektroforez yapıldı. 70 °C de’ 10 dk kaynatılan proteinler buz üzerine alındı ve soğuduktan sonra jele 60 µl örnek yüklendi.

Örnekler jele KONTROL-E-K12-K16-E+K şeklinde yüklendi.

110 voltta 60 dk yürütülen proteinler i-blot cihazında membrana transfer edildi. Ardından membran ponceous solüsyonu ile boyandı ve total protein varlığı kontrol edildi. Membran görüntüsünde total protein görüldüğü için devam edildi. Bloklama solüsyonu konularak 1.30 saat inkübasyon yapıldı. 1:500 oranında dilüe edilerek hazırlanan primer antikor eklendi ve overnight inkübasyon yapıldı. (Bloklama ne ile yapılıyorsa antikor dilüsyonu da aynı solüsyon ile yapılmalıdır) 3X5 dk arayla yıkamaları yapıldı. SAEP003 (Goat Anti Rabbit-elabscience) antikorunu 1:1000 oranında dilüe edildi. Membrana eklendi. 45 dakika +4 °C’de shakerda bekledi. Ardından 3x5 dk arayla yıkamaları yapıldı. 2x2 dk arayla distile su ile yıkama yapıldı. Ecl substrate eklendi ve görüntü alındı.

#### 4.BULGULAR

HT22 hücre serisinde endosülfanın farklı dozlarının morfolojik etkisini görmek için önce hücreler 12 well kuyucuğa ekim yapıldı. Hücrelerin konfluenti %70 olduğunda 25, 50, 75 ve 100  $\mu\text{M}$  olacak şekilde endosülfan uygulaması yapıldı. Şekil 4.1'de 24 saat sonra HT22 hücre serisinde endosülfan dozlarının (Kontrol, 25, 50, 75 ve 100  $\mu\text{M}$ ) uygulama öncesi ve sonrası mikroskop görüntüsünü gösterilmektedir.



Şekil 4.1: HT22 Hücre Serisinde Endosülfan Dozlarının (Kontrol, 25, 50, 75 ve 100  $\mu\text{M}$ ) Uygulama Öncesi ve Sonrası Mikroskop (10X) Görüntüsü

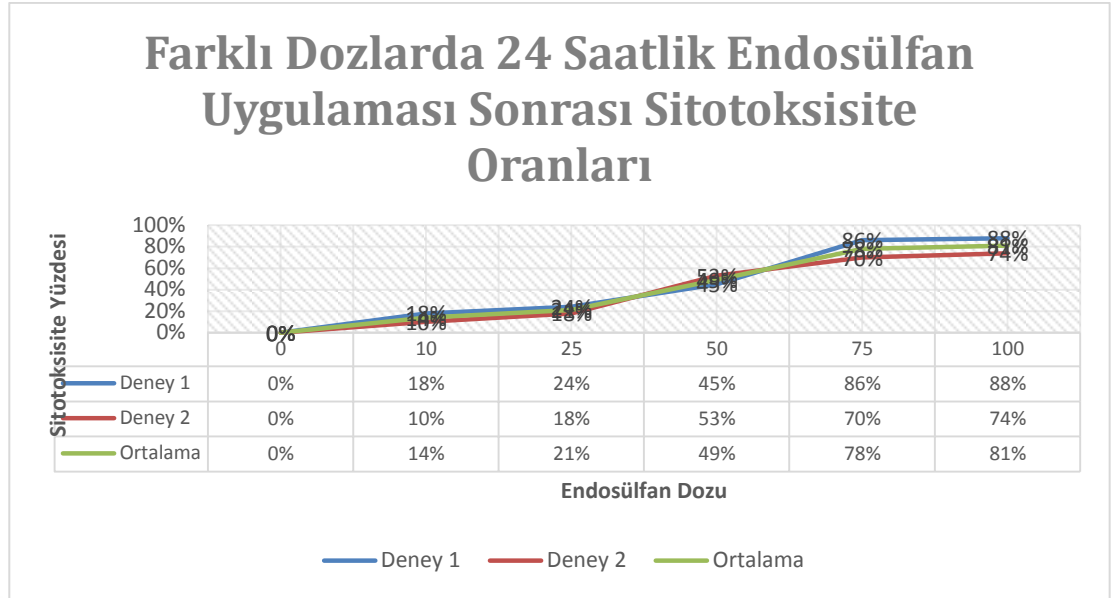
Çalışmamızda, HT22 hücre serilerinde, ES' nin farklı dozlarında 24 saatlik muamele sonrası IC50 dozunun belirlenmesi hedeflenmiştir. Bu bağlamda etkin dozu bulmak için deneyimiz iki kez tekrarlanmıştır. İlk yapılan deneyde 10  $\mu\text{M}$  ES için %18, 25  $\mu\text{M}$  ES için %24, 50  $\mu\text{M}$  ES için % 45, 75  $\mu\text{M}$  ES için %86 ve 100  $\mu\text{M}$  ES için %88 sitotoksik oranları bulunmuştur. İkinci deneyimizde 10  $\mu\text{M}$  ES için %10, 25  $\mu\text{M}$  ES için %18, 50  $\mu\text{M}$  ES için %53, 75  $\mu\text{M}$  ES için %70 ve 100  $\mu\text{M}$  ES için %74 sitotoksik oranları bulunmuştur. Sonuçlarımızda kontrole göre %50 oranında sitotoksik etki

gösteren konsantrasyon sitotoksik doz olarak kabul edilmiştir. Endosülfan için IC50 değeri yaklaşık 50  $\mu$ M sitotoksik doz olarak belirlenmiştir. Uygulanan XTT testi sonrası deneylerimizin elisa sonuçları ve sitotoksite oranlarının sonuçları tablo 4.1’ de gösterilmektedir.

Tablo 4.1. : HT 22 Hücre Serisinde Endosülfan Konsantrasyonlarının Elisa Sonuçları ve Sitotoksite Oranları

		Kontrol	Besiyeri	1.Doz (10)	2.Doz (25)	3.Doz (50)	4.Doz (75)	5.Doz (100)
ELİSA (Ham Veri)	1. çalışma	0.4801	0.2729	0.4434	0.4314	0.3884	0.3009	0.2984
	2. çalışma	0.5748	0.3482	0.5542	0.5360	0.4550	0.4167	0.4093
ELİSA (Arındırılmış)	1. çalışma			0.1705	0.1585	0.1155	0.028	0.0255
	2. çalışma			0.2060	0.1878	0.1068	0.0685	0.0611
Sitotoksite (%)	1. çalışma			18	24	45	86	88
	2. çalışma			10	18	53	70	74

Çalışmamızda yaptığımız iki deney sonucunun farklı dozlarda 24 saatlik endosülfan uygulama sonrası sitotoksite oranlarının karşılaştırılmasını Şekil 4.2’deki grafikte gösterilmektedir.



Şekil 4.2: HT 22 Hücre Serisinde Uygulanan Endosülfan Dozlarının (10, 25, 50, 75 ve 100  $\mu$ M) Sitotoksosite Oranlarının Karşılaştırılması

HT22 hücre hattı laboratuvar şartlarında kültüre edilip, deney grupları (K, K12, K16, E ve K+E) oluşturuldu. Antiaging Klotho'nun NHEJ yolağında etkisini belirlemek amacıyla HT22 hücre serisinde, Klotho ve NHEJ yolağında etkili olan Ku70, Ku80 ve DNA-PK genlerinin mRNA ekspresyonları incelendi. RT-PCR' da 3 basamaklı amplifikasyon işleminden sonra, analizi yapılan genlerin ve kontrol Beta Aktin geninin elde edilen amplifikasyon eğrilerine ait döngü eşiği (Ct) değerleri belirlendi. mRNA ekspresyon düzeylerini hesaplamak için formülde kullanılan ortalama  $C_t$  değerleri Tablo 4.2' de verilmiştir.

Tablo 4.2: Moleküler Analizi Yapılan Genlerin RT-PCR Ortalama  $C_t$  Sonuçları

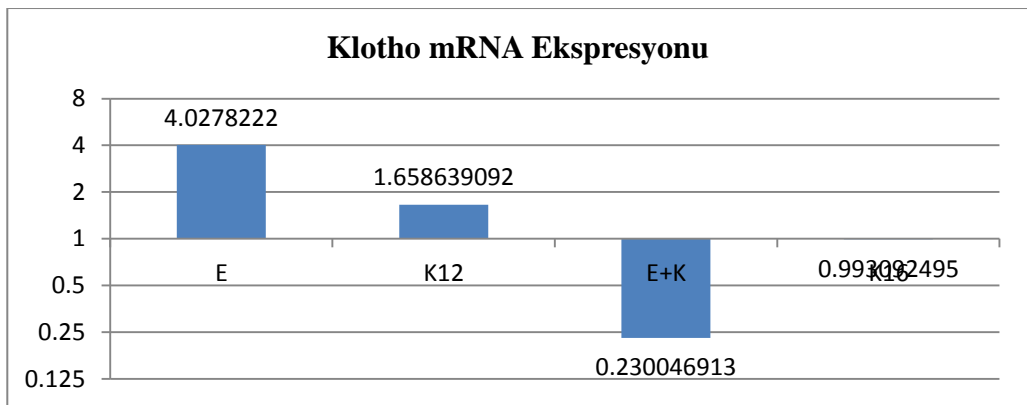
	KLOTHO	Ku70	Ku80	DNA-PK	Aktin Beta
KONTROL	27.99	31	29.98	33.65	30.36
K12	27.95	29	30.22	33.55	31.05
K16	27.12	28.34	28.24	31.47	29.48
K+E	27.11	28.51	26.01	28.24	27.36
E	26.36	27.02	26.87	31.69	30.74

Analizi yapılan genlerin mRNA ekspresyon düzeylerinin nisbi değişimleri  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  metodu ile genlere ait  $C_t$  değerleri kullanılarak hesaplandı (Pfaffl, 2001). Tüm gruplara ait mRNA düzeyleri misli olarak artış veya azalış şeklinde hesaplanırken kontrol grubu baz alınmıştır. Bizim sonuçlarımız tablo 4.3 'de gösterilmiştir.

Tablo 4.3: Moleküler analizi yapılan genlerin RT-PCR  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  sonuçları

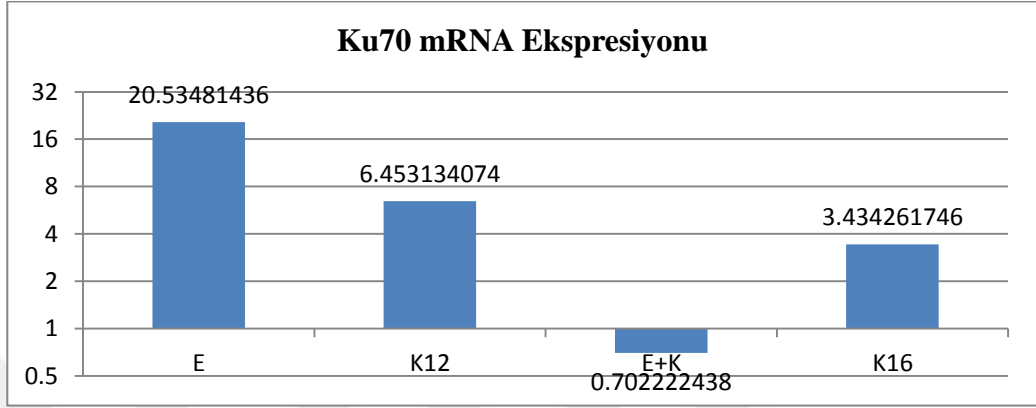
	Klotho	Ku70	Ku80	DNA PK
E	4.0278222	20.53481436	11.23555901	5.063026376
K12	1.658639092	6.453134074	1.366040257	1.729074463
K+E	0.230046913	0.702222438	1.958840595	5.314743256
K16	0.993092495	3.434261746	1.815038311	2.462288827
KONTROL	1	1	1	1

Klotho geninin kontrol grubuyla yapılan karşılaştırma sonucu, E ve K12 gruplarında ekspre olduğu görülürken, E+K ve K16 gruplarında baskılandığı görülmüştür. Şekil 4.3'de Klotho geninin mRNA ekspresyonu gösterilmiştir.



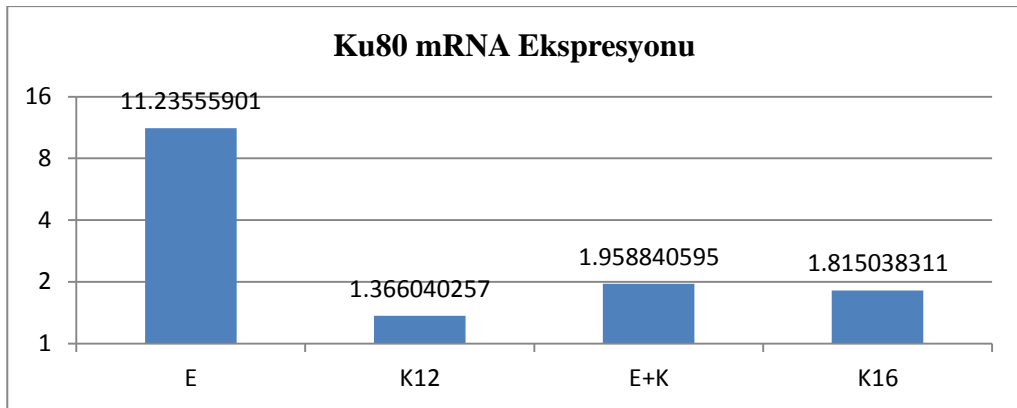
Şekil 4.3: Klotho mRNA Ekspresyonu ( Endosülfan (E), Klotho (K12/12 saat), Klotho (K16/16 saat) ve Edosülfan / Klotho eş zamanlı (E+K) grupları ile muamele edilen HT22 hücrelerinde RT-PCR analizi ile mRNA Ekspresyonu)

Ku70 geninin kontrol grubuyla yapılan karşılaştırma sonucu, E, K12 ve K16 gruplarında ekspre olduğu ve özellikle endosülfan uygulanan grupta daha fazla ekspre olduğu görülürken, E+K grubunda baskılandığı görülmüştür. Şekil 4.4' de Ku70 geninin mRNA ekspresyonu gösterilmiştir.



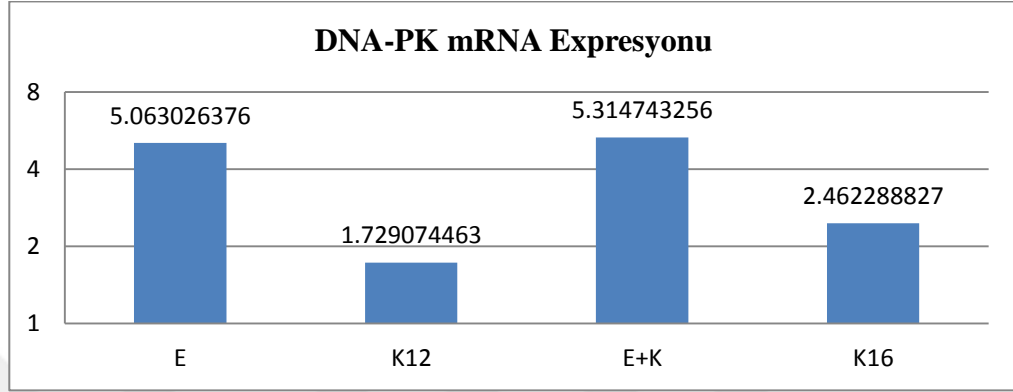
Şekil 4.4: Ku 70 mRNA Ekspresyonu ( Endosülfan (E), Klotho (K12/12 saat), Klotho (K16/16 saat) ve Edosülfan / Klotho eş zamanlı (E+K) grupları ile muamele edilen HT22 hücrelerinde RT-PCR analizi ile mRNA Ekspresyonu)

Ku80 geninin kontrol grubuyla yapılan karşılaştırma sonucu genin tüm gruplarda (E, K12, K16 ve E+K) ekspre olduğu ve özellikle endosülfan uygulanan grupta daha fazla ekspre olduğu görülmüştür. Şekil 4.5' de Ku80 mRNA ekspresyonu gösterilmiştir.



Şekil 4.5: Ku 80 mRNA Ekspresyonu ( Endosülfan (E), Klotho (K12/12 saat), Klotho (K16/16 saat) ve Edosülfan / Klotho eş zamanlı (E+K) grupları ile muamele edilen HT22 hücrelerinde RT-PCR analizi ile mRNA Ekspresyonu)

DNA-PK geninin kontrol grubuyla yapılan karşılaştırma sonucu genin tüm grublarda (E, K12, K16 ve E+K) ekspre olduğu ve özellikle E ile E+K grubta daha fazla ekspre olduğu görülmüştür. Şekil 4.6'da DNA-PK geninin mRNA ekspresyonu gösterilmiştir.



Şekil 4.6: DNA-PK mRNA Ekspresyonu ( Endosülfan (E), Klotho (K12/12 saat), Klotho (K16/16 saat) ve Edosülfan / Klotho eş zamanlı (E+K) grupları ile muamele edilen HT22 hücrelerinde RT-PCR analizi ile mRNA Ekspresyonu)

HT22 hücreleri tablo 3.3'de belirtilen araştırma grupları 37°C' de % 5 CO<sub>2</sub> içeren ortamda inkübe edildi ve tablo 3.8' de belirtildiği gibi ekstrakt yapıp Western Blot analizi için kullanıldı. Bu yöntemle Klotho, Ku70, pKu70, Ku80, DNA- pk ve pDNA-pk proteinlerin ifadesi analiz edildi. Ayrıca bir housekeeping gen (genel olarak zaman ya da koşula bağlı olarak ifade düzeyi değişmez) olarak bilinen Aktin Beta geninin ifadesi de bu analizde yüklenen protein miktarının eşit olduğunu göstermek amacıyla kontrol olarak kullanıldı. Western Blot analizi sonucu elde edilen veriler ImageJ programıyla densitometre analizi yapılarak değerlendirildi. Yapılan densitometre analizi sonucu elde edilen bant yoğunlukları Aktin Beta ile normalize edilerek % değerler olarak tablo 4.4' de gösterilmiştir.



Tablo 4.4: Araştırma Grupları ve Moleküler Analizi Yapılan Proteinlerin % Bant Yoğunluğu

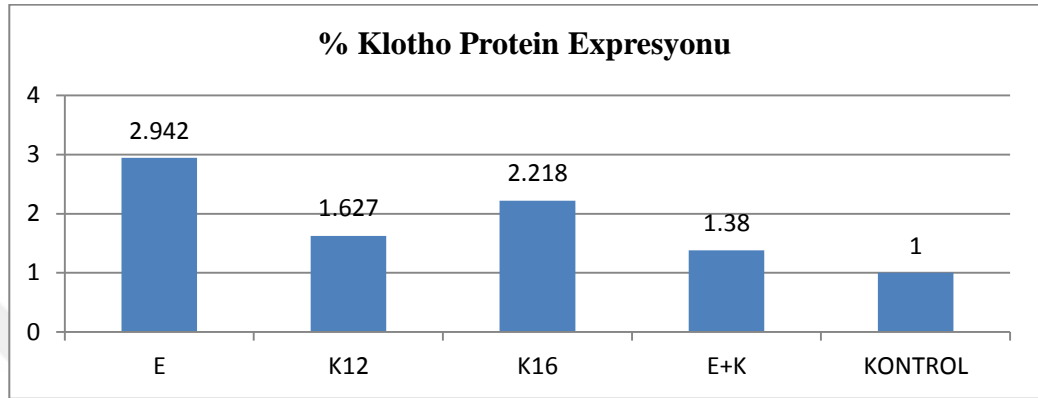
	<b>Klotho</b>	<b>Ku70</b>	<b>pKu70</b>	<b>Ku80</b>	<b>DNA- pk</b>	<b>pDNA- pk</b>	<b>Actin Beta</b>
<b>E</b>	32.097	30.312	36.872	44.068	4.848	35.737	18.792
<b>KL12</b>	17.752	26.716	23.497	17.566	42.516	23.295	19.836
<b>KL16</b>	24.192	19.739	15.706	2.184	9.798	15.997	20.897
<b>E+KL</b>	15.052	15.182	15.416	26.926	7.294	15.748	20.236
<b>K</b>	10.907	8.050	8.509	9.257	35.543	9.224	20.239

Klotho proteininin kontrol grubuyla yapılan karşılaştırma sonucu genin tüm grublarda (E, K12, K16 ve E+K) ekspre olduğu görülmüştür. Şekil 4.7’de klotho proteininin western blot sonucu ekspresyonu gösterilmiştir.

	<b>K</b>	<b>E</b>	<b>K12</b>	<b>K16</b>	<b>E+K</b>
<b>Klotho 62 Kda</b>					
<b>B-actin 42 Kda</b>					

Şekil 4.7: Klotho proteininin ifade düzeyi (Kontrol (K), Endosülfan (E), Klotho (K12/12 saat), Klotho (K16/16 saat) ve Endosülfan / Klotho eş zamanlı (E+K) grupları ile muamele edilen HT22 hücrelerinde WB analizi ile protein ifade düzeyi)

Şekil 4.8 'de Western Blot analizinde görülen bant yoğunluğunun densitometre analizi sonucunda Klotho'nun bant yoğunluğu  $\beta$ -actin ile normalize edilerek % olarak verilmiştir. Grafiğe göre (kontrolle karşılaştırıldığında) tüm grupların % protein ekspresyonunda artma olduğu görülmektedir. Bu artış endosülfan uygulanan grupta en yüksek seviyeye ulaşmıştır.



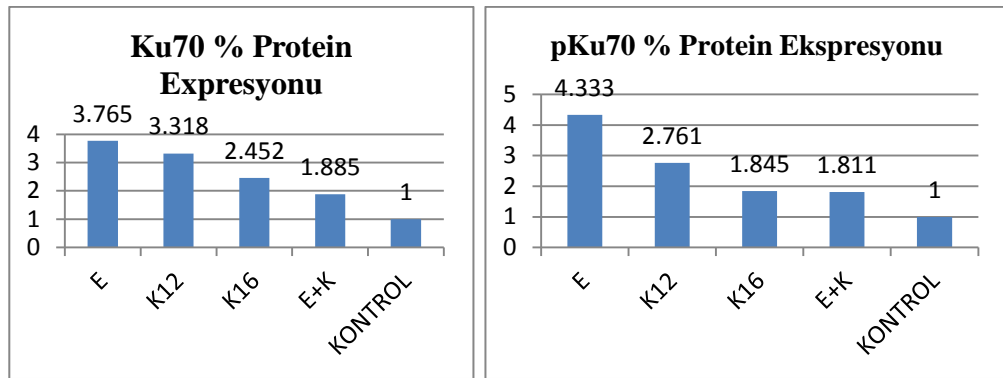
Şekil 4.8: Klotho ifadesinin % olarak değerlendirilmesi (Kontrol (K), Endosülfan (E), Klotho (K12/12 saat), Klotho (K16/16 saat) ve Edosülfan/ Klotho eş zamanlı (E+K) grupları ile muamele edilen HT22 hücrelerinde WB analizi ile protein ifade düzeyi)

Araştırma grupları ile muamele edilen HT22 hücrelerinde Ku70 ve pKu70 proteininin kontrol grubuyla yapılan karşılaştırma sonucu genin tüm grublarda (E, K12, K16 ve E+K) ekspresyonu olduğu görülmüştür. Özellikle endosülfan uygulanan grupta en yüksek olmakla birlikte endosülfan ve Klotho'nun eş zamanlı olarak uygulanan grupta azalma göstermiştir. Aynı şekilde pKu70 protein ifade düzeyinde kontrole göre tüm grublarda bir artma gözlenmiştir. Bu artış endosülfan uygulanan grupta en yüksek olmakla birlikte Klotho uygulanan grublarda azalma göstermiştir. Şekil 4.9'da Ku70 ve pKu70 proteininin western blot sonucu ekspresyonu gösterilmiştir.

	K	E	K12	K16	E+K
<b>Ku70</b> (70kDA)					
<b>pKu70</b> (70 kDA)					
<b>B actin</b> (42 kDA)					

Şekil 4.9: Ku70 ve pKu70 protein ifade düzeyi (Kontrol (K), Endosülfan (E), Klotho (K12/12 saat), Klotho (K16/16 saat) ve Endosülfan / Klotho eş zamanlı (E+K) grupları ile muamele edilen HT22 hücrelerinde WB analizi ile protein ifade düzeyi)

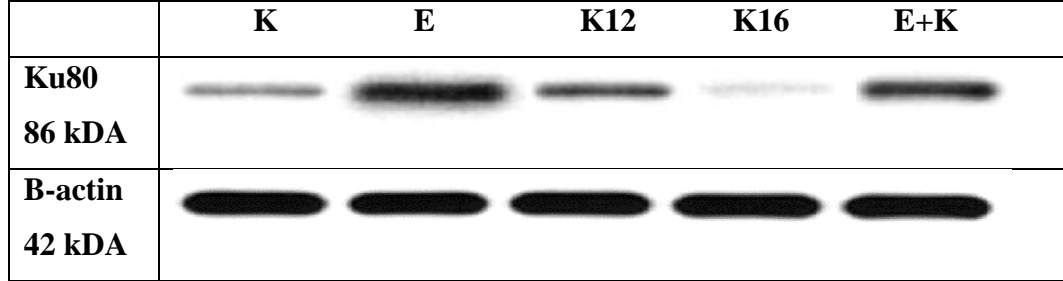
Şekil 4.10 'da Western Blot analizinde görülen bant yoğunluğunun densitometre analizi sonucunda Ku70 ve pKu70 proteinin bant yoğunlu β-actin ile normalize edilerek % olarak verilmiştir. Grafiğe göre (kontrolle karşılaştırıldığında) tüm grupların % protein ekspresyonunda artma olduğu görülmektedir. Bu artış endosülfan uygulanan grupta en yüksek seviyeye ulaşmıştır.



Şekil 4.10: Ku70 ve pKu70 protein ifadesinin % olarak değerlendirilmesi (Kontrol (K), Endosülfan (E), Klotho (K12/12 saat), Klotho (K16/16 saat) ve Endosülfan / Klotho eş zamanlı (E+K) grupları ile muamele edilen HT22 hücrelerinde WB analizi ile protein ifade düzeyi)

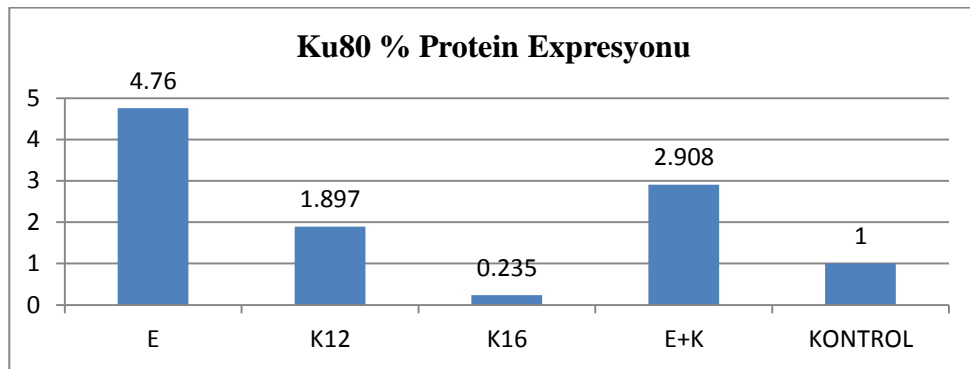
Araştırma grupları ile muamele edilen HT22 hücrelerinde Ku80 proteininin kontrol grubuyla yapılan karşılaştırma sonucu proteinin ifade düzeyi endosülfan, K12

ve K+E grublarında bir artma gözlenirken K16 grubunda kontrole göre bir azalma görülmüştür. Şekil 4.11’ de Ku80 proteininin western blot sonucu ekspresyonu gösterilmiştir.



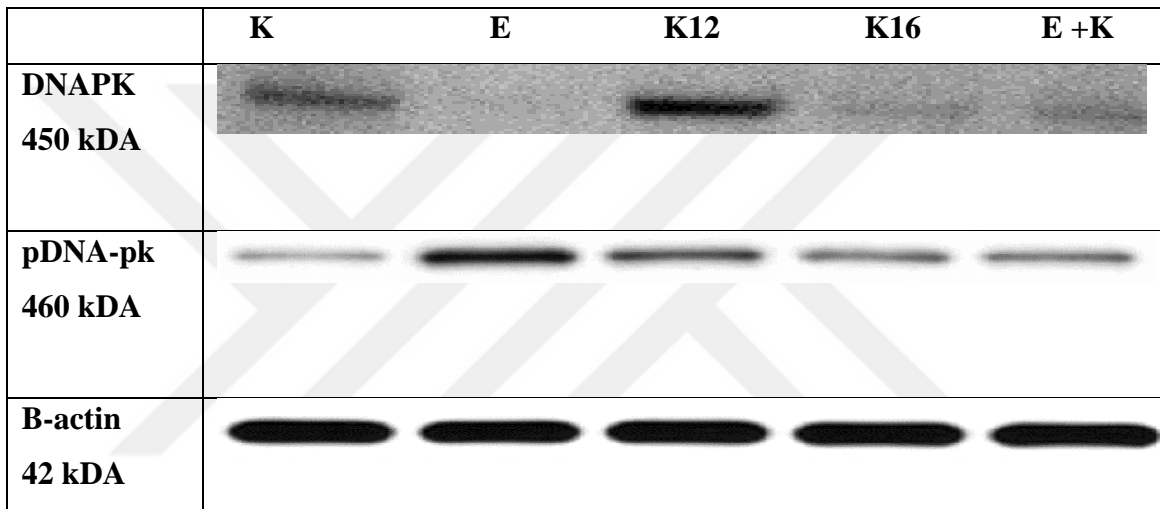
Şekil 4.11: Ku80 protein ifade düzeyi (Kontrol (K), Endosülfan (E), Klotho (K12/12 saat), Klotho (K16/16 saat) ve Edosülfan / Klotho eş zamanlı (E+K) grupları ile muamele edilen HT22 hücrelerinde WB analizi ile protein ifade düzeyi)

Şekil 4.12’ de Western Blot analizinde görülen bant yoğunluğunun densitometre analizi sonucunda Ku80 proteininin bant yoğunluğu  $\beta$ -actin ile normalize edilerek % olarak verilmiştir. Grafiğe göre (kontrolle karşılaştırıldığında) K16 hariç diğer gruplarda % protein ekspresyonunda artma olduğu görülmektedir. Bu artış endosülfan uygulanan grupta en yüksek seviyeye ulaşmıştır. K16 grubunda Ku80 protein ifadesi baskılanmıştır.



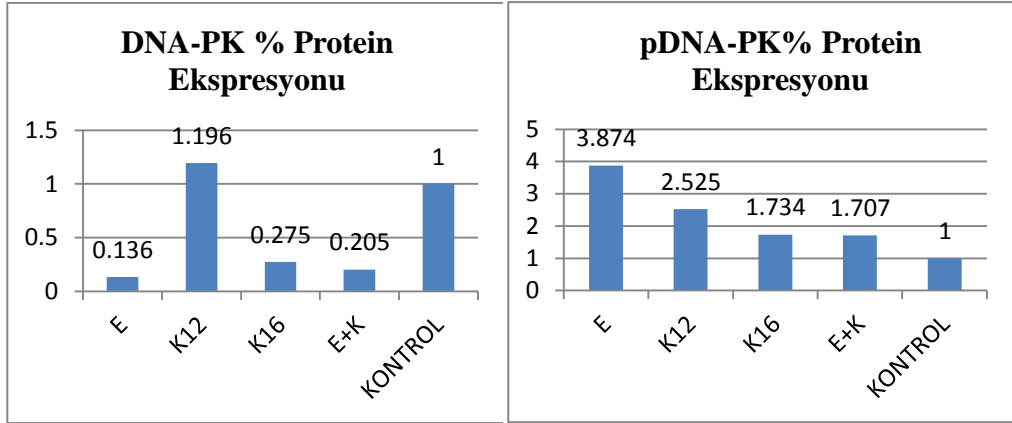
Şekil 4.12: Ku80 proteinin ifadesinin % olarak değerlendirilmesi (Kontrol (K), Endosülfan (E), Klotho (K12/12 saat), Klotho (K16/16 Saat) ve Edosülfan / Klotho eş zamanlı (E+K) grupları ile muamele edilen HT22 hücrelerinde WB analizi ile protein ifade düzeyi)

Araştırma grupları ile muamele edilen HT22 hücrelerinde DNA-PK ve pDNA-PK proteinin ifade düzeyi western blot analizi ile belirlenmiştir. DNA-PK proteini kontrolle karşılaştırıldığında, sadece K12 grubunda bir artış göstermiştir. Diğer gruplarda ise belirgin bir azalış göstermiştir. pDNA-PK proteininde ise kontrolle karşılaştırıldığında bir artma gözlenmiştir. Bu artış endosülfan uygulanan grupta en yüksek olduğu gözlenmiştir. Şekil 4.13’ de DNA-PK ve pDNA-PK proteininin western blot sonucu ekspresyonu gösterilmiştir.



Şekil 4.13: DNA-PK ve pDNA-PK protein ifade düzeyi (Kontrol (K), Endosülfan (E), Klotho (K12/12 saat), Klotho (K16/16 Saat) ve Edosülfan / Klotho eş zamanlı (E+K) grupları ile muamele edilen HT22 hücrelerinde WB analizi ile protein ifade düzeyi)

Şekil 4.14’ de Western Blot analizinde görülen bant yoğunluğunun densitometre analizi sonucunda DNA-PK ve pDNA-PK proteininin bant yoğunluğu  $\beta$ -actin ile normalize edilerek % olarak verilmiştir. Grafığe göre DNA-PK’nın kontrolle karşılaştırıldığında, tüm gruplarda % protein ekspresyonunda azalma olduğu görülmektedir. pDNA-PK ise (kontrolle karşılaştırıldığında), tüm gruplarda % protein ekspresyonunda artma olduğu görülmektedir. Bu artış endosülfan uygulanan grupta en yüksek seviyeye ulaşmıştır.



Şekil 4.14: DNA-PK ve pDNA-PK protein ifadesinin % olarak değerlendirilmesi (Kontrol (K), Endosulfan (E), Klotho (K12/12 saat), Klotho (K16/16 Saat) ve Edosulfan / Klotho eş zamanlı (E+K) grupları ile muamele edilen HT22 hücrelerinde WB analizi ile protein ifade düzeyi)

## 5.TARTIŞMA ve SONUÇ

Yaşlanma, zaman içerisinde canlının çevre ile olan ilişkilerinde dengelerinin çevre lehine sonuçlandığı bir süreçtir. Bu sürecin ilerleyiş hızı canlının çevre ile olan etkileşimi ve kendi kalıtsal özelliklerine bağlı olarak değişmektedir. Bu nedenle, yaşlanma olayı ortalama belirli bir süreç içerisinde ilerlese de, söz konusu çevresel ve kalıtsal faktörlere bağlı olarak kimi bireyler daha hızlı, kimisi ise daha geç yaşlanmaktadır. İnsanlar için yaşlanma sürecini etkileyen çevresel faktörlerin başında beslenme alışkanlığı ve kalitesi, içki ve sigara alışkanlığı, yaşanılan ortamın kalitesi gelmektedir.

Genetik faktörler arasında ise farklı metabolik yolları kontrol eden birçok gen yer almaktadır. Farklı metabolik yollarla ilgili bu genler yaşam sürecini pozitif ya da negatif yönde etkilemektedir. Son on yılda, gittikçe artan sayıda analitik teknik, bu sürecin altında yatan yollar hakkında daha iyi bilgi sahibi olmayı ve insan ömrünü uzatma hedefi ile yaşlanmanın moleküler temelini daha iyi anlamamızı sağlamıştır.

Yaşa bağlı fizyolojik değişim (hipertansiyon, insülin direnci) ve yaşa bağlı patolojik değişikliklere yatkınlık (kanser, nörodejeneratif hastalık) ile ilgili literatürde çok sayıda çalışma bulunmakla birlikte, bu sürecin işleyişinin tam olarak tanımlanması ve görevli tüm faktörlerin anlaşılması için daha ileri çalışmalara ihtiyaç vardır. Mevcut bilgilere dayanarak, başarılı bir yaşlanma karşıtı strateji için en umut verici yaklaşımlardan biri, Klotho gen ekspresyonunu içermektedir.  $\alpha$ Klotho içeriği yaşam süresini etkilediğinden, patolojik yaşlanmaya ve buna bağlı bilişsel gerilemeye karşı koruyucu etkisi olduğu bildirildiğinden,  $\alpha$ Klotho'nun rolü geleneksel olarak patolojik yaşlanma açısından incelenmiştir.

Kemirgenlerde ve insanlarda yapılan çalışmaların gen ve protein ekspresyonu analizleri,  $\alpha$ Klotho'nun böbrek ve beynin koroid pleksusundaki bol miktarda eksprese edildiğini ve paratiroid bezi, tiroid bezi, pankreas ve cinsiyet organları gibi alanlarda daha az miktarda olduğunu göstermektedir (Krajisnik ve ark. 2010; Lim ve ark. 2015). Dolaşan Klotho bir hormon olarak işlev görmekte ve Klotho'yu ifade etmeyen hücrelerin (vasküler endotel hücreleri ve düz kas hücreleri) veya dokuların

fonksiyonlarını düzenlemektedir. Bu önerilen işlev kısmen Klotho geninin mutasyonunun neden sadece birkaç dokuda (örneğin, böbrek ve beyin koroid pleksusu) ifade edilmesine rağmen geniş yaşlanma fenotiplerine neden olduğunu açıklayabilmektedir (Xu ve Sun 2015).

Yokoyama ve arkadaşlarının yaptığı çalışmalarda KL varyantlarının uzun ömürlülüğe olan genetik etkileri araştırılmış ve bu varyantların beyin yapısal ve fonksiyonel bütünlüğünü desteklediği bulunmuştur (Yokoyama ve ark. 2015). Ayrıca, yüksek serum Klotho düzeyleri Alzheimer ve yaşlanmaya karşı savunmasız olan beyin önemli fonksiyonel ağlarındaki daha büyük intrinsik bağlantılı ölçümlerle ilişkilendirilmiş ve yükselen Klotho seviyelerinin kritik beyin bölgelerinin ağ bağlantısının artmasıyla güçlü bir beyni teşvik ettiği ileri sürülmüştür (Yokoyama ve ark. 2017).

Anna ve arkadaşları Alzheimer hastası 3xTg-AD transgenik modelleriyle yaptıkları başka bir çalışmada salgılanabilir Klotho'nun C terminal ucunda bulunan özel bir peptite karşı, yeni bir antikor üretmişlerdir. K113 adı verilen bu antikor kullanılarak serebellum, prefrontal korteks, korteks ve hipokampus gibi beyin farklı bölgelerinde salgılanan Klotho protein seviyeleri spesifik olarak analiz edilmiştir. Alzheimer hastası 3xTg-AD transgenik modellerinin beyin alanlarındaki klotho ekspresyonu hızlı bir şekilde azaldığını göstermişlerdir (Anna ve ark. 2015). Yapılan son çalışmalarda, salgılanan formuna benzer olan ve periferal olarak uygulanan  $\alpha$ Klotho protein fragmenti ( $\alpha$ KL-F) kan-beyin bariyerini geçememesine rağmen, şaşırtıcı bir şekilde bilişsel güçlendirme ve sinirsel esnekliğe neden olduğu bulunmuştur (Leon ve ark. 2017).

Klotho proteininin fazla miktarda sentez edilmesi anlamlı olarak oksidatif strese direnç kazandırarak yaşlanma sürecini yavaşlatmakta ve yaşam süresini uzatmakta olduğu bilinmektedir. Bunun yanı sıra oksidatif hasara ve nöronal hücre ölümüne yol açan reaktif oksijen türlerinin üretimi, Alzheimer hastalığını içeren nörodejeneratif hastalıkların patogeneğinde önemli bir rol oynadığı bilinmektedir.

Zeldich ve arkadaşları yaptıkları çalışmada HT22 hücrelerinde Klotho'nun triiodoksin ve prexiredoksin (Trx/Prx) ekspresyonunu bir hayli hızlandırdığını, bunun da özellikle bir antioksidant enzim olan Prx2'nin indüksiyonu arttırdığı bildirilmektedirler



(Zeldich ve ark. 2014). Prx'ler yeni karakterize edilmiş bir peroksit temizleyici enzim ailesidir. Nöronal fizyoloji ve patoloji bağlamında artan önemi olan bir antioksidan enzimatik sistemi temsil etmektedir. Serebral iskemi, AD ve Parkinson hastalığında Prx-2 ve Prx-3'ün değişmiş ifadesi gösterilmiştir. Prx-2'nin gelişmiş nöronal ekspresyonunun ve aktivitesinin nöronları iskemik hasardan koruduğu bildirilirken, Trxrd eksikliğinin dopaminerjik nöronlardaki oksidatif stresi arttırdığı gösterilmiştir. Klotho indüksiyonunun, uzun ömürlülükte önemli bir yolak olan PI3K/Akt yolağının fosforilasyonu, Fox3a'nın sürdürülen inhibitör fosforilasyonu ve Prx2' nin indüksiyonu ile ilişkili olduğu bulunmuştur (Zeldich ve ark. 2014; Adeli ve ark. 2016).

Yaşlanma, yaşlanma sürecinin hızını etkileyen ve bireylerarası genetik varyantlarla belirlenen farklı mekanizmalarla kontrol edilmektedir. Genlerdeki genetik varyantlar nedeniyle oluşan insülin ve lipid metabolizma hastalıkları, metabolizmanın bu kısımlarında yüksek düzeyde görülen glikolizasyon ile doku hasarı nedeniyle ortaya çıkarlar. Değişmiş IGF sinyalleşme yolağında ortaya çıkan insan IGF1R'deki genetik değişiklikler, insan ömrünün modülasyonunda bu yolağın bir rolü olduğunu düşündürecek şekilde, insan ömrünün uzamasına yakınlıkta bir artış sağlamaktadır.

Pek çok araştırmada özellikle insülin ve İnsülin benzeri büyüme faktörü 1'in (IGF-1) yaşlanma araştırmalarında önemli bir yol olduğu düşünülmüştür (Kuang ve ark. 2014; Xuan ve ark. 2016).  $\alpha$ Klotho'nun antiaging etkileri, yaşlanmayı bastırmak için evrimsel olarak korunan bir mekanizma olan insülin benzeri sinyalleşmenin inhibisyonuna atfedilmiştir (Kenyon ve ark. 2005 ). *İn vitro* çalışmalar, sKl'in, insülin / IGF-1 reseptörlerinin otofosforilasyonunu ve insülin reseptör substratlarının (IRS) tirozin fosforilasyonunu ve IRS proteinleri (Kurosu ve ark. 2005 ) ile fosfoinositid 3-kinazı (PI3K) içeren akış aşağı sinyal olaylarını bastırdığını göstermiştir.

Son yıllarda Alzheimer hastalarında insülin / İGF sinyal yolağı ile bağlantılı çalışmalar bulunmaktadır. Chitnis ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada IGF-1R inhibisyonunun, NHEJ yolağını etkileyip etkilemediğini araştırmak için üç strateji kullanmışlardır. Birincisi onarım proteinlerinin ekspresyonu üzerinde AZ12253801 etkisini değerlendirmek, ikincisi IGF-1R ve DNA-PK arasındaki epistasisi test etmek ve üçüncüsü onarım raportör deneyleri gerçekleştirmektir. Çalışma sonucunda IGF-1R azalmasının radyasyon indüklü DNA çift zincir kırıklarının tamirini geciktirdiği

bulunmuştur. IGF-1R inhibisyonu özellikle NHEJ onarım defektini azaltmaktadır. Yapılan bir çalışmada insulin / İGF sinyal yolağı inhibisyonunun homolog olmayan uç birleştirme yolağı tamir mekanizmasını geciktirdiği bulunmuştur (Chitnis ve ark. 2014).

IGF-1R inhibisyonu özellikle NHEJ onarım defektini azaltmaktadır. Gelişmekte olan beyindeki NHEJ aktivitesinin kaybı, prenatal ölüme neden olmaktadır. Yetişkinlerde ise nörodejeneratif hastalıklara yol açabilmektedir. AD olan kişilerde yapılan çalışmalarda reaktif oksijen/nitrojen türlerinin, deregülasyona ve replikasyon stresi olarak bilinen yetersiz DNA replikasyonuna neden olduğu bulunmuştur. AD patogenezindeki replikasyon stresi, deregüle olan hücre döngüsü ve tercihen A $\beta$  birikiminden kaynaklanan genomik kararsızlığa yol açabilmektedir. Bu durumlara ek olarak post mitotik nöronlarda defektif DNA onarım sistemlerin varlığı da daha çok DNA hasarları ve daha çok genomik kararsızlığa neden olmaktadır. Aynı zamanda AD beyinlerinde gözlemlenen DNA içeriğindeki intrasellüler artış bu kombine olaylardan kaynaklanabilmektedir. Yapılan çalışmalarda DNA-PK mutant hücrelerin stres altında replikasyonu durdurmada başarısız oldukları rapor edilmiştir. AD beyinlerinde DNA-PK ve Ku protein seviyelerinin yanı sıra azalan NHEJ aktivitesi gösterilmiştir. Aynı zamanda normal yaşlı beyinlerde DNA-PK ve Ku protein seviyelerinin azaldığı gösterilmiştir (Shackelford ve ark. 2006 ; Chitnis ve ark. 2014; Kanungo, 2016).

Literatürde Klotho protein ile NHEJ yolağı arasındaki ilişkiyi inceleyen çalışma bulunmamaktadır. Çalışma kapsamında, literatürde ilk defa olarak Klotho proteininin NHEJ yolağında etkisi, bu yolakta iş yaptığı bilinen Ku70/Ku80 ve DNA-PK genlerinin ekspresyonu ve proteinlerin işlevi araştırılarak belirlenmiştir. Bunun için kullanılan HT22 hippocampal hücre serileri ile bu hücrelerde de NHEJ yolağının ve aynı zamanda NHEJ tamir yolağının yaşlanma patogenezindeki rolü araştırılmıştır.

Yapılan tez çalışmasında öncelikle XTT sitotoksite testi ile endosülfanın IC50 dozu belirlenmiştir. Çalışmamızda kullandığımız endosülfan insanlarda hastalıklarla ve kromozomal anomaliklerle ilişkili olabilen organoklorin bir pestisitidir. Ancak onun genotoksik etkisi çok az bilinmektedir. İnsanlar dahil hedef olmayan organizmalar üzerinde toksik ve çeşitli sağlık etkilere neden olduğu bilinmektedir (Ali ve ark. 2014). Özellikle endosülfanın endokrin, immünolojik toksisite, üreme defektleri ve nörodavranışsal bozukluklar gibi olumsuz sağlık etkileri olduğu bilinmektedir. Bu

hastalık etkilerine neden olan endosülfanın etki mekanizması (genomik ya da nongenomik) farklı olabilmektedir. Genel olarak bu mekanizmalar mitokondriyal disfonksiyonu, sinyal iletim yollarını ve oksidatif stres indüksiyonunu içermektedir (Mrema ve Ark. 2013).

Sohn ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada insan hücre hatları olan HeLa ve HepG2 hücrelerinde endosülfanın toksik mekanizması araştırılmıştır. Endosülfan DMSO'da çözdürülerek 20 mM ve 10 mM konsantrasyonları elde edilmiştir. DMEM'de kültüre edilen hücre hatları, endosülfanın sitotoksik etkisini ölçmek için 96 wellin her bir kuyucuğuna  $1 \times 10^5$  olacak şekilde ekim yapılmış ve 50,100 ve 200  $\mu\text{M}$  endosülfan dozları uygulanarak 96 well plate  $\text{CO}_2$  inkübatöründe  $37^\circ\text{C}$ 'de %5  $\text{CO}_2$  içeren ortamda 48 saat inkübe edilmiştir. Hücre canlılığı MTT ile 540 nm absorbansta değerlendirilmiştir. HeLa hücreleri ile karşılaştırıldığında HepG2 hücreleri endosülfana çok daha duyarlı olduğu gösterilmiştir. Belirlenen  $\text{IC}_{50}$  değerleri HepG2 için 49.37  $\mu\text{M}$  ve HeLa için 86  $\mu\text{M}$  olmuştur. Sonuçlar hücre hatlarının endosülfana karşı duyarlı olmasına rağmen toksik etkisinin farklı olduğunu göstermektedir (Sohn ve Ark. 2004). Çalışmamızda endosülfan DMSO' çözdürülerek 10 mM konsantrasyonunda ana stok hazırlanmıştır. Endosülfanın sitotoksik etkisini ölçmek için DMEM de kültüre edilen HT 22 hücre serisi 96 wellin her bir kuyucuğuna 10.000 hücre /100  $\mu\text{l}$  olacak şekilde hücre ekimi yapılmıştır. 10, 25, 50, 75 ve 100  $\mu\text{M}$  endosülfan dozları uygulanarak 24 saat inkübe edilmiş ve XTT ile 492 nm absorbansta değerlendirilmiştir. Belirlenen  $\text{IC}_{50}$  değeri yaklaşık 50  $\mu\text{M}$  bulunmuştur.

Yapılan bir çalışmada nöronal hücre hattı olan SH-SY5Y'de endosülfan kaynaklı oksidatif stres rolü incelenmiştir. 100 mM endosülfanın stok solüsyonu 100% dimethylsulfoxide (DMSO) kullanılarak hazırlanmıştır. Bu stok solüsyon 4 çalışma solüsyonu hazırlamak için RPMI-1640 besiyerinde dilüe edilmiştir. Daha sonra hücreler 50, 100 ve 200  $\mu\text{M}$  endosülfan dozları ile  $37^\circ\text{C}$  ' de 1, 6, 8 ve 20 saat muamele edilmiştir. Peroksit ürünü ilişkili floresans yoğunluğu ile ölçülmüş ve rapor edilmiştir. 50  $\mu\text{M}$  endosülfanın 20 saat inkübasyona maruz kalan hücrelerde  $\text{H}_2\text{O}_2$  ürününde önemli bir artış gözlenmiştir. 100 ve 200  $\mu\text{M}$  gibi yüksek doza maruz kalan hücrelerde 1 saat içinde ROS ürününde önemli artış olmuştur (Jia ve Mısra 2007). Çalışmamızda kullandığımız nöronal hücre hattı HT22 hücrelerine DMSO'da hazırlanan 10 mM

endosülfan stok solüsyonundan DMEMHA besiyerinde dilüe edilen uygulama solüsyonu hazırlanarak beş farklı dozda 24 saat muamele edilmiştir. 50 µM endosülfanın 24 saat inkübasyona bırakılan hücrelerin canlılıklarında yarı yarıya kayıp gözlemlenmiştir.

Sebastian ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada MTT ve trpan blue ile hücre proliferasyonu belirlenmiştir. Reh ve K562 hücreleri ES (1, 5, 10, 25 ve 50 µM) ile muamele edilmiş ve MTT ile 48 ve 72 saat inkübe edilmiştir. Analizler ES toksitesitesi IC50 değeri Reh için 29.5 µM, K562 için 43.2 µM (48 saat) olduğunu ileri sürmüştür (Sebastian ve Raghavan 2016). Bizim de çalışmamızda HT22 hücre serisinin proliferasyonu trpan blue ile belirlenmiş olup endosülfan sitotoksitesi için XTT testi uygulanmıştır. HT22 hücre serisinde 24 saat için IC50 değeri yaklaşık olarak 50 µM olarak belirlenmiştir.

Bu çalışmada endosülfan gibi pestisitlere maruz bırakılan nöronal hücre hattı olan HT22'nin doza ve süreye bağlı artışı sergilenmiştir. HT22 hücre hattında kullanılan ES'nin etkin konsantrasyonunun, kullanılan XTT testi ile sitotoksik etkiye sahip olduğunu gösterdik. Yapılan çalışmalarda endosülfanın sitotoksik etkisinin farklı hücrelerde IC50 dozlarının farklı olabileceği gözlemlenmiştir. Deneyimizde hücrelerin canlılık yüzdesi, endosülfan konsantrasyonunun artmasıyla azalmıştır. 24 saatlik muameleden sonra tüm dozlarda hücrelerin canlılığında bir kayıp meydana gelmiştir. HT22 hücreleri için IC50 değeri yaklaşık olarak 50 µM olarak belirlenmiştir. Sonuçlarımız, literatürdeki benzer çalışmalara uygun olarak HT22 hücrelerinde apoptozun indüklenmesinin hem endosülfan konsantrasyonuna hem de uygulanan süreye bağlı olduğunu göstermiştir.

Çalışmamıza IC50 değeri yaklaşık olarak 50 µM olarak belirlenen endosülfan ve Klotho ile oluşturduğumuz araştırma gubları; Kontrol, Endosülfan, Klotho (12 saat), Klotho/Endosülfan (12 saat Endosülfan / 16saat Klotho) ve Klotho / Endosülfan eş zamanlı (12 saat) ile devam edilmiştir. NHEJ yolağında etkili olan genlerin hem endosülfan hem de Klotho ile bağlantısı araştırılmıştır.

Çalışmamızda kullandığımız endosülfan insanlarda hastalıklarla ve kromozomal anomaliklerle ilişkili olabilen organoklorin bir pestisittir. Ancak onun genotoksik etkisi

çok az bilinmektedir. İn vivo ve in vitro model sistemleri endosülfana maruz kalmanın ROS'u indüklediğini göstermektedir. Hem insan hem de fare hücrelerinde ROS'ların indüklenmesi DNA' da çift zincir kırıklarına neden olmaktadır. ES indüklü DNA hasarı, DNA hasar yanıtlarına yol açmaktadır ve NHEJ'in yükselen seviyelerine neden olmaktadır (Sebastian ve Raghavan, 2016).

ROS'ler, hücrelerdeki DNA hasarından sorumlu ana pato-fizyolojik faktörlerden biridir. Hücre hatlarında konsantrasyon ve zamana bağlı bir şekilde ES'nin ROS indüklediğini gözlemlenmiştir. Farelerin akciğer bölümlerine ES tedavisini takiben, 53BP1'in yüksek ekspresyonunu gösterilmiştir. (kontrollerle karşılaştırıldığında). Bu da akciğerlerde DNA çift iplik kopması oluşumunu göstermektedir. ES'nin ROS'u sağlayıp sağlamadığını incelemek için, ES ile muamele edilmiş Reh hücrelerinde (0.5, 1, 2 saat boyunca 10, 25  $\mu\text{M}$ ) akış sitometri analizi yapılmıştır. Sonuçlar, zamana bağlı bir şekilde ROS üretimini göstermiş ve işlemden 2 saat sonra en yüksek ROS üretimi (25 $\mu\text{M}$ ) görülmüştür (Sebastian ve Raghavan, 2016).

Çalışmalar Klotho'nun fazla miktarda sentez edilmesinin anlamlı olarak oksidatif strese direnç kazandırarak yaşlanma sürecini yavaşlatmakta ve yaşam süresini uzatmakta olduğunu göstermektedir. Örneğin SH-SY5Y hücrelerinde endoplazmik retikulum stresinin düzenlenmesinde bir bitki antioksidan olan ligustilitin nöroprotektif etkisinde önemli rol oynadığını göstermiştir (Kuang ve ark.2014). Başka bir çalışmada Klotho, glutamata maruz kalan PC12 hücrelerinde ve epilepsi hastalarından gelen hipokampal örneklerde aşağı doğru regüle edilmiştir (Teocchi ve ark.2013). Klotho'nun, beyin kaynaklı hücrelerde in vitro olarak indüklenen oksidatif stresi önleyip önleyemeyeceğini belirlemek için, sıçan birincil hipokampal nöronlarında oksidatif hasarla nöronal ölüm için bir model olarak glutamat sitotoksitesisi kullanılmıştır. Glutamat, endojen bir uyarıcı nörotransmitterdir, yüksek konsantrasyonlarda nörotoksiktir (Coyle ve Puttfarcken,1993). Glutamat tedavisini takiben hipokampal nöronlarda hücre içi ROS birikimi olmaktadır (Das ve ark. 2010).

Yapılan bir çalışmada hipokampal nöronların artan glutamat konsantrasyonlarına maruz kalmasının ROS birikiminde artışa yol açtığını, Klotho ile ön tedavinin ROS üretimini önemli ölçüde azalttığını göstermektedir. 4-6 saat boyunca Klotho ile yapılan ön muamele, glutamatın neden olduğu hücre ölümü derecesini önemli ölçüde azalttığını

göstermiştir (3 ve 4 mM glutatata maruz kaldığında sitotoksisite derecesini % 65'den% 40'a ve % 80'den % 60'a düşürmüştür). Ancak glutamattan önce veya 1 saat ile aynı anda eklendiğinde, Klotho hipokampal nöronları glutamatın neden olduğu sitotoksisiteden korumamıştır. Hipokampal nöronlarda elde edilenlere benzer sonuçlar, ölümsüzleştirilmiş murin hipokampal hücre hattında, HT22'de de gözlemlenmiştir (Zeldich ve ark. 2014).

Zeldich ve arkadaşlarının daha sonra 24 saat boyunca Klotho ile muamele edilen sıçan primer hipokampal nöronlardan izole edilen RNA'yı incelenmiştir. Farklı olan genler için Klotho'nun saf (stressiz) koşullar altında Prx-2 ve Trxrd-1'in indüksiyonu üzerindeki arttırıcı etkisi qRT-PCR analizi ile doğrulanmıştır. Hipokampal nöronlarda Prx-2 ve Trxrd-1 indüksiyonunun, glutamat (sırasıyla 2.56- ve 1.77 kat) mevcudiyeti ile hafifçe artmasına karşın çarpıcı şekilde artmadığını, oysaki Klotho ön muamelesi ve glutata maruz kalma kombinasyonunun Prx-2 (4.29 kat )ve Trxrd-1 (3.58 kat ) ifadesinde daha yüksek bir artış ile sonuçlandığı bulunmuştur. Klotho'nun Prx-2 ve Trxrd-1 üzerindeki arttırıcı etkisi, başka deneylerde HT22 hücrelerinde de doğrulanmıştır. Protein düzeyinde, Prx-2'de, sadece Klotho'nun (oksidatif olmayan koşullar altında) varlığı ile indüklenen önemli bir artış bulunmuştur. Hücrelerin tek başına glutamat ile işlenmesi ayrıca Prx-2 proteininin ekspresyonunun artmasına yol açmıştır. Klotho ile ön muamele daha da arttırmıştır. Trxrd-1 proteini esas olarak düşük glutamat konsantrasyonlarında (3mM) oksidatif koşulların varlığında indüklenmiştir. Trxrd-1 protein ekspresyonunun glutamat tarafından bu uyarılması, Klotho ile ön muamele ile önemli ölçüde arttırılmıştır. Bu sonuçlar qRT-PCR sonuçları ile aynı doğrultudadır ve hipokampal nöronlardaki Klotho'nun Trx / Prx ailesi üyeleri üzerindeki düzenleyici etkisini onaylamaktadır (Zeldich ve ark. 2014).

Çalışmamızda Hipokampal nöronal HT22 hücrelerini, endosülfana maruz bırakarak Klotho'nun NHEJ yolağındaki etkisini araştırmak için kullandık. Kontrolle karşılaştırıldığında, özellikle sadece endosülfan uygulanan HT22 hücrelerinde Klotho geninin aşırı ekspresyona uğradığını ve hücresele Klotho seviyesinde önemli artışa neden olduğunu gözlemledik. (Şekil 4.3 ve 4.8 ). Bu durum Klotho'nun, endosülfanın negatif etkisine (muhtemelen hücresele ROS artışına) etkisine karşı hücresele cevapta rol oynayabileceğini düşündürmektedir. sKlotho'nun eksojen olarak verildiği diğer deney

ortamlarında hücresele Klotho seviyelerinde ve Klotho gen ekspresyon seviyelerindeki artış, sadece Endosülfan uygulanan hücrelere nazaran sınırlı kalmıştır. Bu etki hem mRNA hem de protein seviyelerinde doğrulanmıştır (Şekil 4.3 ve 4.8 ).

NHEJ yolağında bulunan Ku'nun benzersiz fiziksel özellikleri, DNA uçlarına kalıcı ve sıkı bir şekilde bağlanmasını sağlamaya yardımcı olmaktadır. Yapılan bir çalışmada hücre hatlarından biri olan Jurkat hücrelerinde Ku70 yüksek oranda eksprese edildiğinden shRNA ile Ku70 ifadesi düşürülerek, apoptoz ve hücre döngüsü ile ilişkisi araştırılmıştır. DNA hasarı onarım kapasitesi analiz edilerek ilginç bir şekilde hem NHEJ hem de HR onarım verimliliğinin Ku70 susturma işleminden sonra azaldığı bulunmuştur. Ku70'in susturulmasının, Jurkat hücrelerinde birikmiş DNA hasarı ve DSB bozukluğu ile sonuçlandığı, daha fazla apoptoz, hücre çoğalmasını ve hücre döngüsü durmasını azalttığı gözlemlenmiştir (Yu ve ark. 2018).

Bizim çalışmamızda, kontrolle karşılaştırıldığında sadece endosülfan uygulanan HT22 hücrelerinde, Ku70 ve Ku80'nin artan ekspresyonu NHEJ yolağının tetiklenmiş olduğunu göstermektedir. 4 saat boyunca Klotho ile yapılan ön muamele (K16) ile klotho ve endosülfanın eş zamanlı uygulanan (K12) HT22 hücrelerinde, Klotho'nun endosülfandan önce veya aynı anda eklenmesi bir fark yaratmamakla birlikte ekspresyon hızları farklı olmuştur. Ancak K16 uygulanan HT22 hücrelerinde Ku80 geninin ekspresyonu baskılanmıştır.

Yapılan çalışmalar Ku70'in fosforile olduğunu ve bu fosforilasyonun, Ku heterodimerinin DNA'dan S fazında yer değiştirmesine yol açtığını göstermiştir. Lee ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışma ilk kez Ku'nun yüksek DNA ucu bağlanma afinitesinin fosforilasyon ile değiştirilebileceğini göstermektedir. Ku70'in fosforilasyonunun ortadan kaldırılması, Ku'nun DSB'lerde sürekli tutulmasına yol açar, bu da DNA ucu rezeksiyonu ve HR'de, özellikle S fazında önemli bir düşüşe yol açmaktadır. Sonuçlar, Ku70 / 80'in DSB'lerden fosforilasyon aracılı ayrışmasının DNA uçlarını serbest bıraktığını, S fazında HR'nin başlamasına izin verdiğini ve memeli hücrelerinde bir DSB onarım yolu seçimi mekanizması sağladığını göstermektedir (Lee ve ark. 2016).

Çalışmamızda westen blot sonucuna göre pKu ekspresyonu kontrolle karşılaştırıldığında tüm grublarda artan ekspresyonu NHEJ yolağının tetiklenmiş olduğunu göstermektedir. 4 saat boyunca Klotho ile yapılan ön muamele (K16) ile Klotho ve endosülfanın eş zamanlı uygulanan (K12) HT22 hücrelerinde, Klotho'nun endosülfandan önce veya aynı anda eklenmesi bir fark yaratmamakla birlikte ekspresyon hızları farklı olmuştur.

Yapılan son bir çalışmada bir başka kinaz olan p38 MAPK, çeşitli DNA hasar ajanları ve DSB'nin kendisi tarafından indüklenmektedir. DNA-PK ve p38 MAPK kombine olarak, Alzheimer sisteminin bir aşamasını belirleyebilmektedir. Normal yaşlanma esnasında, DNA-PK komponentleri azaltıldığından onarılmamış DSB'ler, sürekli p38 MAPK aktivasyonunu başlatmak için yeterli olmayan bir düzeyde oluşabilmektedir. Aksine, Alzheimer vakalarında, DSB'lerin eşik seviyesi, p38 MAPK aktivasyonunu indükleyerek A $\beta$  üretimini arttırabilmektedir (Kanungo, 2017).

Kontrolle karşılaştırıldığında endosülfan uygulanan HT22 hücrelerinde, DNA-PK'nın ekspresyonu NHEJ yolağının tetiklenmiş olduğunu göstermektedir. 4 saat boyunca Klotho ile yapılan ön muamele (K16) ile Klotho ve endosülfanın eş zamanlı uygulanan (K12) HT22 hücrelerinde, Klotho'nun endosülfandan önce veya aynı anda eklenmesi bir fark yaratmamakla birlikte ekspresyon hızları farklı olmuştur.

En iyi karakterize edilen DNA-PKcs fosforilasyon kümesi, Thr2609 diğer DNA tamir molekülleri ile ilişkisini kolaylaştırmaktadır. Çünkü fosforlanmış DNAPKcs, Artemis'i DNA uçlarına alıp endonükleaz aktivitesini kolaylaştırmaktadır (Goodarzi ve ark. 2006). Yapılan çalışmalarda, işlevsel bir Thr2605 kümesi (insan Thr2609) bulunmayan DNA-PKcs3A nakavt mutant farelerde erken ölümcül ve doğuştan kemik iliği yetmezliği görülmektedir. DNA-PKcs3A farelerinden türetilen hücreler, replikasyon stres maddelerine karşı oldukça hassastır ve birçok onarım yolunda bozulma göstermektedir. Bu bulgular, fizyolojik koşullar altında in vivo Thr2609 küme fosforilasyonunun kritik fonksiyonunu ve gereksinimini göstermiştir (Zhang ve ark. 2011).



Bizim çalışmamızda da DNA-PKcs fosforilasyon kümesi Thr2609 western blot yöntemi ile analiz edilmiştir. Kontrolle karşılaştırıldığında uygulama yapılan tüm grublarda, pDNA-PK'nın ekspresyonu NHEJ yolağının tetiklemiş olduğunu göstermektedir.

Çalışmamızda Hipokampal nöronal HT22 hücrelerini, endosülfana maruz bırakarak Klotho'nun NHEJ yolağındaki etkisini araştırmak için kullandık. Sonuçlarımız, kontrolle karşılaştırıldığında özellikle sadece endosülfan uygulanan HT22 hücrelerinde Klotho geninin aşırı ekspresyona uğradığını ve endosülfanın negatif etkisini modüle ederek hipocampal nöronal HT22 hücrelerini oksidatif hasara karşı önemli ölçüde koruduğunu göstermektedir. Verilerimiz beyindeki NHEJ yolağının önemini vurgulamakta ve Klotho'yu olası bir antioksidan efektör olarak tanımlamaktadır. sKlotho'nun eksojen olarak verildiği diğer deney ortamlarında hücresele Klotho seviyelerinde ve Klotho gen ekspresyon seviyelerindeki artış, sadece Endosulfan uygulanan hücrelere nazaran sınırlı kalmıştır. Bu etki hem mRNA hem de protein seviyelerinde doğrulanmıştır. Klotho'nun, HT22 hücrelerine eksojen olarak eklenmesinin nöronal sağkalımı desteklediğini ve Endosulfan'ın olumsuz etkisini azalttığını söyleyebiliriz. Bu sonuç, dolaşımdaki sKlotho seviyesinin Endosulfan'ın olumsuz etkilerine karşı canlıları koruyabildiğini düşündürmektedir.

$\alpha$ Klotho'nun beyindeki sinyal iletim yolları ile etkileşimi hakkında nispeten az veri vardır ve  $\alpha$ Klotho'nun transkripsiyon faktörlerinin sentez / aktivite seviyelerini nasıl değiştirdiği hakkında çok az şey bilinmektedir.  $\alpha$ Klotho ile ilgili in vitro ve hayvanlar üzerindeki doku kültürleri ile bağlantılı daha fazla çalışma gerekmektedir. Klotho ifadesinin azalması ve yaşa bağlı koşulların gittikçe artan bir listesi arasındaki bağlantıların ışığında, bu proteinin çalışmasının beyinde ve ötesinde insan yaşlanmasını anlamak için büyük ölçüde etkili olacağı açıktır. Ayrıca  $\alpha$ Klotho eksikliği ile bağlantılı diğer patolojik durumlarda, Klotho gen ekspresyonunun uyarıcıları ile tedavi muhtemelen faydalı olacaktır.

## 6.KAYNAKLAR

- Abraham RT. 2004. PI 3-kinase related kinases: 'big' players in stress-induced signaling pathways. *DNA Repair (Amst)* ;3:883–887.
- Adeli, S., Zahmatkesh, M., Tavoosidana, G., Karimian, M., Hassanzadeh, G., 2016. Simvastatin enhances the hippocampal klotho in a rat model of streptozotocin of streptozotocin-induced cognitive decline. *Progress Neuro-Psychopharmacol Biol. Psychiatry* 72, 87–94.
- Alberts B, Bray D, Hopkin K, et al. 2004 *Manipulating genes and cells, Essential cell biology*. GS Garland Science, Taylor & Francis Group, New York, ; 323-327.
- Ali U, Syed JH, Malik RN, Katsoyiannis A, Li J, Zhang G and Jones KC 2014 Organochlorine pesticides (OCPs) in South Asian region: a review. *Sci. Total Environ.* 476–477 705–717
- Ames BN, Shigenaga M and Hagen TM. 1993. Oxidants, antioxidants and the degenerative diseases of aging. *Proc Natl Acad Sci USA* ; 90:7915–7922.
- Anna, M. Sanchez, A. Gimenez-Llort, L. Lizcano, J.M. Cañete, M. Garcia, B. Torres-Lista, V. Puig, M. Bosch, A. Chillón, M. 2015. *PLoS One.* 24;10(11)
- Aperia, A., Akkuratov, E. E., Fontana, J. M., and Brismar, H. (2016) Na,KATPase, a new class of plasma membrane receptors, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 310, 491495.
- Artandi SE, Blau HM, de Haan G, Geiger H, Goodell MA, Jones L, Levine RL, Muñoz-Canoves P, Rodewald HR, Wagers A, et al. 2015. Stem cells and aging: what's next? *Cell Stem Cell.* ;16(6):578–81.
- Armanios M, Alder JK, Parry EM, Karim B, Strong MA, Greider CW. 2009. Short telomeres are sufficient to cause the degenerative defects associated with aging. *Am J Hum Genet.* 2009; 85:823–832. [PubMed: 19944403]

- Arı N, Işık AC, Karasu Ç.2008. Yaşlanma ve ileri glikozillenme son ürünleri. Türkiye Klinikleri J Cosm Dermatol-Special Topics. 2008; 1(2): 9-15.
- Asai O, Nakatani K, Tanaka T, et al.2012. Decreased renal  $\alpha$ -Klotho expression in early diabetic nephropathy in humans and mice and its possible role in urinary calcium excretion. *Kidney Int.* 2012;81:539–547.
- Atlante A, Calissano P, Bobba A, et al.2001. Glutamate neurotoxicity, oxidative stress and mitochondria. *FEBS Lett.* 2001;497(1):1–5.
- Aydemir EH. 2013. Deri yaşlanması. *Ok Meydanı Tıp Dergisi.* 2, 89-93.
- Baker DJ, Wijshake T, Tchkonja T, LeBrasseur NK, Childs BG, van de Sluis B, Kirkland JL, van Deursen JM. 2011. Clearance of p16Ink4a-positive senescent cells delays ageing-associated disorders. *Nature.* 2011; 479:232–236. [PubMed: 22048312]
- Bakkenist CJ, Kastan MB. 2004. Initiating cellular stress responses. *Cell.* 2004;118:9–17.
- Balajee AS, Bohr VA.2000 Genomic heterogeneity of nucleotide excision repair. *Gene* 2000; 250: 15-30.
- Başaran E, Aras S,2010. General Outlook and Applications of Genomics, Proteomics and Metabolomics, *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi.* Hayvansal Üretim 2010; 672: 85-96.
- Beğen T., Yavuzer H. 2012. Yaşlılık ve Yaşlılık Epidemiyolojisi İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Geriatri Bilim Dalı
- Bishop, N. A., Guarente, L.2007. Genetic Links Between Diet And Lifespan: Shared Mechanism From Yeast to Humans, *Nature*, 8 (2007); 835-844
- Block WD, Yu Y, Merkle D, Gifford JL, Ding Q, Meek K, Lees-Miller SP. 2004. Autophosphorylation-dependent remodeling of the DNA-dependent protein kinase catalytic subunit regulates ligation of DNA ends. *Nucleic Acids Res.* 2004; 32:4351–7.

- Bloch L, Sineshchekova O, Reichenbach D, Reiss K, Saftig P, Kuro-o M, Kaether C.2009. Klotho is a substrate for alpha-, beta- and gamma-secretase. *FEBS Lett* 2009;583:3221-4.
- Britton S, Coates J, Jackson SP.2013. A new method for high-resolution imaging of Ku foci to decipher mechanisms of DNA double-strand break repair. *J Cell Biol.* 2013;202:579–595.
- Bilir.N.,Paksoy,N.(2007). Temel Geriatri,Kutsal,GY.,Aslan,D., (Edt.).Değişen Dünyada ve Türkiye’de Yaşlılık Kavramı,s.3-9.Güneş Tıp Kitabevleri Ankara
- Bothmer A, Robbiani DF, Di Virgilio M, Bunting SF, Klein IA, Feldhahn N, Barlow J, Chen HT, Bosque D, Callen E, et al.2011. Regulation of DNA end joining, resection, and immunoglobulin class switch recombination by 53BP1. *Mol Cell.* 2011;42:319–329.
- Boonekamp JJ, Simons MJ, Hemerik L, Verhulst S. 2013.Telomere length behaves as biomarker of somatic redundancy rather than biological age. *Aging Cell.* 2013; 12:330–332. [PubMed: 23346961]
- Bryant, M. R., Marta, C. B., Kim, F. S., and Bansal, R. (2009) Phosphorylation and lipid raft association of fibroblast growth factor receptor2 in oligodendrocytes, *Glia*, 57, 935946.
- Brobey, R. K., German, D., Sonsalla, P. K., Gurnani, P., Pastor, J., Hsieh, CC., Papaconstantinou, J., Foster, P. P., Kuroo, M., and Rosenblatt, K. V. (2015) Klotho protects dopaminergic neuron oxidantinduced degeneration by modulating ASK1 and p38 MAPK signaling pathways, *PLoS One*, 10, e0139914.
- Brossaud J, Roumes H, Moisan MP, et al. 2013.Retinoids and glucocorticoids target common genes in hippocampal HT22 cells. *J Neurochem.* in press. 2013 125 (4): 518-31. doi: 10.1111 / jnc.12192.
- Bunting SF, Callen E, Wong N, Chen HT, Polato F, Gunn A, Bothmer A, Feldhahn N, Fernandez-Capetillo O, Cao L, et al.2010. 53BP1 inhibits homologous

recombination in Brca1-deficient cells by blocking resection of DNA breaks. *Cell*. 2010;141:243–254

Burçak, G., Andican, G. 2004.Oksidatif DNA Hasarı ve Yaşlanma, *Cerrahpaşa Tıp Dergisi*, 35 (2004); 159-169.

Burnette, W. N. 1981. "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Analytical Biochemistry*, 112: 195-203.

Bustin SA, Benes V, Nolan T.2005. Quantitative Real-Time RT-PCR. *J Mol Endocrinol* 2005; 34:597-601.

Callen E, Di Virgilio M, Kruhlak MJ, Nieto-Soler M, Wong N, Chen HT, Faryabi RB, Polato F, Santos M, Starnes LM, et al.2013. 53BP1 mediates productive and mutagenic DNA repair through distinct phosphoprotein interactions. *Cell*. 2013;153:1266–1280

Calsou P, Frit P, Humbert O, Muller C, Chen DJ, Salles B. 1999.The DNA-dependent protein kinase catalytic activity regulates DNA end processing by means of Ku entry into DNA. *J Biol Chem*. 1999;274:7848–7856

Campisi J, Andersen JK, Kapahi P, Melov S. 2011.Cellular senescence: a link between cancer and age-related degenerative disease? *Semin Cancer Biol*. 2011;21(6):354–359.

Cararo-Lopes M.M, Caio Mazucanti C.H.Y. Scavonea C., Kawamoto E.M. Berwickc D.C. ,2017.The relevance of -KLOTHO to the central nervous system: Some key questions *Ageing Research Reviews* 36 (2017) 137–148

Chang, H. C., and Guarente, L. (2014). SIRT1 and other sirtuins in metabolism. *Trends Endocrinol. Metab.* 25, 138–145. doi: 10.1016/j.tem.2013.12.001

Chen BP, Chan DW, Kobayashi J, Burma S, Asaithamby A, Morotomi-Yano K, Botvinick E, Qin J, Chen DJ.2005. Cell cycle dependence of DNA-dependent protein

kinase phosphorylation in response to DNA double strand breaks. *J Biol Chem.* 2005;280:14709–14715.

Chen L, Huang S, Lee L, Davalos A, Schiestl RH, Campisi J, Oshima J. 2003. WRN, the protein deficient in Werner syndrome, plays a critical structural role in optimizing DNA repair. *Aging Cell* 2003, 2: 191–199.

Chen BP, Uematsu N, Kobayashi J, et al. 2007. Ataxia telangiectasia mutated (ATM) is essential for DNA-PKcs phosphorylations at the Thr-2609 cluster upon DNA double strand break. *J Biol Chem.* 2007;282:6582–7.

Chen CD, Podvin S, Gillespie E, Leeman SE, Abraham CR. 2007. Insulin stimulates the cleavage and release of the extracellular domain of Klotho by ADAM10 and ADAM17. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:19796-801.

Chen, C. D., Sloane, J. A., Li, H., Aytan, N., Giannaris, E. L., Zeldich, E., Hinman, J. D., Dedeoglu, A., Rosene, D. L., Bansal, R., Luebke, J. I., Kuroo, M., and Abraham, C. R. (2013) The antiaging protein Klotho enhances oligodendrocyte maturation and myelination of the CNS, *J. Neurosci.*, 33, 19271939.

Chen T, Tan J, Wan Z, et al. Effects of Commonly Used Pesticides in China on the Mitochondria and Ubiquitin-Proteasome System in Parkinson's Disease. *Int J Mol Sci.* 2017;18(12):2507. Published 2017 Nov 23. doi:10.3390/ijms18122507

Chitnis, M.M. Lodhia, K.A. Aleksic T, Gao S, Protheroe AS, Macaulay V.M., 2014. IGF-1R inhibition enhances radiosensitivity and delays double strand break repair by both non-homologous end-joining and homologous recombination. *Oncogene.* Nov 6;33(45):5262-73

Ciccia, A, Elledge SJ. 2010. The DNA damage response: making it safe to play with knives. *Mol Cell.*

Clement AB, Gimpl G, Behl C. 2010. Oxidative stress resistance in hippocampal cells is associated with altered membrane fluidity and enhanced nonamyloidogenic cleavage of endogenous amyloid precursor protein. *Free Radic Biol Med.* 2010;48(9):1236–1241.

- Clinton, S.M. Glover, M.E. Maltare, A. Laszczyk A.M. Mehi, S,J, Simmons, R.K, et al. 2013. Expression of klotho mRNA and protein in rat brain parenchyma from early postnatal development into adulthood. *Brain Res.*; 1527:1–14.
- Coyle, J. T., and Puttfarcken, P. (1993) Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders. *Science* 262, 689–695
- Cui X, Yu Y, Gupta S, Cho YM, Lees-Miller SP, Meek K.2005. Autophosphorylation of DNA-dependent protein kinase regulates DNA end processing and may also alter double-strand break repair pathway choice. *Mol Cell Biol.* 2005;25:10842–10852.0;40(2):179-204.
- Çağlayan, E. ve Turan K. 2014. *Klotho* Geni, Yaşlanma ve DNA Metilasyonu. *MUSBED* 2014;4(3):182-192 DOI: 10.5455/musbed.20140826121007
- Çiçek C, Bilgiç A. 2006.Klinik viroloji laboratuvarında uzmanlık öğrencisine verilen hücre kültürü eğitim programı. *İnfeksiyon Dergisi* 2006; 20 (3): 231-241.
- Das, A., McDowell, M., O'Dell, C. M., Busch, M. E., Smith, J. A., Ray, S. K., and Banik, N. L. (2010) Post-treatment with voltage-gated N channel blocker attenuates kainic acid-induced apoptosis in rat primary hippocampal neurons. *Neurochem. Res.* 35, 2175–2183
- Davis, A and . Chen ,D.2013. DNA double strand break repair via non-homologous end-joining. *ransl Cancer Res.* 2013 June ; 2(3): 130–143. doi:10.3978/j.issn.2218-676X.2013.04.02.
- Davis JB, Maher P.1994. Protein kinase C activation inhibits glutamate-induced cytotoxicity in a neuronal cell line. *Brain Res.* 1994;652(1):169–173.
- Derici, E., 2007,Rho kinaz ve siklooksijenaz inhibitörleri ile siklofosamid kombinasyonlarının çeşitli tümör hücre serilerine etkileri, Doktora tezi,*Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü*, Mersin.
- Difilippantonio MJ, Zhu J, Chen HT, Meffre E, Nussenzweig MC, Max EE, et al. 2000. DNA repair protein Ku80 suppresses chromosomal aberrations and malignant transformation. *Nature.* 2000;404:510–514.

- Dobbs TA, Tainer JA, Lees-Miller SP. 2010. A structural model for regulation of NHEJ by DNAPKcs autophosphorylation. *DNA Repair (Amst)*. 2010; 9:1307–14.
- Donovan L, Welford SM, Haaga J, et al. 2010. Hypoxia--implications for pharmaceutical developments. *Sleep Breath*. 2010;14(4):291–298.
- Dönmez, G., (2010). Yaşlılarda Yaşam Kalitesini Etkileyen Faktörler, Abant İzzet Baysal Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yayınlanmamış Yüksek Lisans Tezi, Bolu
- Drouet J, Frit P, Delteil C, de Villartay JP, Salles B, Calsou P (2006) Interplay between Ku, artemis, and the DNA-dependent protein kinase catalytic subunit at DNA ends. *J Biol Chem* 281: 27784–27793.
- Downs JA, Jackson SP. 2004. A means to a DNA end: the many roles of Ku. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2004;5:367–378.
- Doi S, Zou Y, Togao O, Pastor JV, John GB, Wang L, et al. 2011. Klotho inhibits transforming growth factor-beta1 (TGF-beta1) signaling and suppresses renal fibrosis and cancer metastasis in mice. *J Biol Chem* (2011) 286:8655–65. doi:10.1074/jbc.M110.174037
- Dubal, D.B. Yokoyama, J.S, Zhu, L. Broestl, L. Worden, K. Wang D, et al. 2014. Life extension factor klotho enhances cognition. *Cell Rep.* ; 7(4):1065–76.
- Egan DF, Shackelford DB, Mihaylova MM, Gelino S, Kohnz RA, et al. (2011) Phosphorylation of ULK1 (hATG1) by AMP-activated protein kinase connects energy sensing to mitophagy. *Science* 331: 456–461. doi: 10.1126/science.1196371 PMID: 21205641
- Fan J, Sun Z. 2016. The antiaging gene Klotho regulates proliferation and differentiation of adipose-derived stem cells. *Stem Cells*. 2016;34(6):1615–25.
- Finkel, T., Deng, C. X., Mostoslavsky, R. 2009. Recent progress in the biology and physiology of sirtuins. *Nature*, 460: 587-591.



- Ford, E., Voit, R., Liszt, G., Magin, C., Grummt, I., and Guarente, L. (2006). Mammalian Sir2 homolog SIRT7 is an activator of RNA polymerase I transcription. *Genes Dev.* 20, 1075–1080. doi: 10.1101/gad.1399706
- Furuta T, Redon C, Pilch D, Sedelnikova O, Kohlhagen G, Kirchgessner CU, et al. (2002) ATR- and DNA-PK- dependent phosphorylation of histone H2AX by replication-mediated DNA double-strand break induced by camptothecin. *Gastroenterology* 122: S918
- Fancy, S. P., Baranzini, S. E., Zhao, C., Yuk, D. I., Irvine, K. A., Kaing, S., Sanai, N., Franklin, R. J., and Rowitch, D. H. (2009) Dysregulation of the Wnt pathway inhibits timely myelination and remyelination in the mammalian CNS, *Genes Dev.*, 23, 1571-1585.
- Ferguson DO, Alt FW. 2001. DNA double strand break repair and chromosomal translocation: lessons from animal models. *Oncogene.* 20:5572–5579.
- Geller AM, Zenick H. 2005. Aging and the environment: a research framework. *Environ Health Perspect.* 2005;113(9):1257–62.
- German, D. C., Khobahy, I., Pastor, J., Kuroo, M., and Liu, X. (2012) Nuclear localization of Klotho in brain: an antiaging protein, *Neurobiol. Aging*, 33, 1483.e251483.e30
- Gilca M, Stoian I, Atanasiu V, Virgolici B. 2007. The oxidative hypothesis of senescence. *J Postgrad Med* 2007; 53:207-213.
- Goodarzi AA, Yu Y, Riballo E, Douglas P, Walker SA, Ye R, Harer C, Marchetti C, Morrice N, Jeggo PA, Lees-Miller SP. 2006. DNA-PK autophosphorylation facilitates Artemis endonuclease activity. *EMBO J.* 2006;25:3880–3889
- Gregg SQ, Gutierrez V, Robinson AR, Woodell T, Nakao A, Ross MA, Michalopoulos GK, Rigatti L, Rothermel CE, Kamileri I, et al. 2012. A mouse model of accelerated liver aging caused by a defect in DNA repair. *Hepatology.* 2012; 55:609–621. [PubMed: 21953681]
- Greer EL, Brunet A. 2008. Signaling networks in aging. *J Cell Sci.* 2008;121(Pt 4): 407–12.

- Guarente L.2011. Sirtuins, aging, and metabolism. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 2011; 76:81–90.
- Gems D, Partridge L.2013. Genetics of longevity in model organisms: debates and paradigm shifts. *Annu Rev Physiol.* 2013;75:6216–44.
- Goetz R, Nakada Y, Hu MC, et al.2010. Isolated C-terminal tail of FGF23 alleviates hypophosphatemia by inhibiting FGF23-FGFR-Klotho complex formation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2010;107:407–412.
- Günel T. 2007.Quatitative Analysis of Gene Expression “Real-Time PCR”. *Türkiye Klinikleri J Med Sci*, 2007; 27.
- Hammel M, Yu Y, Mahaney BL, Cai B, Ye R, Phipps BM, Rambo RP, Hura GL, Pelikan M, So S, Abolfath RM, Chen DJ, Lees-Miller SP, Tainer JA.2010. Ku and DNA-dependent protein kinase dynamic conformations and assembly regulate DNA binding and the initial nonhomologous end joining complex. *J Biol Chem.* 2010b; 285:1414–23.
- Harlow, E., Lane, D. 1988. In:Antibodies Cold Spring Harbor Laboratory Press, 471-504, New York.
- Harris R, Esposito D, Sankar A, Maman JD, Hinks JA, Pearl LH, Driscoll PC (2004) The 3D solution structure of the C-terminal region of Ku86 (Ku86CTR). *J Mol Biol* 335: 573–582.
- Hartley K, Gell D, Smith G, Zhang H, Divecha N, Connelly M, Admon A, Lees-Miller S, Anderson C, Jackson S.1995. DNA-dependent protein kinase catalytic subunit: a relative of phosphatidylinositol 3-kinase and the ataxia telangiectasia gene product. *Cell.* 1995;82:849–85
- Haigis, M. C., Guarente, L. P. 2009. Mammalian sirtuins-emerging roles in physiology, aging, and calorie restriction. *Genes & Development*, 20: 2913-2921.
- Hardie DG, Ross FA, Hawley SA. 2012.AMPK: Enerji homeostazını tutan besin ve enerji sensörü. *Nat. Rev. Mol. Celi Biol.* 2012; 13 : 251-262. doi: 10.1038 / nrm3311

- Harper JW, Elledge SJ. 2007. The DNA damage response: ten years after. *Mol Cell*. 2007;28:739–745.
- He M, Liu J, Cheng S, Xing Y, Suo WZ. 2013. Differentiation renders susceptibility to excitotoxicity in HT22 neurons. *Neural Regen Res*. 2013;8(14):1297–1306. doi:10.3969/j.issn.1673-5374.2013.14.006
- Hoeijmakers JH. 2009. DNA damage, aging, and cancer. *N Engl J Med*. 2009; 361:1475–1485.
- Horio, Y., Hayashi, T., Kuno, A., Kunimoto, R. 2011. Cellular and molecular effects of sirtuins in health and disease. *Clinical Science*, 121: 191-203.
- Hoffmann R. 2008. A wiki for the life sciences where authorship matters. *Nat Genet*. 2008;40(9):1047–51.
- Hughes KA, Reynolds RM. 2005. Evolutionary and mechanistic theories of aging. *Annu Rev Entomol*. 2005;50:421–445.
- Imura A, Iwano A, Tohyama O, Tsuji Y, Nozaki K, Hashimoto N, Fujimori T, Nabeshima Y. 2004. Secreted Klotho protein in sera and CSF: implication for post-translational cleavage in release of Klotho protein from cell membrane. *FEBS Lett* 2004;565:143-7.
- Imura, A., Tsuji, Y., Murata, M., Maeda, R., Kubota, K., Iwano, A., Obuse, C., Togashi, K., Tominaga, M., and Kita, N. (2007)  $\alpha$ Klotho as a regulator of calcium homeostasis, *Science*, 316, 1615-1618.
- Ikushima, M., Rakugi, H., Ishikawa, K., Maekawa, Y., Yamamoto, K., Ohta, J., Chihara, Y., Kida, I., and Ogihara, T. (2006) Antiapoptotic and antisenesence effects of Klotho on vascular endothelial cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 339, 827-832. 61.
- Ichikawa S, Imel EA, Kreiter ML, et al. 2007. A homozygous missense mutation in human KLOTHO causes severe tumoral calcinosis. *J Clin Invest*. 2007;117:2684–2691.

- Iyama T, Wilson DM.2013. DNA repair mechanisms in dividing and non-dividing cells. *DNA Repair*. 2013;12(8):620-36
- James M. Daley, Patrick Sung : 2014.53BP1, BRCA1, and the Choice between Recombination and End Joining at DNA Double-Strand Breaks Society for Microbiology. doi:10.1128/MCB.01639-13
- Jaskelioff M, Muller FL, Paik JH, Thomas E, Jiang S, Adams AC, Sahin E, Kost-Alimova M, Protopopov A, Cadinanos J, et al. 2011.Telomerase reactivation reverses tissue degeneration in aged telomerase-deficient mice. *Nature*. 2011; 469:102–106.
- Jeong GS, Li B, Lee DS, et al. 2010.Cytoprotective and anti-inflammatory effects of spinasterol via the induction of heme oxygenase-1 in murine hippocampal and microglial cell lines. *Int Immunopharmacol*. 2010;10(12):1587–1594.
- Jeppesen DK, Bohr VA,2011. Stevnsner T. DNA repair deficiency in neurodegeneration. *Progress in Neurobiology* 2011; 94: 166-200.
- Jia Z and Misra HP. 2007.Reactive oxygen species in in vitro pesticide-induced neuronal cell (SH-SY5Y) cytotoxicity: role of NFkappaB and caspase-3. *Free Radic. Biol. Med.*2007. 42 288–298
- Jung M, Ramankulov A, Roigas J.2007. In Search of Suitable Reference Genes for Gene Expression Studies of Human Renal Cell Carcinoma by Real-Time PCR, *BMC Mol Biol Jun*. 2007;8:8-47.
- Kaizaki A, Tanaka S, Ishige K, et al. 2006.The neuroprotective effect of heme oxygenase (HO) on oxidative stress in HO-1 siRNA-transfected HT22 cells. *Brain Res*. 2006;1108(1):39–44.
- Kanungo, J., 2016. DNA-PK Deficiency in Alzheimer's Disease *Neurol* .Sep;1(3):17-22.
- Kanungo, J., 2017. DNA-PK and P38 MAPK: A Kinase Collusion in Alzheimer's Disease? *Brain Disord Ther.* ; 6(2): . doi:10.4172/2168-975X.1000232.

- Karan, M.A., Tufan., F.2010. Yaşlanma Mekanizmaları, Ege Tıp Dergisi, 49 (2010); 11-17.
- Kahn BB, Alquier T, Carling D, Hardie DG.2005. AMP-activated protein kinase: ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism. *Celi Metab.* 2005; 1 : 15–25. doi: 10.1016 / j.c.2004.12.003
- Kenyon C (2005). The plasticity of aging: insights from long-lived mutants. *Cell*, 120: 449-460
- Kenyon, C., 2011. The first long-lived mutants: discovery of the insulin/IGF-1 pathway for ageing. *Philos. Trans R Soc Lond B Biol Sci* ; 366: 9-16
- Kirkwood TB.2005. Understanding the odd science of aging. *Cell.* 2005;120:437–447
- Kirkwood TB., (2008), A Systematic Look at an Old Problem.,*Nature.* Feb 7;451(7179):644–647.
- Koh N, Fujimori T, Nishiguchi S, et al.2001. Severely reduced production of klotho in human chronic renal failure kidney. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001;280:1015–1020.
- Kops, GJ, Dansen TB, Polderman PE, *et al.* 2002. Forkhead transcription factor FOXO3a protects quiescent cells from oxidative stress. *Nature* ; 419: 316-321.
- Krajisnik T, Olauson H, Mirza MA, Hellman P, Akerstrom G, Westin G, et al. 2010.Parathyroid klotho and FGF-receptor 1 expression decline with renal function in hyperparathyroid patients with chronic kidney disease and kidney transplant recipients. *Kidney Int* (2010) 78:1024–32. doi:10.1038/ki.2010.260
- Kuang, X., Chen, Y. S., Wang, L. F., Li, Y. J., Liu, K., Zhang, M. X., Li, L. J., Chen, C., He, Q., Wang, Y., and Du, J. R. (2014) Klotho upregulation contributes to the neuroprotection of ligustilide in an Alzheimer's disease mouse model. *Neurobiol. Aging* 35, 169–178
- Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonák J, Lind K, et al. 2006.The real-time polymerase chain reaction *Mol Aspects Med* 2006;27:95-125.

- Kuro-o M, Matsumura Y, Aizawa H, Kawaguchi H, Suga T, Utsugi T, Ohyama Y, Kurabayashi M, Kaname T, Kume E, Iwasaki H, Iida A, Shiraki-Iida T, Nishikawa S, Nagai R, et al. 1997. Mutation of the Mouse *klotho* gene leads to a syndrome resembling ageing. *Nature* 1997;390:45-51.
- Kuro-o M. Klotho and aging. *Biochim Biophys Acta*. 2009;1790(10):1049–58.
- Kurosu H, Yamamoto M, Clark JD, et al. 2005. Suppression of aging in mice by the hormone Klotho. *Science*. 2005;309:1829–1833
- Kutsal, G.Y., (2008). Yaşlılık Döneminde Sık Görülen Sağlık Sorunları. Yaşlılıkta Kaliteli Yaşam. Hacettepe Üniversitesi Geriatrik Bilimler Araştırma ve Uygulama Merkezi (GEBAM)-www.gebam.hacettepe.edu.tr. Ankara
- Kutsal, Y.G., Evigör, S., (2012). Klinisyen Gözüyle Yaşlılık Döneminde Sık Görülen Hastalıklar. Yaşlı Sağlığı: Sorunlar ve Çözümler. Halk Sağlığı Uzmanları Derneği. Türkiye Sağlık Raporu. s.505-512
- Kuroo, M. (2008) Klotho as a regulator of oxidative stress and senescence, *Biol. Chem.*, 389, 233241
- Lau A, Tymianski M. 2010. Glutamate receptors, neurotoxicity and neurodegeneration. *Pflugers Arch*. 2010;460(2):525–542.
- Lee K.Y, Saha J, Sun J, Fattah K, Wang S, Jakob B, Chi L, Wang S, Taucher-Scholz G, Davis A, and Chen D, 2016. Phosphorylation of Ku dictates DNA double-strand break (DSB) repair pathway choice in S phase 1732–1745 *Nucleic Acids Research*, 2016, Vol. 44, No. 4 doi: 10.1093/nar/gkv1499
- Lees-Miller SP, Long MC, Kilvert MA, Lam V, Rice SA, Spencer CA. 1996. Attenuation of DNA dependent protein kinase activity and its catalytic subunit by the herpes simplex virus type 1 transactivator ICP0. *J Virol*. 1996; 70:7471–7.
- Leon J, Moreno AJ, Garay BI, Chalkley RJ, Burlingame AL, Wang D, et al. 2017. Peripheral Elevation of a Klotho Fragment Enhances Brain Function and Resilience in Young, Aging, and  $\alpha$ -Synuclein Transgenic Mice. *Cell Rep*. 2017;20(6):1360-71.

- Li, C. B., Wang, B., Wang, Z., Guo, O., Tabuchi, K., Hammer, R. E., Sudhof, T. C., and Zheng, H. (2010) Soluble amyloid precursor protein (APP) regulates transthyretin and Klotho gene expression without rescuing the essential function of APP, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 107, 17362-17367.
- Lin Y, Sun Z. 2012. Antiaging gene Klotho enhances glucose-induced insulin secretion by up-regulating plasma membrane levels of TRPV2 in MIN6  $\beta$ -cells. *Endocrinology*.
- Lin Y, Sun Z. I. 2014. *In vivo* pancreatic  $\beta$  cell-specific expression of anti-aging gene Klotho, a novel approach for preserving  $\beta$  cells in type II diabetes. *Diabetes*. 2014. 012;153:3029–3039.
- Lim, K., Groen, A., Molostvov, G., Lu, T., Lilley, K.S., Snead, D., James, S., Wilkinson, I.B., Ting, S., Hsiao, L.-L., 2015. Klotho expression in human tissues. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 100, E1308–E1318.
- Lim, S.W., Jin, L., Luo, K., Jin, J., Shin, Y.J., Hong, S.Y. and Yang, C.W. 2017. Klotho enhances FoxO3-mediated manganese superoxide dismutase expression by negatively regulating PI3K/AKT pathway during tacrolimus-induced oxidative stress *Cell Death and Disease* 8, e2972; doi:10.1038/cddis.2017.365
- Li, S. A., Watanabe, M., Yamada, H., Nagai, A., Kinuta, M., and Takei, K. (2004) Immunohistochemical localization of Klotho protein in brain, kidney, and reproductive organs of mice, *Cell Struct. Funct.*, 29, 9199.
- Lee JE, Heo JI, Park SH, Kim JH, Kho YJ, Kang HJ, et al. 2011. Calorie restriction (CR) reduces age-dependent decline of non-homologous end joining (NHEJ) activity in rat tissues. *Exp Gerontol* 2011;46:891–6
- Li H, Vogel H, Holcomb VB, Gu Y, Hasty P. 2007. Deletion of Ku70, Ku80, or both causes early aging without substantially increased cancer. *Mol Cell Biol* 2007, 27: 8205–8214.
- Lieber MR. 2010. NHEJ and its backup pathways in chromosomal translocations. *Nat Struct Mol Biol.* 2010;17:393–395.

- Lin Y, Kuro-o M, Sun Z. 2013. Genetic deficiency of anti-aging gene *klotho* exacerbates early nephropathy in STZ-induced diabetes in male mice. *Endocrinology*. 2013;154:3855–3863.
- Li H, Martin A, David V, Quarles LD. 2011. Compound deletion of *Fgfr3* and *Fgfr4* partially rescues the Hyp mouse phenotype. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2011;300:E508–E517
- Li, Q., Vo, H. T., Wang, J., FoxQuick, S., Dobrunz, L. E., and King, G. D. (2017) *Klotho* regulates CA1 hippocampal synaptic plasticity, *Neuroscience*, 347, 123133
- Liu J, Rasul I, Sun Y, et al. 2009. GRK5 deficiency leads to reduced hippocampal acetylcholine level via impaired presynaptic M2/M4 autoreceptor desensitization. *J Biol Chem*. 2009;284(29):19564–19571.
- Lodish, H., Berk A, Kaiser CA, Krieger M, Scott MP, Bressler A, Ploegh H, Matsudaira P. 2011. *Moleküler Hücre Biyolojisi*. 709,710
- Logan J, Edwards K. *Real-Time PCR: Current Technology and Applications*. 2009.
- López-Otín C, Blasco M.A., Partridge L, Serrano M, and Kroemer G. 2013. The Hallmarks of Aging Cell. 2013 June 6; 153(6): 1194–1217. doi:10.1016/j.cell.2013.05.039.
- Mackenzie Ross, A.D., Cook, M. G., Chong, H., Hossain, M., Pandha, H. S., Bennett, D. C. 2012. Senescence evasion in melanoma progression: uncoupling of DNA-damage signaling from p53 activation and p21 expression. *Pigment Cell & Melanoma Research*, 26: 226-235.
- Madan, N., Xu, Y., Duan, Q., Banerjee, M., Larre, I., Pierre, S. V., and Xie, Z. (2017) Src-independent ERK signaling through the rat  $\alpha 3$  isoform of Na/KATPase, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 312, 222232.
- Marnett LJ, Plasteras JP. 2001. Endogenous DNA damage and mutation. *Trends Genet*. 2001;17:214–221.



- Marengoni A., Angleman S., Melis R., et al. (2011), Aging with Multimorbidity: A Systematic Review of the Literature, *Ageing Res Rev.*, Sep;10(4):430-439.
- Martin GM. 1997. Genetics and the pathobiology of ageing. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1997; 352:1773-1780.
- Mari PO, Florea BI, Persengiev SP, Verkaik NS, Bruggenwirth HT, Modesti M, Gigliamari G, Bezstarosti K, Demmers JA, Luider TM, Houtsmuller AB, van Gent DC. 2006. Dynamic assembly of end-joining complexes requires interaction between Ku70/80 and XRCC4. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103:18597–18602.
- Matsumura Y, Aizawa H, Shiraki-Iida T, Nagai R, Kuro-o M, Nabeshima Y. 1998. Identification of the human klotho gene and its two transcripts encoding membrane and secreted klotho protein. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;242:626-30.
- Masliah E, Mallory M, Hansen L. 1993. Quantitative synaptic alterations in the human neocortex during normal aging. *Neurology.* 43, 192-197.
- McGahon AJ, Martin SJ, Bissonnette RP, et al. Green DR:1995. The end of the (cell) line: methods for the study of apoptosis in vitro. In: Schwartz LM, Osborne BA (eds), *Methods in Cell Biology, Cell Death.* Academic Press. San Diego, 1995; 46: 150-181.
- Medvedev ZA. 1990. An attempt at a rational classification of theories of aging. *Biol Rev* 1990; 65:375–398.
- Meek K, Douglas P, Cui X, Ding Q, Lees-Miller SP. 2007. Trans Autophosphorylation at DNA-dependent protein kinase's two major autophosphorylation site clusters facilitates end processing but not end joining. *Mol Cell Biol.* 2007; 27:3881–90.
- Miyauchi, H. Minamino T, Tateno K, Kunieda T, Toko H, Komuro I., 2004. Akt negatively regulates the *in vitro* lifespan of human endothelial cells via a p53/p21-dependent pathway. *EMBO J* ; 23: 212-220.

- Michaud M, Balardy L, Moulis G, Gaudin C, Peyrot C, Vellas B, Cesari M, Nourhashemi F. 2013. Proinflammatory cytokines, aging, and age-related diseases. *J Am Med Dir Assoc.* 2013;14(12):877–82.
- Mijovic, Z., Kostov, M., Mihailovic, D., Zivkovic, N., Stojanovic, M., Zdravkovic, M. 2013. Correlation of nuclear morphometry of primary melanoma of the skin with clinicopathological parameters and expression of tumor suppressor proteins (p53 and p16) and bcl-2 oncoprotein. *Journal of BUON*, 18: 471-476.
- Mimori T, Hardin JA, Steitz JA. 1986. Characterization of the DNA-binding protein antigen Ku recognized by autoantibodies from patients with rheumatic disorders. *J Biol Chem.* 1986;261:2274–2278.
- Mirzaei H, Di Biase S, Longo VD. 2016. Dietary interventions, cardiovascular aging, and disease: animal models and human studies. *Circ Res.* 2016;118(10): 1612–25
- Mosman T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and cytotoxicity assays. *Journal of immunological Methods*, 1983; 65: 55-63.
- Mrema EJ, Rubino FM, Brambilla G, Moretto A, Tsatsakis AM and Colosio C. 2013. Persistent organochlorinated pesticides and mechanisms of their toxicity. 2013. *Toxicology* 307 74–88
- Murga M, Bunting S, Montana MF, Soria R, Mulero F, Canamero M, Lee Y, McKinnon PJ, Nussenzweig A, Fernandez-Capetillo O. A. 2009. mouse model of ATR-Seckel shows embryonic replicative stress and accelerated aging. *Nat Genet.* 2009; 41:891–898.
- Moskalev AA, Shaposhnikov MV, Plyusnina EN, Zhavoronkov A, Budovsky A, Yanai H, et al. 2013. The role of DNA damage and repair in aging through the prism of Koch-like criteria. *Ageing Res Rev.* 2013;12:661–684.
- Medici D, Razzaque MS, Deluca S, et al. 2008. FGF-23-Klotho signaling stimulates proliferation and prevents vitamin D-induced apoptosis. *J Cell Biol.* 2008;182:459–465.

- Nagai, T., Yamada, K., Kim, H. C., Noda, Y., Nabeshima, Y., and Nabeshima, T. (2003) Cognition impairment in the klotho gene mutant mice and oxidative stress, *Nihon Shinkei Seishin Yakurigaku Zasshi*, **23**, 211\_217.
- Navarro CL, Cau P, Levy N. 2005.Molecular bases of progeroid syndromes. *Hum Mol Genet.* 2006;15:R151–R161. Spec No 2.
- Nicolai S, Rossi A, Di Daniele N, Melino G, Annicchiarico-Petruzzelli M, Raschellà G. 2015.DNA repair and aging: the impact of the p53 family. *Aging (Albany NY)*. 2015;7(12):1050–1065. doi:10.18632/aging.100858
- Ohl F, Jung M, Radonić A, Sachs M, Urol J, Loening Sa, Jung K.2006. Identification and Validation of Suitable Endogenous Reference Genes for Gene Expression Studies of Human Bladder Cancer. *BMC Medical Genomics* 2006;175:1915-20.
- Okubo Y, Sekiya H, Namiki S, et al.2010. Imaging extrasynaptic glutamate dynamics in the brain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(14):6526–6531.
- Okutucu B, Pehlivan S. 2003.Revers Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RTPCR) ve Uygulama Alanları. *Arşiv* 2003; 12:138.
- Onat,Ü.,(2007). Temel Geriatri,Kutsal,GY.,Aslan,D.,(Edt.).Yaşlılara Yönelik Sosyal Hizmetler.s.173-178 Güneş Tıp Kitabevleri Ankara
- Orii, KE, Lee Y, Kondo N, McKinnon PJ. 2006.Selective utilization of nonhomologous end-joining and homologous recombination DNA repair pathways during nervous system development. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103, 10017-10022.
- Özçimen A. 2005.Steroid'in HL–60 (İnsan Akut Miyeloid Lösemi) hücre hattında, apoptoz ve farklılaşma üzerindeki etkisi. Doktora tezi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Programı, Ankara 2005.
- Öksüzokyar MM, Eryiğit SÇ, Öğüt DK, Erdoğan MB, Sökmen ÜN, Öğüt S.2016. Biyolojik yaşlanma nedenleri ve etkileri. *MAKÜ Sağ Bil Enst Derg.* 2016; 4(1): 34-41.

- Oliveira RM (2006) Klotho RNAi induces premature senescence of human cells via a p53/p21 dependent pathway. *FEBS Lett* 580(24):5753–5758 22.
- Pawelczak KS, Andrews BJ, Turchi JJ (2005) Differential activation of DNA-PK based on DNA strand orientation and sequence bias. *Nucleic Acids Res* 33: 152–161.
- Pawelczak KS, Turchi JJ (2008) A mechanism for DNA-PK activation requiring unique contributions from each strand of a DNA terminus and implications for microhomology-mediated nonhomologous DNA end joining. *Nucleic Acids Res* 36: 4022–4031. 10.1093/nar/gkn344
- Pérez-Revuelta B, Hettich M, Ciociaro A, Rotermund C, Kahle P, Krauss S, et al. Metformin lowers Ser-129 phosphorylated  $\alpha$ -synuclein levels via mTOR-dependent protein phosphatase 2A activation. *Cell death & disease*. 2014;5(5):e1209.
- Perry J, Kleckner N. The ATRs, ATMs, and TORs are giant HEAT repeat proteins. *Cell*. 2003;112:151–155.
- Pfaffl, M.W., (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR, *Nucleic Acids Res*, 29(9): 2002-2007
- Rodrigues MAP., Facchini LA., Thumé E., Maia F. (2009), Gender and Incidence of Functional Disability in the Elderly: A Systematic Review, *Cad. Saúde Pública*, Rio de Janeiro, 25 Sup 3:S464- S76.
- Rudolph KL, Chang S, Lee HW, Blasco M, Gottlieb GJ, Greider C, DePinho RA. 1996. Longevity, stress response, and cancer in aging telomerase-deficient mice. *Cell*. 1999; 96:701–712.
- Saiyed H, Dewan A, Bhatnagar V, Shenoy U, Shenoy R, Rajmohan H, Patel K, Kashyap R, et al. 2003. Effect of endosulfan on male reproductive development. *Environ. Health Perspect*. 111 1958–1962
- Sancar A, Lindsey-Boltz LA, Unsal-Kaçmaz K, Linn S. 2004. Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annu Rev Biochem*. 2004;73:39-85

- Schäfer I., Leitner EC., Schön G., et al. (2010), Multimorbidity Patterns in the Elderly: A New Approach of Disease Clustering Identifies Complex Interrelations between Chronic Condition, PLoS One 5(12): e15941
- Schubert D, Kimura H, Maher P.1992. Growth factors and vitamin E modify neuronal glutamate toxicity. Proc Natl Acad Sci U S A. 1992;89(17):8264–8267.
- Scheffe, J.H., Lehmann, K.E., Buschmann, I.R., Unger, T., Funke-Kaiser, H. 2006. "Quantitative real-time RT-PCR data analysis: current concepts and the novel "gene expression's CT difference" formula". Journal of Molecular Medicine, 84 (11): 901–10.
- Schiaffino S, Mammucari C. 2011.Regulation of skeletal muscle growth by the IGF1-Akt/PKB pathway: insights from genetic models. Skelet Muscle. 2011; 1(1):4. doi:
- Shaw WM, Luo S, Landis J, Ashraf J, Murphy CT. 2007.The C. elegans TGF-beta Dauer pathway regulates longevity via insulin signaling. Curr Biol. 2007; 17(19):1635–45.
- Shiozaki M, Yoshimura K, Shibata M, et al. 2008.Morphological and biochemical signs of age-related neurodegenerative changes in klotho mutant mice. *Neuroscience*. 2008;152(4):924–941.
- Sebastian R. And Raghavan S.C..2016.Induction of DNA damage and erroneous repair can explain genomic instability caused by endosulfan 2016; Vol.37, No. 10, 929–940 doi:10.1093/carcin/bgw081
- Seluanov A, Mittelman D, Pereira-Smith OM, Wilson JH, Gorbunova V.2004. DNA end joining becomes less efficient and more error-prone during cellular senescence. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004;101:7624–7629.
- Seluanov A, Danek J, Hause N, Gorbunova V. 2007.Changes in the level and distribution of Ku proteins during cellular senescence. DNA Repair (Amst) 2007;6:1740–1748.

- Semba RD, Moghekar AR, Hu J, et al. 2014. Klotho in the cerebrospinal fluid of adults with and without Alzheimer's disease. *Neurosci Lett*. 2014;558:37–40.
- Shibata A, Conrad S, Birraux J, Geuting V, Barton O, Ismail A, Kakarougkas A, Meek K, Taucher-Scholz G, Lobrich M, Jeggo PA. 2011. Factors determining DNA double-strand break repair pathway choice in G2 phase. *EMBO J*. 2011; 30:1079–92.
- Shiraki-Iida T, Aizawa H, Matsumura Y, Sekine S, Iida A, Anazawa H, Nagai R, Kuro-o M, Nabeshima Y. 1998. Structure of the mouse klotho gene and its two transcripts encoding membrane and secreted protein. *FEBS Lett* 1998;424:6-10.
- Sohn HY, Kwon CS, Kwon GS, Lee JB and Kim E .2004. Induction of oxidative stress by endosulfan and protective effect of lipidsoluble antioxidants against endosulfan-induced oxidative damage. 2004. *Toxicol. Lett*. 151 357–365
- Sopjani, M., Alesutan, I., Dermaku-Sopjani, M., Gu, S., Zelenak, C., Munoz, C., Velic, A., Foller, M., Rosenblatt, K. P., Kuroo, M., and Lang, F. (2011) Regulation of the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>ATPase by Klotho, *FEBS Lett.*, 585, 17591764.
- Sopjani, M. Rinnerthaler, M. Kruja, J. Dermaku-Sopjani M., 2015. Intracellular Signaling of the Aging Suppressor Protein Klotho *Curr Mol Med* ;15(1):27-37.
- Suo Z, Wu M, Citron BA, et al. 2003. Rapid tau aggregation and delayed hippocampal neuronal death induced by persistent thrombin signaling. *J Biol Chem*. 2003;278(39):37681–37689.
- Slupphaug G, Kavli B, Krokan HE. 2003. The interacting pathways for prevention and repair of oxidative DNA damage. *Mutat Res*. 2003;531(1-2):231-51
- Senturk, E. Manfredi, J. J. 2013. p53 and cell cycle effects after DNA damage. *Methods in Molecular Biology*, 962: 49-61.
- Shao Z, Davis AJ, Fattah KR, So S, Sun J, Lee KJ, Harrison L, Yang J, Chen DJ. 2012. Persistently bound Ku at DNA ends attenuates DNA end resection and homologous recombination. *DNA Repair (Amst)* 2012;11:310–316.

- Sharpless NE, DePinho RA. 2007. How stem cells age and why this makes us grow old. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007;8(9):703–13
- Shaw WM, Luo S, Landis J, Ashraf J, Murphy, CT. 2007. C. elegans TGF-beta Dauer yolu, insülin sinyalizasyonu ile uzun ömürlülüğü düzenler. *Curr Biol.* 2007; 17 (19): 1635-45. doi: 10.1016 / j.cub.2007.08.058
- Shim EY, Chung WH, Nicolette ML, Zhang Y, Davis M, Zhu Z, Paull TT, Ira G, Lee SE. 2010. Saccharomyces cerevisiae Mre11/Rad50/Xrs2 and Ku proteins regulate association of Exo1 and Dna2 with DNA breaks. *EMBO J.* 29:3370 –3380.
- Siahanidou T, Garatzioti M, Lazaropoulou C, et al. 2012. Plasma soluble  $\alpha$ -klotho protein levels in premature and term neonates: correlations with growth and metabolic parameters. *Eur J Endocrinol.* 2012;167:433–440.
- Sibanda BL, Chirgadze DY, Blundell TL. 2010. Crystal structure of DNA-PKcs reveals a large open-ring cradle comprised of HEAT repeats. *Nature.* 2010;463:118–121.
- Soutoglou E, Dorn JF, Sengupta K, Jasin M, Nussenzweig A, Ried T, Danuser G, Misteli T. 2007. Positional stability of single double-strand breaks in mammalian cells. *Nat Cell Biol.* 2007;9:675–68
- Sonoda E, Hochegger H, Saberi A, Taniguchi Y, Takeda S. 2006. Differential usage of non-homologous end-joining and homologous recombination in double strand break repair. *DNA Repair (Amst)* 2006;5:1021–1029.
- Sun J, Lee KJ, Davis AJ, Chen DJ. 2012. Human Ku70/80 protein blocks exonuclease 1-mediated DNA resection in the presence of human Mre11 or Mre11/Rad50 protein complex. *J Biol Chem.* 2012;287:4936–4945. 2.
- Takeuchi A. 1987. The transmitter role of glutamate in nervous systems. *Jpn J Physiol.* 1987;37(4):559–572.
- Tasaki, M., Kuroiwa, Y., Inoue, T., Hibi, D., Matsushita, K., Ishii, Y., Maruyama, S., Nohmi, T., Nishikawa, A., Umemura, T. 2012. Oxidative DNA damage and in vivo mutagenicity caused by reactive oxygen species generated in the livers of

p53-proficient or -deficient gpt delta mice treated with nongenotoxic hepatocarcinogens. *Journal of Applied Toxicology*, 5: 302-308

Taşar, T.P., Akçiçek, F., (2012). Yaşlılıkta Fizyolojik Değişimler. *Türkiye Klinikleri. J.Fam Med-Special Topics. Derleme*; 3(6):9-15

TC. Sağlık Bakanlığı, (2014), Ulusal Hastalık Yüğü ve Maliyet Etkinlik Araştırması, Hastalık Yüğü Final Raporu, Hıfıssıhha Mektebi Müdürlüğü, Başkent Üniversitesi, Ankara.

Teocchi, M. A., Ferreira, A.E'., da Luz de Oliveira, E. P., Tedeschi, H., and D'Souza-Li, L. (2013) Hippocampal gene expression dysregulation of Klotho, nuclear factor  $\gamma$  and tumor necrosis factor in temporal lobe epilepsy patients. *J. Neuroinflammation* 10, 53

Terman A. 2001. Garbage catastrophe theory of ageing: Imperfect removal of oxidative damage? *Redox Rep* 2001; 6:15-26.

Tissenbaum HA. 2012. Genetics, life span, health span, and the aging process in *Caenorhabditis elegans*. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2012;67(5):503 –10

Tokur O. Ve Aksoy A . 2017. In Vitro Sitotoksosite Testleri *Harran Üniv Vet Fak Derg*, 2017; 6 (1): 112-118

Tomas-Loba A, Flores I, Fernandez-Marcos PJ, Cayuela ML, Maraver A, Tejera A, Borrás C, Matheu A, Klatt P, Flores JM, et al. 2008. Telomerase reverse transcriptase delays aging in cancer-resistant mice. *Cell*. 2008; 135:609–622.

Uçar F ve Ovalı E. 2003. Hücre Kültüründe Temel İlkeler, Hücre Kültüründe Temel İlkeler Uygulamalı Hücre Kültürü Teknikleri Kurs Kitabı-1, 2003.

Uematsu N, Weterings E, Yano K, Morotomi-Yano K, Jakob B, Taucher-Scholz G, Mari PO, van Gent DC, Chen BP, Chen DJ. 2007. Autophosphorylation of DNA-PKCS regulates its dynamics at DNA double-strand breaks. *J Cell Biol*. 2007;177:219–229.



- Usenko S, Landers DH, Appleby PG and Simonich SL 2007 Current and historical deposition of PBDEs, pesticides, PCBs, and PAHs to Rocky Mountain National Park. *Environ. Sci. Technol.* 41 7235–7241
- Urakawa I, Yamazaki Y, Shimada T, et al. 2006. Klotho converts canonical FGF receptor into a specific receptor for FGF23. *Nature.* 2006;444:770–774.
- Ünalın, D., Soyuer, F., Elmalı, F. (2012). Geriatri Merkezinde Çalışanlarda Yaşlılık Tutumunun Değerlendirilmesi. *Kafkas Tıp Bilimleri Dergisi*; 2(3):115-120
- Vera E, Bernardes de Jesus B, Foronda M, Flores JM, Blasco MA. 2013. Telomerase reverse transcriptase synergizes with calorie restriction to increase health span and extend mouse longevity. *PLoS One.* 2013;8(1):e53760.
- Vijg J, Suh Y. 2005. Genetics of longevity and aging. *Annu Rev Med.* 2005;56:193–212.
- Vijg J, Campisi J. 2008. Puzzles, promises and a cure for ageing. *Nature.* 2008;454:1065–1071
- Viña J, Borrás C, Miquel J. 2007. Theories of ageing. *IUBMB Life* 2007; 59:249-254
- Voa H.T, Laszczyk A.M. and King G.D. 2018. Klotho, the Key to Healthy Brain Aging? *Brain Plasticity* 3 (2017/2018) 183–194 DOI 10.3233/BPL-170057
- Yajima H, Lee KJ, Chen BP. 2006. ATR-dependent phosphorylation of DNA-dependent protein kinase catalytic subunit in response to UV-induced replication stress. *Mol Cell Biol.* 2006;26:7520–8.
- Yang EJ, Lee JY, Park SH, et al. 2013. Neuroprotective effects of neolignans isolated from *Magnoliae Cortex* against glutamate-induced apoptotic stimuli in HT22 cells. *Food Chem Toxicol.* in press. 2013 Jun;56:304-12. doi: 10.1016
- Yamamoto, H., Schoonjans, K., Auwerx, J. 2007. Sirtuin functions in health and disease. *Molecular Endocrinology*, 21: 1745-1755.
- Yamazaki Y, Tamada T, Kasai N, et al. 2008. Anti-FGF23 neutralizing antibodies show the physiological role and structural features of FGF23. *J Bone Miner Res.* 2008;23:1509–1518.

- Yamazaki Y, Imura A, Urakawa I, et al. 2010. Establishment of sandwich ELISA for soluble  $\alpha$ -Klotho measurement: age-dependent change of soluble  $\alpha$ -Klotho levels in healthy subjects. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010;398:513–518.
- Yokoyama, J.S., Sturm V.E., Bonham L.W., Klein, E., Arfanakis, K., Yu, L., Coppola, G., Kramer J.H., Bennett B.D., Miller, B. L., Dubal, D.B. 2015. Variation in longevity gene KLOTHO is associated with greater cortical volumes *Annals of Clinical and Translational Neurology* 2015; 2(3): 215–230
- Yokoyama, J.S., Marx, G., Brown, J.A., Bonham, L.W., Wang D., Coppola, G., Seeley, W.W., Rosen H.J., Miller B.C., Kramer, J.H., Dubal D.B., 2017. Systemic klotho is associated with KLOTHO variation and predicts intrinsic cortical connectivity in healthy human aging *Brain Imaging and Behavior* (2017) 11:391–400 DOI 10.1007/s11682-016-9598-2
- Yamamoto, M., Clark, J. D., Pastor, J. V., Gurnani, P., Nandi, A., Kurosu, H., Miyoshi, M., Ogawa, Y., Castrillon, D. H., Rosenblatt, K. P., and Kuroo, M. (2005) Regulation of oxidative stress by the antiaging hormone klotho, *J. Biol. Chem.*, 280, 3802938034.
- Yao H, Sundar IK, Gorbunova V, Rahman I. 2013. P21-PARP-1 pathway is involved in cigarette smoke-induced lung DNA damage and cellular senescence. *PloS One* 2013;8:e80007
- Yu, W., Fu, Y. C., Zhou, X. H., Chen, C. J., Wang, X., Lin, R. B., Wang, W. 2009. Effects of resveratrol on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced apoptosis and expression of SIRT1 in H9c2 cells. *Journal of Cellular Biochemistry*, 107: 741-747.
- Yu W, Li L, Wang G, Zhang W, Xu J, Liang A 2018. KU70 Inhibition Impairs Both NonHomologous End Joining and Homologous Recombination DNA Damage Repair Through SHP-1 Induced Dephosphorylation of SIRT1 in Adult T-Cell Leukemia-Lymphoma Cells. *Cell Physiol Biochem* 2018;49:2111-2123 DOI: 10.1159/000493815
- Zeldich, E. Chen, C.D., Colvin, T.A. Bove-Fenderson EA, Liang J, Tucker Zhou TB, Harris DA, Abraham CR. 2014. The Neuroprotective Effect of Klotho is

Mediated via Regulation of Members of the Redox System *J Biol Chem.* Aug 29;289(35):24700-15.

Zahn JM, Poosala S, Owen AB, Ingram DK, Lustig A, Carter A, et al. 2007. AGEMAP: a gene expression database for aging in mice. *PLoS Genet* 2007;3:e201

Zhang S, Yajima H, Huynh H, Zheng J, Callen E, Chen HT, Wong N, Bunting S, Lin YF, Li M, Lee KJ, Story M, Gapud E, Sleckman BP, Nussenzweig A, Zhang CC, Chen DJ, Chen BP. Jette and Lees-Miller. 2011. Congenital bone marrow failure in DNA-PKcs mutant mice associated with deficiencies in DNA repair. *J Cell Biol.* 2011; 193:295–305.

Zhu Y, Armstrong JL, Tchkonina T, Kirkland JL. 2014. Cellular senescence and the senescent secretory phenotype in age-related chronic diseases. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2014;17(4):324–328.

Zimmermann M, Lottersberger F, Buonomo SB, Sfeir A, de Lange T. 2013. 53BP1 regulates DSB repair using Rif1 to control 5' end resection. *Science.* 2013;339:700–704.

Zhou BB, Elledge SJ. 2000. The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature.* 2000;408:433–439.

Walerych, D., Napoli, M., Collavin, L. Del Sal, G. 2012. The rebel angel: mutant p53 as the driving oncogene in breast cancer. *Carcinogenesis*, 33: 2007- 2017.

Wang Y, Sun Z. 2009. Current understanding of klotho. *Ageing Res Rev.* 2009;8(1): 43–51

Wang HL, Xu Q, Wang Z, et al. 2010. A potential regulatory single nucleotide polymorphism in the promoter of the Klotho gene may be associated with essential hypertension in the Chinese Han population. *Clin Chim Acta.* 2010;411:386–390.

Wang Y, Sun Z. 2014. Antiaging gene Klotho regulates endothelin-1 levels and endothelin receptor subtype B expression in kidneys of spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens.* 2014;32:1629–1636; discussion 1636.

- WHO. (2013), World Health Organization, global health estimates 2013: deaths by cause, age, sex and regional grouping, 2000-2012, In: World Health Organization, Global health estimates Geneva, 08 Eylül 2015, [http://www.who.int/healthinfo/global\\_burden](http://www.who.int/healthinfo/global_burden)
- WHO. Active Ageing: A Policy Frame Work 2002
- Woods D, Turchi JJ (2013) Chemotherapy induced DNA damage response: Convergence of drugs and pathways. *Cancer Biol Ther* 14: 379–389. 23761 [pii]. 10.4161/cbt.23761
- Woods D.S. , Sears C.R. and Turchi J.J. 2015. Recognition of DNA Termini by the C-Terminal Region of the Ku80 and the DNA-Dependent Protein Kinase Catalytic Subunit 2015; 10(5): e0127321. Published online 2015 May 15. doi:10.1371/journal.pone.0127321
- Walker JR, Corpina RA, Goldberg J. 2001. Structure of the Ku heterodimer bound to DNA and its implications for double-strand break repair. *Nature*. 2001;412:607–614.
- William S. Klug, Micheal R. Cummings. 2002. Genetik Kavramlar. Altıncı Baskıdan Türkçe Çeviri. Palme Yayınları. Ankara, 2002, 477-481.
- Williams DR, Lee KJ, Shi J, Chen DJ, Stewart PL. Cryo-EM. 2008. structure of the DNA-dependent protein kinase catalytic subunit at subnanometer resolution reveals alpha helices and insight into DNA binding. *Structure*. 2008;16:468–477.
- Wilson DM, III, Bohr VA, McKinnon PJ. 2008. DNA damage, DNA repair, ageing and age-related disease. *Mech Ageing Dev*. 2008;129:349–352.
- Xu Y, Sun Z. 2015. Molecular basis of Klotho: from gene to function in aging. *Endocr Rev*. 2015;36(2):174–193. doi:10.1210/er.2013-1079
- Xu, Y, Wang, N, Shi ZX, Li YB, Zhou XO, GÜNEŞ ZW 2016. *n vitro* mechanistic study of endosulfan-induced spermatogenic cell apoptosis in the mouse 2016 Eylül; 32 (9): 1550-63. DOI: 10.1177 / 0748233714567525.

Xu,D., Liang D, Guo Y, Sun Y.,2018. Endosulfan causes the alterations of DNA damage response through ATM-p53 signaling pathway in human leukemia cells  
Environmental Pollution 238 (2018) 1048e1055

Xuan, N.T. Hoang, N.H. Nhung, V.P. Duong, N.T.Ha NH, Hai NV. J. 2016. Regulation of dendritic cell function by insulin/IGF-1/PI3K/Akt signaling through klotho expression. Recept Signal Transduct Res. Nov 3:1-7.



## 7. ÖZGEÇMİŞ

28/05/1982 yılında Tokat'ta doğdum. İlk ve orta öğreniminin ardından Erciyes Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde lisans eğitimine başladım. 2004 yılında Biyoloji lisans eğitimini tamamladım. 2010-2011 eğitim yılı 1.Yarıyılında Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü bünyesinde açılan Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans eğitimine başladım ve 2013 yılında yüksek lisans eğitimimi tamamladım. 2015-2016 eğitim yılı 1.Yarıyılında Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü bünyesinde açılan Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda doktora eğitimine başladım ve 2019 yılında doktora eğitimimi tamamladım. Evli ve iki çocuk annesiyim.