



Sprague-dawley cinsi ratlarda telomer uzunluğunun kantitatif PCR ile ölçümü

The measurement of telomere length in sprague-dawley rats by quantitative PCR

Ali Okuyucu^{a*}, Abdulkerim Bedir^a, Zeliha Cansel Özmen^b

^a Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı, Samsun

^b Tokat Devlet Hastanesi Biyokimya Bölümü, Tokat

MAKALE BİLGİLERİ

Makale geçmişi

Geliş 06 / 04 / 2011

Kabul 14 / 05 / 2011

* Yazışma Adresi:

Ali Okuyucu

Ondokuz Mayıs Üniversitesi

Tıp Fakültesi

Biyokimya Anabilim Dalı, Samsun

E-posta: okuyucuali@hotmail.com

Anahtar Kelimeler:

Rat

Sprague-Dawley

Telomer

36B4

Kantitatif PCR

Relatif kantitasyon

Keywords:

Rat

Sprague-Dawley

Telomere

36B4

Quantitative PCR

Relative quantitation

ÖZET

Telomer, kromozom uçlarında TTAGGG gibi, guaninden zengin kısa dizelerin ardışık tekrarlarından ve buna bağlı bazı proteinlerden oluşan bir kompleksdir. Farklı türdeki canlılarda ve aynı türde farklı hücre ve dokularda farklı uzunluklara sahiptir. DNA replikasyonu esnasında telomer 50-150 baz kadar kısalarak kromozomal stabilitenin korunmasına katkıda bulunur. Telomerin yaşlanma, kanser ve normal hücre biyolojisindeki önemini anlayabilmek için yapılan çalışmalarda; telomer uzunluğu, altın standart olarak kabul edilen Southern Blot yanında birkaç farklı metotla ölçülmüştür. Bu metodların kendine göre üstün ve eksik yönleri bulunmaktadır. Biz de bu çalışmada, ratların telomer uzunluğu ölçümünde kullanabileceğimiz ve daha sonraki çalışmalara da uygulanabilir bir kantitatif PCR protokolü oluşturmayı ve bu protokolle farklı rat dokularındaki telomer uzunlukları hakkında bilgi edinmeyi amaçladık. Dört erkek Sprague-Dawley cinsi ratın karaciğer, ince bağırsak ve pankreas dokusu ve lenfositlerinden DNA izolasyonu yapıldı. Numunelerde genom sayısını belirleyebilmek için tek kopya gen olarak 36B4 geni seçildi. 36B4 genine spesifik primerlerin kullanıldığı Q-PCR ile bir rat dokusundaki genom kopya sayısı bulundu. Rat genom standardı olarak kullanılan bu numune tüm numunelerdeki genom sayısını bulmak için kullanıldı. Tüm numunelerde telomer (T) ve 36B4 (S) için kantitatif PCR yapıldı. İki çalışmada elde edilen ürünler birbirine oranlararak her numune için T/S oranı daha sonra da bir kalibratör numune kullanılarak relatif T/S oranı hesaplandı. Ayrıca 10,2 kb telomer standardı kullanarak numunelerin telomer uzunlukları kilobaz olarak da hesaplandı. Relatif kantitasyon için mutlak gerekli olan Telomer ve 36B4 PCR çalışmalarında % 100 verimliliğe ulaştık. Bunu logaritmik başlangıç konsantrasyonuna karşı ΔCT grafiği slope değerinin 0,1'den küçük olması ile de gösterdik. Ayrıca telomer uzunluğu açısından rat dokuları arasında anlamlı bir fark bulundu ($p < 0,05$). Sonuç olarak rat dokularında telomer uzunluğu ölçümü için hassas, kolay ve hızlı bir Q-PCR protokolü oluşturduğumuzu düşünmekteyiz.

J. Exp. Clin. Med., 2011; 28:168-174

ABSTRACT

Telomere consist of sequential repetitions of guanine-rich short sequences, such as TTAGGG, and some related proteins complexes in the ends of chromosomes. The different organisms and different cells and tissues of same organisms have different telomere lengths. Telomere contributes to the protection of chromosomal stability by shorten ~50–150 base during DNA replication. Telomere length was measured by several different methods as well as Southern blot, which is considered the gold standard in the studies to understand the importance of telomere in aging, cancer and normal cell biology. These methods has specific superior and limitations to himself. In this study, we aimed to create a quantitative PCR protocol, we can use to measurement of telomere length of rats and can also be applied in subsequent studies, and to obtain information about the telomere lengths in the different tissues of rats by this protocol. Genomic DNA was extracted from liver, small intestine, pancreas tissue and lymphocytes of four male Sprague-Dawley rat. The 36B4 gene was chosen as single copy gene for determine the number of genom in the samples. The number of genome copies were found in a rat tissue by qPCR that is used the 36B4 gene-specific primers. This sample, that is used as rat genom standarts, was

used for find the number of genome in all samples. The qPCR was performed for telomere (T) and 36B4 (S) in all samples. The T / S ratio was calculated by the ratio of the products derived from two studies to each other, and then the relative T / S ratio was calculated by using a calibrator sample for each sample. In addition, telomere lengths of the samples were also calculated as kilobase by using 10,2 kb long telomere standard. We reached to 100% of efficiency in the studies of telomere and 36B4 PCR, it is necessary to the relative quantitation. We also demonstrated by the value of slope in ΔC_t graphics versus logarithmic initial concentration is less than 0,1. In addition, a statistically any significant difference found between tissues of rat for telomere length ($p < 0.05$). In conclusion, we think that we created a sensitive, easy, and quick Q-PCR protocol for the measurement of telomere length in tissues of rats.

J. Exp. Clin. Med., 2011; 28:168-174

© 2011 OMÜ Tüm hakları saklıdır

1. Giriş

Kromozom uçları telomer olarak isimlendirilen özelleşmiş DNA ve protein kompleksinden oluşmaktadır (Wai, 2004). Omurgalılarda telomerik DNA, TTAGGG gibi, guaninden zengin kısa dizelerin ardışık tekrarlarından oluşur (de Lange ve ark., 1990). Telomer uzunluğu farklı orjinden kaynaklanan organizmalar arasında değiştiği gibi aynı organizmanın farklı hücre ve dokularında da değişik uzunlukta olabilir (Zijlmans ve ark., 1997). Örneğin insanda uzunluğu 3-20 kilobaz (kb) arasında değişirken, ratlarda 20-100 kb ve farelerde 150 kb'a kadar uzun olabilir (Moyzis ve ark., 1988; Harley ve ark., 1990). DNA replikasyonu esnasında, DNA polimeraz kesikli olarak sentezlenen zincirin 3' ucunu tam olarak sentezleyemez. Uç replikasyon problemi olarak bilinen bu olay nedeni ile her replikasyon periyodunda telomer 50-150 baz kadar kısalmır (Makarov ve ark., 1997). Bu kademeli telomer kısalmasına ilave olarak, tamir edilemeyen DNA hasarı ve epigenetik faktörler hızlı telomer kısalmasına ve yaşlanma oluşumuna katkıda bulunabilir (Rubelj ve Vondracek, 1999). Telomer stabilitesi, genetik ve çevre gibi çeşitli faktörlerden etkilendiğinden, telomer kısalmasının, oksidatif stresin bir belirteci olabileceği ve ortalama ömrü belirleyebileceği öne sürülmüştür (Cawthon ve ark., 2003).

Telomer biyolojisi ve fonksiyonu yaşlanma ve kanserin yanı sıra normal hücre biyolojisini anlamak için de önemlidir. Bu nedenden araştırmacılar farklı metodlarla telomer uzunluğunu ölçmeye çalışmışlardır. Telomer uzunluğu ölçümünde altın standart Southern tarafından tanımlanan Southern Blot (SB) ile TRF (Terminal Restriction Fragment) analizidir (Southern, 1975). Bu teknikte DNA, belirli bölgelerinden kesilir ve agaroz jel elektroforezi ile ayrılır. Elektroforezle ayrılan DNA jele aktarılır ve telomere spesifik işaretli problemlerle hibridize edilir. Problemleri işaretlemek için izotopik veya kemiluminesans maddeler kullanılabilir. SB ile TRF analizinin dezavantajları olsa da, günümüzde en sık kullanılan methoddur. Ayrıca diğer metodlarla karşılaştırmada standart bir metod olarak kullanılmaktadır.

Nakamura ve arkadaşları tarafından geliştirilen Hibridasyon Protection Assay (HPA), telomer ve Alu sekansına spesifik problemlerin akrinyum esterleri ile işaretlendiği, numuneler ile hibridize edildiği ve telomer/Alu sekansı oranı şeklinde sonucun alındığı bir methoddur (Nakamura ve ark., 1999). Hücre düzeyinde telomer sekansının işaretlenmesine izin veren Fluorescence In situ Hybridization (FISH) tekniğinde, kromozomlar metafaz evresinde iken denatüre edilen DNA'lar, telomere spesifik işaretli oligonükleotid problemlerle hibridize edilir. Özel boyalar ile boyanan örnekler floresan mikroskop veya dijital görüntüleme sistemi ile değerlendirilir (Lansdorp ve ark., 1996). Benzer olarak, metafaz hazırlığı

olmadığından daha kısa süren ve oligonükleotid yerine peptid nükleik asit (PNA) kullanılan, FISH ile flow sitometrinin kombine kullanıldığı Flow-FISH tekniği de kullanılmıştır (Baerlocher ve ark., 2002). Primed In situ (PRINS) tekniğinde ise sentetik oligonükleotid primer metafaz veya interfazda kromozomlarla hibridize edildikten sonra DNA polimeraz varlığında, floresan işaretli nükleotidler eklenir. Floresan mikroskopla tesbit edilen görüntüler bilgisayar programı ile analiz edilir (Lavoie ve ark., 2003). Cawthon tarafından tanımlanan kantitatif polimeraz zincir reaksiyonunda (Q-PCR) telomere spesifik primerler kullanılarak telomer kopya sayısı ve bununla birlikte bir tek kopya genin kopya sayısı bulunur. Daha sonra telomer kopya sayısı, tek kopya genin kopya sayısına oranlanarak relatif telomer uzunluğu hesaplanır (Cawthon, 2002). PCR temelli başka bir metod olan Single Telomer Length Analizinde (STELA), özel bir primerin bağlanması ile telomerle birlikte subtelomerik bölge de çoğaltılır (Cheung ve ark., 2004).

Biz de çalışmamızda, deney hayvanı olarak sıkça kullanılan Sprague-Dawley cinsi ratların telomer uzunluğu ölçümünde daha sonraki çalışmalara temel oluşturacak bir Q-PCR protokolü oluşturmayı ve bu protokolü kullanarak farklı rat dokularındaki telomer uzunlukları hakkında bilgi edinmeyi amaçladık.

2. Gereç ve yöntem

Ratlardan lenfosit ve dokuların elde edilmesi

Hayvan çalışması için Samsun Ondokuz Mayıs Üniversitesi etik kurulundan onay alındı. Ondokuz Mayıs Üniversitesi Cerrahi Araştırmalar Merkezinde standart şartlarda yetiştirilen 7-8 haftalık, 4 tane erkek Sprague-Dawley cinsi rat kısa eter anesteziyi takiben öldürüldü. EDTA'lı tüpe kan alındı ve Histopaque-1077 ile lenfositler izole edildi. Ratlardan karaciğer, ince bağırsak ve pankreas dokuları kesilerek çıkarıldı. Tüm dokular ve lenfositler çalışılacağı zamana kadar -70 °C'de saklandı. DNA İzolasyonu: High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche Diagnostics, Germany) kullanılarak lenfosit ve dokulardan DNA izolasyonu yapıldı. DNA konsantrasyonları nanofotometre (IMPLEN NanoPhotometer, U.K.) ile $\mu\text{g/mL}$ olarak ölçüldü.

Primerlerinin belirlenmesi

Numunelerdeki nükleer genom sayısını belirleyebilmek ve PCR çalışmasını normalize etmek için tüm dokularda ve sürekli olarak eksprese edilen referans bir gen belirlenmesi gerekiyordu. Bu amaçla, rat genomunda 12. kromozomda bulunan, tek kopya olarak eksprese edilen ve pseudogeni olmayan, "acidic ribozomal fosfoprotein P0 (36B4)" geni seçildi. LightCycler Probe Design Software 2,0 programı kullanıla-

rak 453 bazçifti (bp) uzunluğunda ampikon oluşturan 36B4 Standart primerleri (Genbank accession no: NW 047376.1) ve 453 bp'lik 36B4 standart sekansı içinden 80 bp'lik ampikon oluşturacak 36B4 primerleri (Genbank accession no: NW 047376.1) belirlendi. Çalışmada Richard Cawthon (Cawthon, 2002) tarafından tasarlanan telomer primer seti kullanıldı. Çalışmada kullanılan tüm primerler Tablo1'de gösterilmiştir.

Tablo 1. Çalışmada kullanılan primer sekansları

36B4 Standart Forward primer: 5'-gaacaacccgctctggaga-3'
36B4 Standart Reverse primer: 5'-gcacatcgctctgaggaa-3'
36B4 Forward primer: 5'-tcggtattgagagctctg-3'
36B4 Reverse primer: 5'-gcacatcgctctgaggaa-3'
Tel1b primer: 5'-cggtttgttgggttgggttgggttgggttgggtt-3'
Tel2b primer: 5'-ggcttgcttacccttacccttacccttacccttaccct-3'

Tablo 2. 453 bp 36B4 ampikonu için PCR mastermix içeriği

<u>İçerik</u>	<u>Miktar</u>
36B4 standart forward primer (Ella Biotech GmbH)	0,25 µM
36B4 standart reverse primer (Ella Biotech GmbH)	0,25 µM
Taq Buffer (Roche)	1 X
Taq DNA Polymerase (Roche)	1,25 U/ 50 µL
dNTP (Fermentase)	0,2 mM
Kalıp DNA	50 ng/50 µL

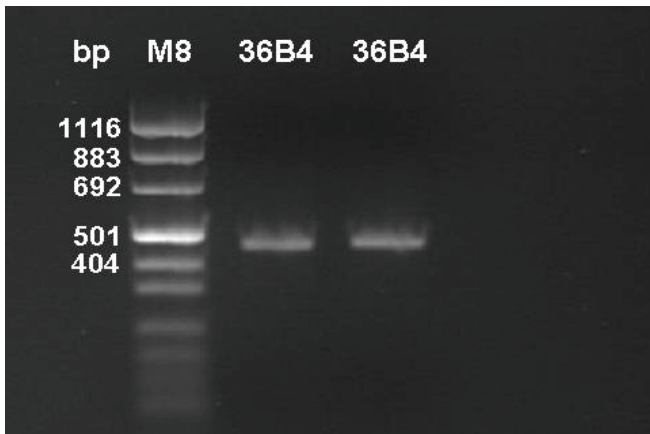
Tablo 3. 453 bp 36B4 ampikonu için PCR programı

<u>Evre</u>	<u>Sıcaklık</u>	<u>Süre</u>	<u>Siklus sayısı</u>
Başlangıç Denatürasyonunu	94 °C	4 Dakika	1
Denatürasyon	94 °C	1 Dakika	30
Annealing	60 °C	30 Saniye	30
Elongasyon	72 °C	1 Dakika	30
Final Ekstansiyon	72 °C	5 Dakika	1
Soğutma	6 °C	4 Saat	1

Rat nükleer genom standartının elde edilmesi

Numune olarak, herhangi bir rat DNA'sının kullanıldığı standart PCR çalışması ile 453 bp uzunluğundaki 36B4 ampikonu çoğaltıldı. PCR için hazırlanan mastermix içeriği tablo 2 ve PCR programı Tablo 3'de gösterilmiştir.

High Pure PCR Product Purification Kit (Roche) kullanı-



Şek. 1. 36B4 standardına ait elektroforez bandları (bp: bazçifti, M8: Marker 8)

larak, PCR ürününden 453 bp saf 36B4 ampikonu elde edildi. Elde edilen ürün % 2'lik agaroz jele yüklenerek 80 V ile 50 dakika elektroforez uygulandı ve jel görüntüleme cihazında (Avagene, PacificImage Electronics) değerlendirildi (Şek. 1).

Saflaştırılan 36B4 standart numune nanospektrofotometre ile 13 µg/ml olarak ölçüldü. Ampikon uzunluğu 453 bp ve bir bp'nin ağırlığı 660 Dalton (Da) olduğundan, 1 Ampikonun ağırlığı = 453 x 660 = 298980 Da ve 1 Da=1/ 6,02x10²³ gr olduğundan, 4,96 x 10⁻¹³ µg olarak bulundu. Ampikon kopya sayısı da; 13 µg/ml / 4,96 x 10⁻¹³ µg ve 2,6 x 10¹³ kopya / ml (= 2,6 x 10¹⁰ kopya / µl) olarak bulundu.

36B4 standart konsantrasyonu 130 fg/ µl'ye ayarlandı. Sonra 10 kat dilüsyonla 130- 0,013 fg/ µl arasında 5 stan-

Tablo 4. 36B4 PCR mastermix içeriği

<u>İçerik</u>	<u>Miktar</u>
36B4 forward primer (Ella Biotech GmbH)	0,25 µM
36B4 reverse primer (Ella Biotech GmbH)	0,25 µM
SYBR Green (Sigma-Aldrich)	0,2 X
LightCycler-FastStart DNA Master Hybridization Probes (Roche)	0,5 U
MgCl ₂	3 mM

Tablo 5. 36B4 PCR programı

<u>Evre</u>	<u>Sıcaklık</u>	<u>Süre</u>	<u>Siklus sayısı</u>
Başlangıç Denatürasyonunu	95 °C	10 Dakika	1
Denatürasyon	95 °C	5 Saniye	40
Annealing	56 °C	10 Saniye	40
Elongasyon	72 °C	6 Saniye	40
Soğutma	6 °C	4 Saat	1

dart hazırlandı. Genom standardı olarak kullanılacak olan rat DNA numunesinin miktarını bulmak için bu standartların yardımı ile LightCycler (Roche) PCR cihazında 36B4 PCR yapıldı. Çalışmada kullanılan mastermix içeriği Tablo 4, PCR programı da Tablo 5'de gösterilmiştir.

Bu çalışma 18 µL mastermix üzerine 2 µL DNA numunesi eklenerek yapıldı ve genom standardı olarak kullanılacak numune 6,97 fg/µl ölçüldü. Rat genom standardının kopya sayısını bulmak için 6,97 fg/µl, 453 bp ampikonun ağırlığına bölündü (6,97 fg/µl / 4,966 x10⁻⁴ fg) ve numunede ~14000 kopya/µl genom olduğu bulundu. 2,75 x10⁹-2,82 x10⁹ bp arasında olan bir rat genom uzunluğu (Rat Genome Sequencing Project Consortium, 2004) ortalama 2,8 x10⁹ bp ağırlığı da yaklaşık 3 pg olarak kabul edildi (1 bp = 660 Da). Elimizdeki numune 14000 kopya/µl olduğundan, konsantrasyon 42 ng/µl olarak bulundu (14000 x 3 pg). Bu rat genom standardı olarak kabul edildi ve tüm numunelerin nükleer genom sayısını bulmak için kullanıldı.

Tablo 6. 36B4 ve telomer PCR çalışması mastermix içerikleri

<u>İçerik</u>	<u>Telomer</u>	<u>36B4</u>
36B4 forward primer		0,25 µM
36B4 reverse primer		0,25 µM
Tel1b primer (Ella Biotech GmbH),	0,1 µM	
Tel2b primer (Ella Biotech GmbH),	0,1 µM	
SYBR Green	0,3 X	0,2 X
LightCycler-FastStart DNA Master Hybridization Probes	0,5 U	0,5 U
MgCl ₂	3 mM	3 mM

Q-PCR uygulanması

Tüm numuneler 40–50 pg/μL'ye ayarlandı. Rat genom standardından 2 kat dilüsyonla 210 – 6,56 pg/μL arasında 6 standart hazırlandı. PCR yapılırken 10 μL kullanıldığından

Tablo 7. 36B4 ve telomer PCR programı

Evre	36B4		Telomer	
	°C ve süre	Siklus sayısı	°C ve süre	Siklus sayısı
Başlangıç Denatürasyonu	95 °C'de 10 dk	1	95 °C'de 10 dk	1
Denatürasyon	95 °C'de 5 sn	40	95 °C'de 15 sn	25
Annealing	56 °C'de 10 sn	40	60 °C'de 10 sn	25
Elongasyon	72 °C'de 6 sn	40	72 °C'de 30 sn	24
Soğutma	6 °C'de 4 h	1	6 °C'de 30 sn	1

standartlar 2100 – 65,6 pg/μL arasında oldu. Bu standartların yardımı ile tüm numunelerde 36B4 ve telomer PCR çalışıldı. Çalışmalarda kullanılan mastermix içeriği Tablo 6, PCR programı da Tablo 7'de gösterilmiştir. Çalışmalar 10 μL mastermix üzerine 10 μL numune eklenerek LightCycler PCR cihazında yapıldı.

Karşılaştırmalı CT Metodu ile Relatif Kantitasyonun Yapılması

Telomer PCR ürünü, tek kopya gen olarak kullanılan 36B4 PCR ürününe oranlanarak tüm numuneler normalize edildi. PCR verimliliği %100 olduğundan telomer/36B4 (T/S) oranı = $2^{Ct(\text{telomer})} / 2^{Ct(36B4)} = 2^{[Ct(\text{telomer}) - Ct(36B4)]} = 2^{-\Delta Ct}$ şeklinde formülize edildi. Her numune için 36B4 CT değeri, telomer CT değerinden çıkarılarak, ΔCt değeri ve formül kullanılarak T/S oranı hesaplandı. En düşük ΔCt değerine sahip kontrol numunesi kalibratör olarak kabul edildi ve kalibratörün ΔCt değeri numunelerin ΔCt değerinden çıkarılarak, her numune için $\Delta \Delta Ct$ değeri bulundu ve Relatif T/S oranı: $2^{\Delta Ct(\text{numune})} / 2^{\Delta Ct(\text{kalibratör})} = 2^{\Delta Ct(\text{numune}) - \Delta Ct(\text{kalibratör})} = 2^{-\Delta \Delta Ct}$ formülü kullanılarak relatif T/S oranı hesaplandı. Bu metodla telomer uzunluğu kalibratör kabul edilen numunenin “n katı” şeklinde ifade edildi.

Tablo 8. β-globin PCR mastermix içeriği

İçerik	Miktar
β-globin primer mix (Roche)	0,3 μM
β-globin hybridization prob LC640 (Roche), Prob1	0,2 μM
Prob2	0,4 μM
SYBR Green (Sigma-Aldrich)	0,2 X
LightCycler-FastStart DNA Master Hybridization Probes (Roche)	0,5 U
MgCl ₂	3 mM

Tablo 9. β-globin PCR programı

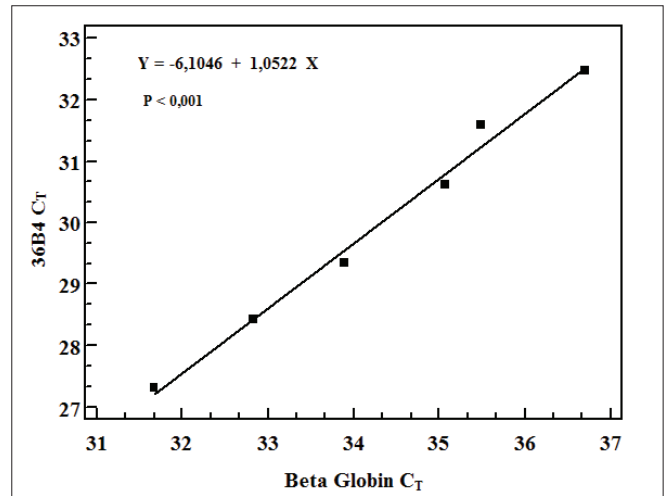
Evre	Sıcaklık	Süre	Siklus sayısı
Başlangıç Denatürasyonu	95 °C	10 Dakika	1
Denatürasyon	95 °C	0 Saniye	50
Annealing	55 °C	10 Saniye	50
Elongasyon	72 °C	5 Saniye	50
Soğutma	40 °C	30 Saniye	1

Telomer Standardı Kullanarak Numunelerin Kantitasyonu

Numunelerin telomer uzunluğunu kb olarak vermek için 10,2 kb uzunluğunda insan telomer standartları (TeloTAGGG telomere length assay kit, Roche) kullanıldı. Numunelerdeki rat genom sayısı 36B4 PCR yapılarak belirlenmişti. Ama elimizdeki 36B4 primerleri rat genomu için belirlendiğinden bu standartlar için uygun değildi. Bu nedenle telomer standartlarındaki genom miktarının belirlenmesi için β-globin primerlerini (LightCycler Control kit DNA, Roche) kullanmaya ve daha sonra da bu çalışmadan elde edilen CT değerlerini 36B4 CT değerlerine dönüştürmeye karar verdik.

İnsan genomik DNA'dan (LightCycler control kit DNA, Roche) 231 – 72 pg/μL arasında 6 standart hazırlandı. PCR'da 10 μL kullanıldığında standartlar 2310 – 72 pg/μL, bir insan genomu 3,3 pg kabul edildiğinde kopya sayısı da 700 – 21,9 kopya/μL oldu. Çalışmada 400 pg telomer standardı kullanıldı. β-globin PCR mastermix içeriği Tablo 8, PCR programı da Tablo 9'da gösterilmiştir. Çalışmada standartlara ait slope değeri –3,361 ve CT değerleri 31,67–36,70 arasında, 10,2 kb telomer standardının CT değeri de 33,49 bulundu.

β-globin PCR'da kullanılan insan genomik DNA kopya sayısı ile aynı olacak şekilde 6 rat genom standardı hazırlandı. PCR'da 10 μL kullanıldığında standartlar 2100 – 65,65 pg/μL, bir rat genomu 3 pg kabul edildiğinde kopya sayısı da 700 – 21,9 kopya/μL arasında oldu. Tablo 6 ve 7'de gösterilen mastermix ve program kullanılarak 36B4 PCR yapıldı. Çalışmada standartlara ait slope değeri –3,597 ve CT değerleri 27,49–31,92 arasında bulundu.

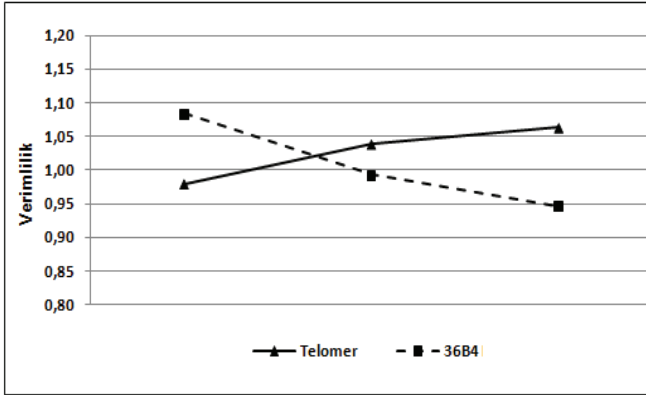
**Şek. 2.** β-globin - 36B4 CT dönüşümünün regresyon grafiği ve formülü

İnsan genomik DNA ile yapılan β-globin PCR'dan elde edilen CT değerleri 36B4 CT değerine dönüştürülerek telomer standartlarının normalizasyonunda kullanıldı. Bu amaçla β-globin ve 36B4 PCR'dan elde edilen CT değerlerine istatistik programında (MedCalc version 6.16.0, Frank Schoonjans, Belçika) regresyon analizi yapıldı. Elde edilen regresyon formülü (Şek. 2) ile insan telomer standartlarının β-globin CT değeri 36B4 CT değerine dönüştürüldü. Bu formül kullanılarak 10,2 kb uzunluğundaki telomer standardının 36B4 CT değeri 29,13 olarak hesaplandı. Numunelerde olduğu gibi, telomer PCR çalışması sonucunda elde edilen ürün, tek kopya gene oranlanarak telomer standardı için telomer / single copy gene (T/S) oranı bulundu. Daha sonra 10,2 kb uzunluğundaki

telomer standardı kalibratör olarak kabul edilerek tüm numunelerin relatif T/S oranları hesaplandı. Relatif T/S oranları da 10,2 ile çarpılarak numunelerin telomer uzunluğunu kb olarak bulundu.

Tablo 10. Telomer ve 36B4 PCR çalışmaları verimlilik sonuçları

	Telomer		36B4	
	Slope	Verimlilik	Slope	Verimlilik
Çalışma 1	-3,372	0,98	-3,137	1,08
Çalışma 2	-3,233	1,04	-3,342	0,99
Çalışma 3	-3,180	1,06	-3,461	0,95
Ortalama	-3,262	1,02	-3,313	1,00

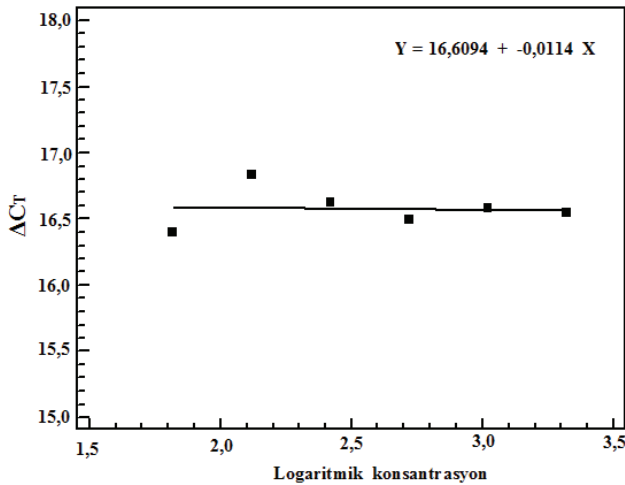


Şek. 3. Telomer ve 36B4 PCR verimlilik grafiği

Tablo 11. Farklı konsantrasyonlarda Telomer ve 36B4 için ortalama CT değerleri

DNA Miktarı (pg/µL)	Ortalama Telomer C _T *	Ortalama 36B4 C _T *	ΔC _T *
2100	10,69 ± 0,06	27,34 ± 0,14	16,65 ± 0,18
1050	11,73 ± 0,08	28,31 ± 0,11	16,58 ± 0,19
525	12,73 ± 0,05	29,23 ± 0,33	16,50 ± 0,38
262,50	13,71 ± 0,14	30,34 ± 0,25	16,62 ± 0,33
131,2	14,62 ± 0,21	31,46 ± 0,17	16,83 ± 0,38
65,50	15,63 ± 0,20	32,02 ± 0,41	16,40 ± 0,60

*Değerler ortalama ± SD olarak verilmiştir.



Şek. 4. Logaritmik başlangıç konsantrasyonuna karşı ΔCT grafiği

3. Sonuçlar

Telomer ve 36B4 için yaptığımız üç PCR çalışmasında da yaklaşık % 100 verimliliğe ulaştık (Tablo 10 ve Şek. 3). Farklı başlangıç konsantrasyonlarında telomer ve 36B4 için orta-

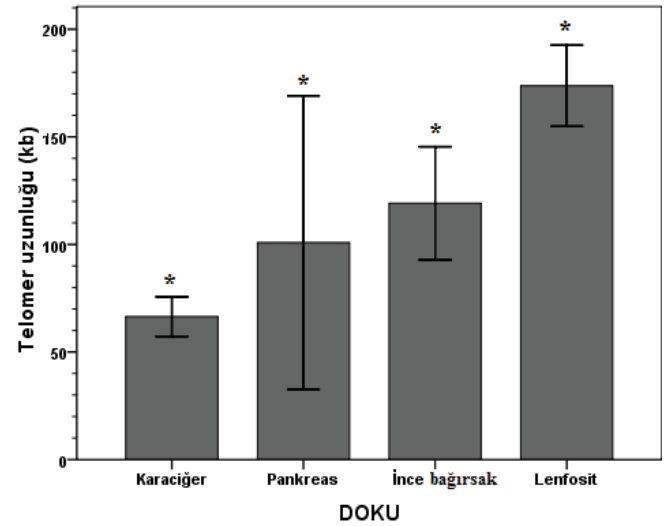
lama CT değerleri de Tablo 11’de gösterilmiştir. Bu tabloda ΔCT değerlerinin yaklaşık eşit olduğu görülmektedir. Ayrıca Şekil 4’deki logaritmik başlangıç konsantrasyonuna karşı ΔCT grafiğinde slope değerinin 0,1’den küçük olduğu gösterildi.

Tablo 12. Rat dokularının relatif kantitasyon sonuçları

	Telomer Ct	36B4 Ct	ΔC _T	ΔΔC _T	Relatif T/S
Karaciğer-1	12,89	28,71	-15,82	-0,35	1,27
Karaciğer-2	12,93	28,92	-15,99	-0,52	1,43
Karaciğer-3	12,26	28,8	-16,54	-1,07	2,10
Karaciğer-4	12,52	28,62	-16,1	-0,63	1,55
İnce bağırsak-1	11,33	28,1	-16,77	-1,30	2,46
İnce bağırsak-2	11,77	29,12	-17,35	-1,88	3,68
İnce bağırsak-3	11,93	29,21	-17,28	-1,81	3,51
İnce bağırsak-4	11,55	28,17	-16,62	-1,15	2,22
Pankreas-1	14,26	29,73	-15,47	0	1,00
Pankreas-2	12,63	29,34	-16,71	-1,24	2,36
Pankreas-3	13,28	29,78	-16,5	-1,03	2,04
Pankreas-4	13,27	29,79	-16,52	-1,05	2,07
Lenfosit-1	11,28	28,54	-17,26	-1,79	3,46
Lenfosit-2	12,04	28,7	-16,66	-1,19	2,28
Lenfosit-3	11,32	28,96	-17,64	-2,17	4,50
Lenfosit-4	11,1	28,68	-17,58	-2,11	4,32

Tablo 13. Rat dokularının telomer uzunlukları (* kb)

	Ortalama*	Minimum*	Maksimum*
Karaciğer	61,5875	56,51	67,67
İnce bağırsak	110,3775	91,17	125,41
Pankreas	93,4167	71,04	121,14
Lenfosit	160,9600	149,14	172,51



Şek. 5. Rat dokularının ortalama telomer uzunlukları (* % 95 CI)

Numunelerin relatif kantitasyonu

Örnekler arasında en düşük ΔCT değerine sahip olan Pankreas-1 dokusu kalibratör kabul edilerek elde edilen relatif T/S oranları tablo 12’de, telomer standardı kalibratör kabul edilerek elde edilen kb olarak telomer uzunluklarının ortalama, minimum ve maksimum değerleri Tablo 13’de gösterilmiştir.

Dokular arasında telomer uzunluğunda bir fark olup ol-

madığını belirlemek için Kruskal-Wallis testi kullanılarak yapılan analizde telomer uzunluğu açısından dokular arasında anlamlı fark bulundu ($p < 0,05$). Şekil 5'de dokuların ortalama telomer uzunlukları ve % 95 güven aralıkları (% 95 CI) grafik olarak gösterilmiştir.

4. Tartışma

Memelilerde telomer biyolojisini anlamaya yönelik yapılan çalışmalarda, telomer uzunlukları genellikle SB tekniği ile ölçülmüştür. Telomer uzunluğu ölçümünde altın standart ve referans metod olarak kullanılmasına rağmen SB ile TRF analizinin, saf ve parçalanmamış DNA gerekli olması, tek bir kromozom yerine tüm kromozomların ortalama telomer uzunluğunu yansıtmaması, bilinmeyen uzunlukta subtelomerik bölge içermesi nedeniyle gerçek telomer uzunluğu hakkında bilgi vermemesi ve analiz için en az 1 µg DNA gerekli olması (Saldanha ve ark., 2003) gibi bazı dezavantajları vardır. Alternatif olarak geliştirilen basit ve hızlı bir teknik olan HPA da, sağlam DNA gerekmez ve subtelomerik bölge bulunmaz. Ama bu metod da telomer uzunluğunu direk olarak ölçemediği gibi hücre ve kromozom düzeyinde detaylı bilgi vermez. Hücre düzeyinde telomer sekansının oligonükleotid problemlerle işaretlenmesine izin veren Fluorescence In situ Hybridization (FISH) ise zaman alıcı, pahalı, teknik olarak zor ve yetişmiş personel gerektiren bir tekniktir (Lansdorp ve ark., 1996). Flow-FISH tekniği ile çalışma süresi kısaltılmaya çalışılmıştır. PRINS tekniği ise sentromerin α-satellit veya 10 kb'dan daha uzun DNA tekrar sekanslarında etkili bir metoddur. SB, FISH, Flow-FISH ve STELA tekniğinde subtelomerik bölge, HPA'da kullanılan Alu sekansı ve PRINS'daki sentromerik sekansın bireyler arası değişkenlik düzeyi bilinmediğinden yanlış sonuçlar elde edilebilir. Kesim bölgesi polimorfizmi veya subtelomerik bölge uzunluk polimorfizmine bağlı olarak aynı telomer uzunluğuna sahip bireylerde farklı TRF uzunlukları görülmektedir. Q-PCR metodunda tek kopya geni kullanılarak bu sorun çözülmeye çalışılmış ve relatif telomer uzunluğu hesaplanmıştır (Cawthon, 2002). Diğer metodların aksine iyi bir optimizasyon sonrası Q-PCR telomer uzunluğu ölçümü için daha kolay, daha hızlı, hassas ve çok az DNA ile uygulanabilir bir metod olarak görülmektedir. Biz Q-PCR ile relatif telomer uzunluklarını ölçerken 400–500 pg DNA kullandık. Ayrıca relatif kantitasyonla birlikte 10,2 kb'lık telomer standartını kalibratör olarak kullanarak telomer uzunluklarını kb olarak da bulduk. Relatif kantitasyon için telomer ve tek kopya genin PCR verimliliği ve farklı konsantrasyonlarda ΔCT değeri yaklaşık eşit olması gerekmektedir. Bizim PCR protokolümüz ile telomer ve tek kopya genin PCR verimliliği sırasıyla % 102 ve % 100 bulundu. Bu verimliliğe ulaşabilmek için bazı noktalara dikkat edilmesi gerekmektedir. Öncelikle Q-PCR ile telomer ölçümü yaparken referans gen olarak 36B4 gibi pseudogeni bulunmayan bir tek kopya geni kullanılmalıdır. Ayrıca yüksek verimlilik sağlamak için standart konsantrasyonları dar bir aralıkta hazırlanmalıdır. Diğer önemli bir nokta da PCR'da SYBR Green I boyası kullanılacaksa, dimer oluşturmayacak primerler seçilmeli ve kontaminasyona dikkat edilmelidir.

KAYNAKLAR

Baerlocher, G.M., Mak, J., Tien, T., Lansdorp, PM., 2002. Telomere length measurement by fluorescence in situ hybridization and flow cytometry: Tips and pitfalls. *Cytometry*. 47, 88-99.

Çalışmamızda, bir Q-PCR protokolü oluşturmanın yanında farklı rat dokularındaki telomer uzunlukları hakkında bilgi edinmeyi amaçlamıştık. Rodent telomerleri genelde insanlardan daha uzundur ve çalışılması teknik olarak zordur. Bu nedenle rodentlerde doku spesifik telomer uzunlukları iyi anlaşılammış ve heterojen uzunlukta olduğu rapor edilmiştir (Kipling ve Cooke, 1990). *Mus musculus*'ta 150 kb (Prowse ve Greider, 1995), *mus spretus*'ta 30 kb (Zijlmans ve ark., 1997) ve ratlarda ise 20-100 kb (Golubovskaya ve ark., 1999; Jennings ve ark., 1999) uzunluğunda olduğu bildirilmiştir. Yenidoğan fare dokularının SB ile ölçülen ortalama TRF uzunluğu benzerken, yetişkin fare dokuları arasında fark gözlenmiştir. Yetişkin fare testis telomeri, böbrek ve beyin telomerinden 2-3 kb, karaciğer telomeri ise 1 kb daha uzun olarak bulunmuştur (Prowse ve Greider, 1995). Başka bir çalışmada da yenidoğan rat karaciğer, beyin, kalp, böbrek ve akciğer dokularında ortalama TRF uzunluğu birbirine yakın ve yaklaşık 60-65 kb civarında bulunmuştur (Hastings ve ark., 2004). Yirmibir günlük ratlarda yapılan başka bir çalışmada ise böbrek, karaciğer, pankreas ve akciğerde ölçülen ortalama TRF uzunluğu 8,6-112 kb arasında bulunmuştur (Cherif ve ark., 2003). Yapılan çalışmalar incelendiğinde farklı sonuçların elde edildiği ve genellikle SB ile TRF ölçümü yapıldığı görülmektedir. Bizim çalışmamızda rat karaciğer, pankreas, ince bağırsak dokuları ve lenfositte, Q-PCR kullanarak ölçtüğümüz ortalama telomer uzunluklarını sırasıyla; 61,5 kb, 93 kb, 110 kb ve 190 kb olarak bulduk. Dokular arası telomer uzunluğunda ki bu fark istatistiksel olarak da anlamlıydı ($p < 0,05$). Bizim elde ettiğimiz telomer uzunlukların diğer çalışmalardan farklı olmasının, çalışılan doku tipi ve kullanılan metod değişikliklerine bağlı olabileceğini düşündük.

Yetişkin rat dokuları arasındaki bu farkın telomeraz aktivitesine bağlı olabileceği düşünülmüş ve insanlardan farklı olarak birkaç rat somatik dokusunun telomeraz aktivitesine sahip olduğu gösterilmiştir (Yamaguchi ve ark., 1998; Son ve ark., 2000). On haftalık erkek ratlarda yapılan bir çalışmada karaciğer, testis, dalak, akciğer ve kolon mukozasında lenfosit ve ince bağırsak dokusundan daha fazla telomeraz aktivitesi gözlenirken, beyin ve pankreasda telomeraz aktivitesinin çok az veya hiç olmadığı gösterilmiştir. Kısa telomere sahip hücrelerin, telomer devamlılığını sağlaması için telomeraz aktivitesine sahip olması gerektiğini düşünürsek; telomer uzunluğunu kısa olarak bulduğumuz karaciğer dokusunda telomeraz aktivitesinin bulunması, bunun aksine uzun telomere sahip ince bağırsak ve lenfositte telomeraz aktivitesinin nispeten daha az olması ile birbirini desteklemektedir. Bu çalışmamızda farklı rat dokularında telomer uzunluğu ölçümü için kullanılacak hassas, kolay ve hızlı bir Q-PCR protokolü oluşturmayı amaçlamıştık. Elde ettiğimiz sonuçlar dikkate alındığında bunu başardığımızı düşünmekteyiz. Rat telomerleri için optimize ettiğimiz bu protokolün farklı rat dokularında, aynı telomerik tekrar sekansına sahip diğer memelilerde ve insan dokularında telomer dinamiğini araştırarak çalışmalarda kullanılabileceğini düşünüyoruz.

- Cawthon, R.M., 2002. Telomere measurement by quantitative PCR. *Nucleic Acids Res.* 30, 47.
- Cawthon, R.M., Smith, K.R., O'Brien, E., Sivatchenko, A., Kerber, R.A., 2003. Association between telomere length in blood and mortality in people aged 60 years or older. *Lancet.* 361, 393-395.
- Cherif, H., Tarry, J.L., Ozanne, S.E., Hales, C.N., 2003. Ageing and telomeres: A study into organ- and gender-specific telomere shortening. *Nucleic Acids Res.* 31, 1576-1583.
- Cheung, I., Schertzer, M., Baross, A., Rose, A.M., Lansdorp, P.M., Baird, D.M., 2004. Strain-specific telomere length revealed by single telomere length analysis in *Caenorhabditis elegans*. *Nucleic Acids Res.* 32, 3383-3391.
- de Lange, T., Shiue, L., Myers, R.M., Cox, D.R., Naylor, S.L., Killery, A.M., Varmus, H.E., 1990. Structure and variability of human chromosome ends. *Mol. Cell. Biol.* 10, 518-527.
- Golubovskaya, V.M., Filatov, L.V., Behe, C.I., Presnell, S.C., Hooth, M.J., Smith, G.J., Kaufmann, W.K., 1999. Telomere shortening, telomerase expression and chromosome instability in rat hepatic epithelial stem-like cells. *Mol. Carcinog.* 24, 209-217.
- Harley, C.B., Futcher, A.B., Greider, C.W., 1990. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature.* 345, 458-460.
- Hastings, R., Li, N., Lacy, P.S., Patel, H., Herbert, K.E., Stanley, A.G., Williams, B., 2004. Rapid telomere attrition in cardiac tissue of the ageing Wistar rat. *Exp. Gerontol.* 39, 855-857.
- Jennings, B.J., Ozanne, S.E., Dorling, M.W., Hales, C.N., 1999. Early growth determines longevity in male rats and may be related to telomere shortening in the kidney. *FEBS Lett.* 448, 4-8.
- Kipling, D., Cooke, H.J., 1990. Hypervariable ultra-long telomeres in mice. *Nature.* 347, 400-402.
- Lansdorp, P.M., Verwoerd, N.P., van de Rijke, F.M., Dragowska, V., Little, M.T., Dirks, R.W., Rapp, A.K., Tanke, H.J., 1996. Heterogeneity in telomere length of human chromosome. *Hum. Mol. Genet.* 5, 685-691.
- Lavoie, J., Bronsard, M., Lebel, M., Drouin, R., 2003. Mouse telomere analysis using an optimized primed in situ (PRINS) labeling technique. *Chromosoma.* 111, 438-444.
- Makarov, V.L., Hirose, Y., Langmore, J.P., 1997. Long G tails at both ends of human chromosomes suggest a C strand degradation mechanism for telomere shortening. *Cell.* 88, 657-666.
- Moyzis, R.K., Buckingham, J.M., Cram, L.S., Dani, M., Deaven, L.L., Jones, M.D., Meyne, J., Ratliff, R.L., Wu, J.R., 1988. A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)_n, present at the telomeres of human chromosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85, 6622-6626.
- Nakamura, Y., Hirose, M., Matsuo, H., Tsuyama, N., Kamisango, K., Ide, T., 1999. Simple, rapid, quantitative, and sensitive detection of telomere repeats in cell lysate by a hybridization protection assay. *Clin. Chem.* 45, 1718-1724.
- Prowse, K.R., Greider, C.W., 1995. Developmental and tissue-specific regulation of fare telomerase and telomere length. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92, 4818-4822.
- Rat Genome Sequencing Project Consortium, 2004. Genome sequence of the Brown Norway rat yields insights into mammalian evolution. *Nature.* Vol. 428.
- Rubelj, I., Vondracek, Z., 1999. Stochastic mechanism of cellular aging – abrupt telomere shortening as a model for stochastic nature of cellular aging. *J. Theor. Biol.* 197, 425-438.
- Saldanha, S.N., Andrews, L.G., Tollefsbol, T.O., 2003. Assessment of telomere length and factors that contribute to its stability. *Eur. J. Biochem.* 270, 389-403.
- Son, N.H., Murray, S., Yanovski, J., Hodes, R.J., Weng, N., 2000. Lineage-specific telomere shortening and unaltered capacity for telomerase expression in human T and B lymphocytes with age. *J. Immunol.* 165, 1191-1196.
- Southern, E.M., 1975. Long range periodicities in fare satellite DNA. *J. Mol. Biol.* 94, 51-69.
- Wai, L.K., 2004. Telomeres, telomerase, and tumorigenesis. *Med.Gen.Med.* 6, 19.
- Yamaguchi, Y., Nozawa, K., Savoysky, E., Hayakawa, N., Nimura, Y., Yoshida, S., 1998. Change in telomerase activity of rat organs during growth and aging. *Exp. Cell Res.* 242, 120-127.
- Zijlmans, J.M., Martens, U.M., Poon, S.S., Raap, A.K., Tanke, H.J., Ward, R.K., Lansdorp, P.M., 1997. Telomeres in the mouse have large inter-chromosomal variations in the number of TA2AG3 repeats. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94, 742.