



**Bakır Mineralinin Anemi Durumundaki Dengeleyici ve  
Düzeltici Etkisinin Moleküler ve Genetik Düzeyde İnsan  
Enterosit Hücre Modelinde Araştırılması**

**Program Kodu: 1002**

**Proje No: 215Z041**

Proje Yürütücüsü:  
**Yrd. Doç. Dr. Şükrü Güleç**

Bursiyer:  
**Ezgi Evcan**

EKİM 2017  
İZMİR



## ÖNSÖZ

Günümüzde besin eksikliğine bağlı olarak birçok hastalık tanımlanmıştır. Bu hastalıklara ait patolojinin anlaşılması, besinlerin doku düzeyindeki metabolizmalarının moleküler ve genetik düzeyde iyi anlaşılmasından geçmektedir. Besin eksikliğinde bazen besinler tek tek değerlendirilirken bazen de besinlerin fizyolojik ilişkilerine bağlı olarak beraber değerlendirilmesi gerekmektedir. Bunun en güzel örneğini demir ve bakır minerallerinde görmekteyiz. Demir, vücudumuz ve sağlığımız için çok önemli ve gerekli bir geçiş meneralidir. Dünyada en yaygın ve ilk sırada görülen besin eksikliği demir mineralinin yetersiz alınımından kaynaklanan anemidir. Metabolik olarak demir mineralinin vücuttan atılmasını sağlayan aktif bir mekanizma olmaması ince bağırsak demir emilimini ön plana çıkarmıştır. Vücut içerisindeki demir miktarı demirin besinlerden emilim oranı ile belirlenmektedir. Bu oran kontrolsüz arttığında da demirin toksik etkisi ortaya çıkmaktadır ve doku hasarına bağlı olarak birçok hastalığa neden olmaktadır. Bu yüzden demirin vücuttaki regülasyonu çok önemlidir. Bakır, tıpkı demir gibi vücudumuz için önemli bir mineraldir. Birçok yaşamsal faaliyet için gerekli enzimlerin aktivitesi bakır mineraline bağlıdır. Bakır eksikliği ölümcül olan Menkes hastalığı olarak ortaya çıkmaktadır. Diyetsetel bakır eksikliği hemen hemen görülme sıklığı çok düşük olan bir problemdir. Genelde genetik olarak görülen bakır eksikliği tedavi edilmedikçe istenmeyen sonuçlara neden olmaktadır. Bakırın vücuttaki miktarının artması özellikle karaciğer, göz ve beyin dokusunda geri dönüşümsüz problemler oluşturmaktadır. Demir ve bakırın günlük alınması gereken miktarları kıyaslandığında, vücut için gerekli bakır miktarı demire göre oldukça azdır. Özellikle besinlerden gelen ve kanda bulunan bakır ve demir minerallerinin birbirlerinin metabolizmasını genetik düzeyde nasıl etkilediğine dair çalışmalar bulunmamaktadır. Projenin bilimsel çıktılarında, demir ve bakır minerallerinin özellikle kanda bulunan seviyelerinin anemi durumunda bakır ve demir metabolizmasındaki genlerin regülasyonunda daha önemli olabileceğini *in vitro* olarak göstermiştir. İnsan ince bağırsak sisteminde bakır ve demir metabolizmasına ait hücre içi sinyallerin özellikle hücrelerin bazolateral (kana bakan) kısmına bağlı bilinmeyen moleküler mekanizmalar aracılığı ile olabileceği ortaya konmuştur. Proje desteklerini sağlayan kuruluşlar bilimin yapılabilmesinde ana rolü üstlenmektedirler. Ülkemizde bilimi destekleyen ve besleyen saygın bir kuruluş olan TÜBİTAK'a bu projeyi (PN:215Z041) desteklediği için teşekkürü çalışma grubumuz olarak bir borç biliriz.

Yrd. Doç. Dr. Şükrü Güleç



## ÖZET

Demir eksikliğine bağlı anemi, dünyadaki besin eksikliğinin neden olduğu hastalıklar arasında ilk sırada yer alan bir problemdir. Bu yüzden anemik durumu dengeleyici veya düzeltici faktörlerin bilinmesi demir metabolizmasının anlaşılması için önemlidir. Demir eksikliği anemisinde bağırsak enterosit hücrelerinde bakır seviyesinin arttığı gösterilmiştir ve bu da bakırın demir eksikliği anemisindeki durumu düzeltici etkisi olabileceğini düşündürmektedir. Bu bağlamda projede bakır mineralinin demir eksikliğine bağlı oluşturulan anemik durumdaki düzeltici etkisi moleküler ve genetik düzeyinde insan enterosit hücre modelinde (Caco-2) incelendi. Projenin ilk kısmında Caco-2 hücreleri 12 bölmeli steril hücre kaplarında 21 gün süre ile büyütüldü. İkinci kısımda, besinden gelen ve kandaki bakırın etkisinin *in vitro* olarak test edilebilmesi için insan bağırsak sistemi modellendi. Bunun için Caco-2 hücreleri özel membranlarda büyütülerek polarize olmaları sağlandı. Daha sonra hücrelere deferoksamin (DFO) verilerek demir eksikliğine bağlı anemi oluşturuldu. Hücreler bakır ve demir ile muamele edildi. Örneklerden RNA izolasyonu yapıp, cDNA dönüşümü gerçekleştirildi. Bunu takiben RT-qPCR metodu ile gruplar arasındaki belirli genlerin mRNA ekspresyon seviyelerine bakıldı. *Dmt1* ve *Ftn* genlerine ait mRNA regülasyonlarının hücre kültürü kabında ve membran sisteminde büyüyen hücreler arasında farklı olduğu gözlemlendi. Membran sistemindeki sonuçlara göre, bakırın demir eksikliği anemisinde artan *Fpn* ve *Dmt1* genlerinin mRNA seviyelerini düşürdüğü saptandı. Daha da önemlisi bu anlamlı azalma, bakırın polarize olmuş hücrelerin yalnızca bazolateral kısmına verilmesiyle gözlemlenmiştir. Bu da kandaki bakırın demir eksikliği anemisinde bağırsak demir homeostazının hücre içi moleküler mekanizmasını etkilediğini göstermektedir. Buna ilaveten, kontrol grubuyla kıyaslandığında bakırın anemik koşullar altında regüle olan *Ankrd37* ve *Egln* genlerinin mRNA ekspresyonlarını etkilemediği bulunmuştur. Projede anemi durumunda demir mineralinin bakır metabolizmasındaki genlere etkisi de incelenmiştir. Anemi durumunda bazolateral kısma verilen demir bakır ile regüle olan genler içinde yalnızca *Atp7a* mRNA ekspresyonunu etkilemektedir. Elde edilen bulgular, kandaki bakırın diyetten gelen bakıra göre enterosit hücrelerinde demir eksikliği anemisini azaltmada daha etkili olabileceğini göstermektedir. Bakır, anemi durumunda demir mineraline bağlı regüle olan *Fpn* ve *Dmt1* genlerinin mRNA ekspresyonlarını enterosit hücrelerinin basolateral kısımları üzerinden etkilemektedir. Anemide *Fpn* ve *Dmt1* genlerini regüle etmek için kandaki bakır tarafından etkilenebilen moleküler mekanizmaların neler olduğunu ortaya çıkaran fonksiyonel çalışmalara ihtiyaç vardır.

**Anahtar Kelimeler:** Bakır, demir, anemi, enterosit, ferroportin (*Fpn*), divalent metal transporter 1 (*Dmt1*)



## ABSTRACT

Iron deficiency anemia is the most common problem among nutrient deficiency related diseases in the world. Thus, it is important to understand the mechanisms that are lying under iron deficiency and compensatory response of cells to iron deficiency. It has been shown that copper level increases in enterocyte cells of intestine during iron deficiency anemia and this suggests that copper might have ability to compensate iron deficiency anemia. Thus, compensatory response of copper mineral to iron deficiency anemia at the level of molecular and genetic regulation in human enterocyte cell culture model (Caco-2) was investigated. In the first part of the project, Caco-2 was grown on 12-well culture plates. In the second part, human intestine system was mimicked to test effect of the dietary and blood copper in *in vitro*. Caco-2 cells were grown and polarized on the membrane system. Caco-2 cells were treated with deferoxamine (DFO) to induce iron deficiency anemia. Then, copper and iron were given to cells. RNA isolation was performed in the samples and RNA samples were converted to cDNA. RT-qPCR was performed to analyze gene expression levels. We observed that regulation of *Dmt1* and *Ftn* genes were different between cells that were grown on cell culture plate and membrane system. When we looked at results from membrane system, we found that copper decreased mRNA levels of *Fpn* and *Dmt1* genes during iron deficiency anemia. Most importantly we found this significant reduction when copper was given only basolateral side of polarized cells. This indicates blood copper influences intracellular molecular mechanism(s) of intestinal iron homeostasis during iron deficiency anemia. Moreover, copper did not affect mRNA expression of *Ankrd37* and *Egln* genes under condition of anemia compare to control group. Effect of iron on mRNA expression of copper regulated genes was also investigated in the study. We found that iron affected only *Atp7a* mRNA expression into copper regulated genes during anemia. This effect was observed when iron was given into only basolateral side of cells relative to other experimental groups. In conclusion, our results suggest that blood copper might have more effective than dietary copper in order to reduce iron deficiency anemia in enterocyte cells of small intestine. Copper influences iron regulating mRNA expressions of *Fpn* and *Dmt1* genes during anemia through basolateral side of enterocyte cells. Further functional study is necessary to evaluate which molecular mechanism(s) sense to blood copper to regulate *Fpn* and *Dmt1* genes during anemia.

**Key Words:** Copper, iron, anemia, enterocyte, ferroportin (*Fpn*), divalent metal transporter 1 (*Dmt1*)

## İÇİNDEKİLER

TABLolar LİSTESİ .....	vii
ŞEKİLLER LİSTESİ .....	viii
1. GİRİŞ .....	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ .....	1
2.1. Demir Mineraline Genel Bakış .....	1
2.2. Bağırsak Demir Metabolizması .....	2
2.2.1. Enterosit Hücrelerinden Demir Emilimi .....	2
2.2.2. Enterosit Demir Metabolizmasından Görevli Genlerin Regülasyonu .....	3
2.2.3 Bakır Mineraline Genel Bakış .....	5
2.2.4. Enterosit Bakır Metabolizması .....	6
2.2.5. Bakırın Fizyolojik Olarak Demir Metabolizmasındaki Bilinen ve Bilinmeyen Etkileri .....	6
3. YÖNTEM .....	8
3.1. Bakırın Anemik Durumda, Demir Metabolizmasına Etkisinin Moleküler ve Genetik Düzeyde Belirlenmesi .....	8
3.1.1. Hücre Kültürü Çalışmaları .....	9
3.1.2. Hücre Hattının Hazırlanması .....	10
3.1.3. Demir Eksikliğine Bağlı Anemik Koşulların Oluşturulması ve Demir, Bakır Mineralleri ile Hücrelerin Muamele Edilmesi .....	10
3.1.4. Örneklerden RNA İzolasyonu .....	10
3.1.5. cDNA Sentezi ve Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qPCR) .....	11
3.1.6. Ekpresyon Seviyeleri Araştırılacak Genlerin Demir Metabolizması ile İlişkileri .....	12
3.2. Sistemik (Kandaki) Veya Diyetsetel Bakırın Demir Metabolizmasındaki Etkisinin in vitro Olarak Test Edilmesi .....	13
3.2.1. İnsan Bağırsak Sisteminin Modellenmesi ve Hücre Bariyer Sisteminin Oluşturulması .....	13
3.2.2. Demir Eksikliğine Bağlı Anemik Koşulların Oluşturulması ve Bakır Minerali ile Hücrelerin Muamele Edilmesi .....	16
3.2.3. İstatistik .....	16
4. BULGULAR VE TARTIŞMA .....	17
4.1. RNA İzolasyonu Kalitesinin Belirlenmesi ve Primer Çalışma Verimliliğinin Test Edilmesi .....	17



4.2. Hücre Kültürü Kaplarında Büyütülen Anemik Caco-2 Hücrelerinde Bakır Mineralinin Anemi Durumunda Demir Metabolizmasında ve Hipoksiyadaki Etkisinin Genetik Düzeyde İncelenmesi.....	20
4.3. Hücre Kültürü Kaplarında Büyütülen Anemik Caco-2 Hücrelerinde Demir Mineralinin Anemi Durumunda Bakır Metabolizmasında ve Hipoksiyadaki Etkisinin Genetik Düzeyde İncelenmesi.....	21
4.4. Hücre Kültürü Kaplarında Büyütülen Caco-2 Hücrelerinde Bakır ve Demir Mineralinin Anemi Durumunda Bakır, Demir Metabolizmalarında ve Hipoksiyadaki Etkisinin Genetik Düzeyde İncelenmesi.....	22
4.5. İnsan İnce Bağırsak Sisteminin Modellenmesi ve DFO, Cu, Fe Muamelelerinin Hücre Bariyer Direncine Etkisinin Araştırılması.....	23
4.6. Membran Üzerinde Büyütülen Caco-2 Hücrelerinde Bakır Mineralinin Anemi Durumunda Demir Metabolizmasında ve Hipoksiyadaki Etkisinin Genetik Düzeyde İncelenmesi.....	24
4.7. Membran Üzerinde Büyütülen Caco-2 Hücrelerinde Demir Mineralinin Anemi Durumunda Bakır Metabolizmasında ve Hipoksiyadaki Etkisinin Genetik Düzeyde İncelenmesi.....	26
4.8. Membran Üzerinde Büyütülen Caco-2 Hücrelerinde Bakır ve Demir Mineralinin Anemi Durumunda Bakır, Demir Metabolizmalarında ve Hipoksiyadaki Etkisinin Genetik Düzeyde İncelenmesi.....	28
5. GENEL DEĞERLENDİRME VE GELECEKTE YAPILACABİLECEK PROJELER.....	29
EKLER .....	32
KAYNAKLAR.....	33



## TABLULAR LİSTESİ

Tablo (Ek 1). Primer Listesi .....	32
------------------------------------	----

## ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. İnce bağırsak enterosit hücrelerinden demir emilim mekanizmaları (A ve B).....	3
Şekil 2. Demir metabolizmasında rol alan genlere ait mRNA'ların moleküler kontrol mekanizmaları.....	4
Şekil 3. İnce bağırsak enterosit hücrelerinden bakır emilimi ve metabolizması. ....	6
Şekil 4. Hücre kültürü kaplarında büyütülen hücreler ile yapılan deney özeti: .....	9
Şekil 5. Hücre büyütülmesinde kullanılan sistem .....	14
Şekil 6. Hücre elektriksel bariyer direnci (trans epithelial electrical resistance (TEER) ölçümü.....	15
Şekil 7. Membran sisteminde büyütülen hücreler ile yapılan deney özeti.....	16
Şekil 8. RNA izolasyon verimliliğinin ve RNA kalitesinin belirlenmesi.....	17
Şekil 9. Seçilen bazı primerlere ait 'Melting Curve' sonuçları .....	19
Şekil 10. Cu Mineralinin Demir Metabolizmasındaki ve Hipoksiyada Rol Oynayan Genlerin Ekspresyonlarına Etkisi .....	20
Şekil 11. Fe Mineralinin Bakır Metabolizmasındaki ve Hipoksiyada Rol Oynayan Genlerin Ekspresyonlarına Etkisi .....	21
Şekil 12. Bakır ve Fe Minerallerinin Demir, Bakır Metabolizmalarında ve Hipoksiyada Rol Oynayan Genlerin Ekspresyonlarına Etkisi.....	23
Şekil 13. Hücre Polarizasyonun TEER ile Belirlenmesi ve Deneysel Muamelelerin Hücre Bariyer Direncine Etkisi .....	24
Şekil 14. Bakır Mineralinin Demir Metabolizmasında ve Hipoksiyada Rol Oynayan Genlerin Ekspresyonlarına Anemi Durumundaki Etkisinin In vitro İnsan İnce Bağırsak Sisteminde İncelenmesi.....	26
Şekil 15. Demir Mineralinin Bakır Metabolizmasında ve Hipoksiyada Rol Oynayan Genlerin Ekspresyonlarına Anemi Durumundaki Etkisinin In vitro İnsan İnce Bağırsak Sisteminde İncelenmesi.....	27
Şekil 16. Bakır ve Demir Mineralinin Bakır, Demir Metabolizmalarında ve Hipoksiyada Rol Oynayan Genlerin Ekspresyonlarına Anemi Durumundaki Etkisinin In vitro İnsan İnce Bağırsak Sisteminde İncelenmesi.....	29





## 1. GİRİŞ

Demir ve bakır minerali, vücuttaki diğer minerallerden farklı olarak yükseltgenme ve indirgenme redoks potansiyeline sahiptirler. Bu minerallerin hücre içerisine alınması ve verilmesi kontrollü bir şekilde olmakta ve metabolizmaları hücresel ve sistemik düzeyde çok sıkı bir şekilde kontrol edilmektedir (Knutson, 2010). Demir minerali, hücre büyümesi ve farklılaşması, vücudun immün yanıtındaki etkisi, demir eksikliğine bağlı anemiyi önlemesi gibi birçok fizyolojik etkiye sahiptir (Knutson ve Wessling-Resnick, 2003). Bunun yanında metabolik olarak demir ile yakından ilişkisi olan bakır minerali de vücuttaki hayati önem taşıyan enzimler için gerekli bir kofaktördür (Collins vd., 2010). Son zamanlarda yapılan çalışmalarda, bakırın demir metabolizması üzerindeki etkileri gösterilmiştir (Jiang vd., 2011; Ranganathan vd., 2011). Bu iki minerale bağlı metabolik bozukluklarda ölüm ile sonuçlanabilen çok ciddi hastalıklar ortaya çıkmaktadır. Demir eksikliği dünyada en yaygın görülen besin eksikliğinin neden olduğu metabolik bir bozukluktur ve bakır mineralinin anemi üzerinde etkisinin olduğu düşünülmektedir (Ranganathan vd., 2012; Gulec ve Collins, 2014). Bu yüzden bu iki mineralin fizyolojik etkileşimlerinin ortaya konması önemlidir.

## 2. LİTERATÜR ÖZETİ

Literatür özetinde, demir ve bakır minerallerinin genel özelliklerinden bahsedilecek daha sonrasında, bağırsak enterosit hücre metabolizmalarında görev alan genler ve moleküler mekanizmalar hakkında bilgi verilecektir. Son olarak demir ve bakır mineralinin fizyolojik ilişkileri bilinen ve bilinmeyen yönleri ile tartışılacaktır.

### 2.1 Demir Mineraline Genel Bakış

Demir, dünya yüzey kabuğunda en çok bulunan geçiş metali olarak ikinci sırada yer almaktadır (Crichton ve Charlotheaux-Wauters, 1987). Demir, hemoglobindeki 'heme' molekülünün yapısında yer alarak oksijenin vücut içindeki dokulara taşınmasında rol oynamaktadır (Guggenheim, 1995). Bu yüzden yaşayan organizmalar için gerekli bir besinsel faktördür. Bunun yanında demirin mitokondriyal enerji üretimi (Hershko vd., 2005), hücre büyümesi (Fu ve Richardson, 2007), vücuttaki bakterilere karşı oluşan yanıtta (Cassat ve Skaar, 2013) ve steroid hormon sentezi (Waterman ve Simpson, 1985) gibi birçok fizyolojik olayda rol oynadığı gösterilmiştir. Hücre içindeki demir miktarının kontrolü çok önemlidir.

Fazla miktarda demir feton reaksiyonu ile hücre için tehlikeli olan hidroksil radikallerinin oluşmasına ve hücre membranlarının, DNA ve proteinlerin zarar görmesine neden olmaktadır (Aruoma vd., 1989). Eksikliğinde ise anemi görülmektedir (Andrews, 1999).

Besinlerde iki çeşit demir bulunmaktadır. Bunlardan ilki özellikle kırmızı ette bulunan hemoglobine bağlı formdaki demir ve diğeri ise inorganik olan demirdir (Hurrell, 1997). Bu iki farklı demir formunun bağırsaktan hücre içine alınımı farklılık göstermesine rağmen, vücutta aynı demir havuzunda toplanırlar ve demir metabolizmasına katkıları aynı şekilde olmaktadır. İnorganik demir, bitkilerde, kuru bakliyatlarda ve az miktarda et ürünlerinde rastlanmaktadır. İnsan günlük olarak besinlerden yaklaşık 10-15 mg oranında demir alırken? , bunun yaklaşık 1-2 mg'ı bağırsak hücrelerinden emilebilmektedir (Andrews, 1999). Genel olarak bir insan vücudunda yaklaşık 3-4 g arasında demir bulunmaktadır. Demirin insan vücudundan atılımı için özelleşmiş bir sistem bulunmamaktadır (Gulec ve Collins, 2014) ancak çok az miktarda çeşitli yollardan demir kaybı görülmektedir (bağırsaktan kopan enterosit hücreleri, deri kopmaları ve tırnakların kesilmesi gibi) (Green vd., 1968). Bu yüzden vücut içindeki demir mineralinin döngüsü ve moleküler genetik düzeydeki kontrolü çok önemlidir. Bu döngü içerisinde vücuda demir girişinden ve regülasyonundan sorumlu bağırsak enterosit hücreleri önemli bir yere sahiptir. Demir eksikliğine bağlı anemi, dünyada en yaygın görülen besin eksikliğinin neden olduğu ve her yaş grubundan bireyleri etkileyen metabolik bir bozukluktur (Guilbert, 2003). Diğer yandan vücutta demir fazlalığı da (hemochromatosis) insan sağlığı için önemli bir sorun olmakta ve genetik faktörlerin etkisi ile de (HFE genindeki mutasyon) ortaya çıkabilmektedir (Stremmel vd., 2007). Genel mekanizma ise bu görülen mutasyonlar sonucu bağırsaktan demir emilim kontrolü yitirilme ve ilerleyen zaman periyodu sonunda vücutta demir birikimi (bu mutasyonu taşıyan bireyler 40-60 yaşlarına ulaştıklarında vücutlarında 20-40 g demir bulunmaktadır) olmaktadır (Stremmel vd., 2007). Demir eksikliği veya fazlalığının oluşumuna bakıldığında, bağırsak dokusundaki enterosit hücrelerinin, demir metabolizması için ne kadar önemli olduğu ön plana çıkmaktadır.

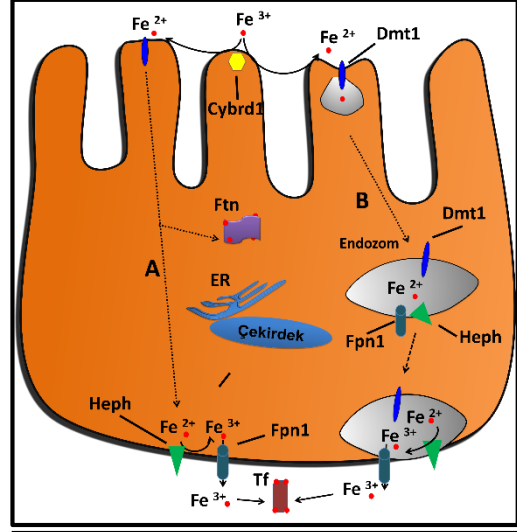
## **2.2 BAĞIRSAK DEMİR METABOLİZMASI**

### **2.2.1 Enterosit Hücrelerinden Demir Emilimi**

Aktif olarak demirin vücuttan atılması için özelleşmiş bir sistemin olmaması, vücuttaki demir seviyesinin kontrolünde bağırsak enterosit hücrelerinden demir emilimini ön plana çıkarmaktadır. Çünkü emilimin yetersizliği anemiye neden olurken fazlalığı da dokularda tahribata neden olmaktadır. Bağırsak sisteminin enterosit hücreleri demir emiliminden sorumludur. Besinlerden gelen inorganik demir mineralinin emilimi için iki mekanizma

öngörülmüştür (Gulec ve Collins, 2014) (Şekil-1). Bu öngörülen iki mekanizmada (A ve B) ortak nokta, besinlerden gelen  $Fe^{+3}$  enterosit hücrelerinin apikal kısmında bulunan (enterosit hücrelerinin besinlerin geldiği tarafa bakan kısmı) redüktaz proteini (duodenal cytochrome B (Dcytb Cybrd1)) tarafından  $Fe^{+2}$  formuna dönüştürülmesidir (McKie vd., 2001).

En iyi tanımlanmış mekanizma (Şekil-1) de A mekanizması olarak özetlenmiştir.  $Fe^{+2}$  forma dönüştürülmüş demir, enterosit hücrelerinin apikal tarafta bulunan transport protein (divalent metal transporter 1 (Dmt1)) aracılığıyla hücre içerisine girer. Hücre içerisindeki demir ya demiri depolayan (ferritin (Ftn)) proteini tarafından alınır (Harrison ve Arosio, 1996) veya vücutta kullanılmak üzere kana verilir. Hücre dışına verilirken ilk aşamada  $Fe^{+2}$  formundaki demir minerali, oksidaz proteini (Heph) ile  $Fe^{+3}$  formuna dönüştürülür ve bazolateral (enterosit hücresinin vücut içine bakan tarafı) kısımda lokalize olmuş Fpn1 transport proteini ile hücre dışına verilir (Donovan vd., 2000). Kanda demir metali taşıyıcı protein (Tf) ile karaciğer, kemik iliği başta olmak üzere demire ihtiyaç duyan organlara iletilir (Anderson vd., 2002).



Şekil 1. İnce bağırsak enterosit hücrelerinden demir emilim mekanizmaları (A ve B).

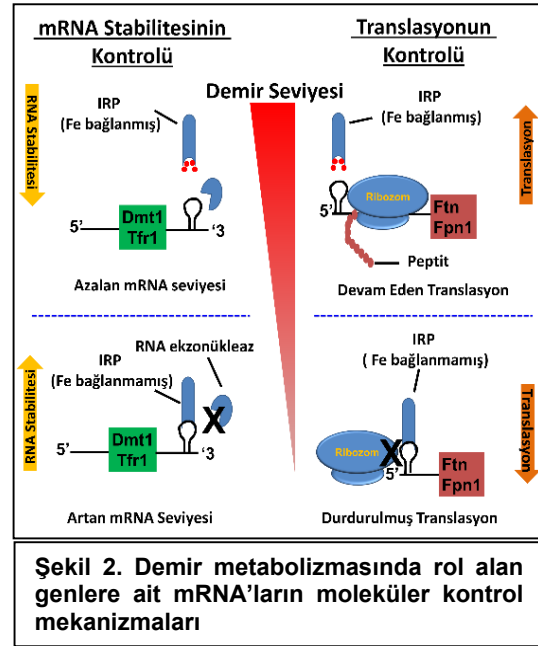
İkinci mekanizma ise şekil-1 B'de özetlenmiştir.  $Fe^{+2}$  formundaki demir apikal tarafta bulunan transport protein (Dmt1) tarafından hücre içerisinde oluşan endozom kompleksi ile hücre içerisine alınır (Ma vd., 2002) sonrasında oksidaz olarak görev yapan protein tarafından (Hephaestin (Heph))  $Fe^{+3}$  formuna dönüştürülür ve endozom üzerindeki demiri hücre dışına veren transport proteini (Fpn1) ile kana verilir. Daha sonrasında demir metali taşıyan protein (Transferrin (Tf)) ile vücuttaki dokulara iletilir.

## 2.2.2 Enterosit Demir Metabolizmasından Görevli Genlerin Regülasyonu

Hücre içi demir metabolizmasında görev yapan genlere ait mRNA'ların regülasyonu, transkripsiyon sonrası moleküler mekanizmalar ile kontrol edilmektedir (Şekil-2). Bu mekanizmada görev yapan ve hücre içi demiri bağlayabilen regülatör protein (iron regulatory proteins (IRPs)), demir metabolizmasında rol oynayan genlerin mRNA sekansları üzerinde bulunan özel baz dizilerine (iron response elements (IREs)) bağlanarak mRNA transkript

stabilitesini kontrol eder ve bu mekanizmalar aşağıda detayları ile özetlenmiştir (Pantopoulos, 2004).

Fpn1 ve Ftn mRNA'ları (5'-) uçlarında peptit kodlamayan ama mRNA regülasyonunda rol oynayan motifler içermektedir. Özellikle karaciğer hücrelerinde demirin hücre içerisine alınımından sorumlu Tfr1 ve bağırsakta demir transport eden Dmt1 mRNA'ları ise (3'-) uçlarında bu özel motifleri bulunur. Ortamda demir miktarı az ise, IRP proteini mRNA'ların (5'-) ucundaki IRE baz dizisine bağlanarak, mRNA'nın ribozom kompleksi ile temasını etkiler ve protein sentezini düşürürken, mRNA'ların (3'-) ucuna bağlanarak ekzonükleazların mRNA'ları parçalanmasını azaltarak mRNA stabilitesini artırır



(Pantopoulos, 2004). Şekil-2 de özetlenen bu mekanizmaya bağlı olarak, hücre içi demir seviyesi arttığında Dmt1 ve Tfr1 (özellikle karaciğer ve kemik iliği hücrelerinde Transferine (Tf) bağımlı demir alınımında sorumlu reseptör protein) mRNA stabiliteyi azalırken Ftn ve Fpn1 protein sentezi gerçekleşir. Hücre içi demir seviyesi azaldığında, Dmt1 ve Tfr1 mRNA stabiliteyi artarken, Ftn ve Fpn1 protein sentezi azalmaktadır (Muckenthaler vd., 2008). IRP ve IRE mekanizmalarından farklı olarak, enterosit demir metabolizmasında görev alan genler transkripsiyon düzeyinde de kontrol edilebilmektedir.

Demir eksikliği enterosit hücrelerinde hipoksik yanıtı neden olmakta ve demir metabolizmasındaki genlerin transkripsiyon düzeyinde regülasyonundan sorumludur ve bağırsak demir emiliminde büyük rol oynamaktadır (Shah vd., 2009). Hücredeki demir miktarının azalması, demire bağımlı hipoksik ortamın oluşmasını sağlamaktadır. Hipoksik sinyalde görevli transkripsiyonu kontrol eden iki protein (Hypoxia inducible factors, Hif1 $\alpha$  ve Hif2 $\alpha$ ) büyük öneme sahiptirler (Semenza, 1994). Bu proteinlerin stabilitesi, hidrosile olup olmamaları ile ilişkilidir. Hidrosilasyonda rol oynayan proteinler demir varlığında aktivitelerini göstermektedir. Ortamda demir az ise, Hif1 $\alpha$  ve Hif2 $\alpha$  hidrosilasyonu azalmakta ve stabiliteyi artmaktadır. Sonuç olarak demir metabolizmasında rol oynayan genlerin mRNA oluşumunu artırmaktadırlar (Shah vd., 2009). Enterosit hücrelerinde Hif2 $\alpha$  proteininin demir metabolizmasındaki transkripsiyona bağlı regülasyonu kontrol ettiği, Hif2 $\alpha$  geni silinmiş hayvan modelinde (Hif2 $\alpha$  Knocked Out (KO)) ve deferoksamin (DFO) kullanılarak

oluşturulmuş anemik Caco-2 hücrelerinde gösterilmiştir (Hu vd., 2010). Hipoksiya bağırsaktaki IRP/IRE mekanizmaları ile korale olarak çalışmaktadır.

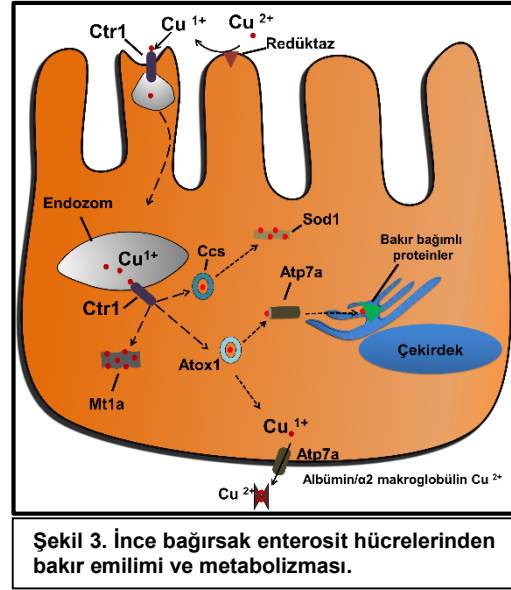
### 2.2.3 Bakır Mineraline Genel Bakış

Bakır minerali, vücut sağlığı için önemli olan birçok enzimin yapısında kofaktör olarak yer almakta ve bu enzimlerin fonksiyonları için gerekmektedir. Örneğin bağ dokulardaki kollajen ve elastin proteinlerinin formasyonunda rol oynayan enzimlerin aktivitelerinden sorumludur (Collins ve Klevay, 2011). Bakırın kalp hücrelerinin fonksiyonlarını yerine getirmesine etkili olduğu, bakır eksikliğinin kalp fonksiyonlarındaki düzensizlikler ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Klevay, 2000). Beyin hücrelerinde bulunan önemli enzimlerin (Tyrosinase, peptidylglycine  $\alpha$ -amidating mono-oxygenase, Cu/Zn superoxide dismutase, dopamine- $\beta$ -hydroxylase enzymes) fonksiyonları için gereklidir (Krebs ve Krawetz, 1993). Bakır eksikliği bu enzimlerin çalışmalarına etki ederek birçok fizyolojik olayda sağlık açısından istenmeyen sonuçlara neden olmaktadır (Scheiber vd., 2013).

Bağırsak enterosit hücreleri aracılığı ile günlük olarak 0.6-1,6 mg aralığında bakır vücut içine alınmaktadır. Yaklaşık olarak, normal bir insandaki bakır miktarı, 4,5 mg/kg vücut ağırlığı olarak tahmin edilmektedir (Prohaska ve Gybina, 2004). Bakır eksikliği, demir eksikliğine göre çok daha az oranda görülmesine rağmen erken müdahale edilmez ise ölüm ile sonuçlanmaktadır. Genellikle genetik olarak ortaya çıkan bakır eksikliğinde, bağırsaktan bakır emiliminin verimli bir şekilde gerçekleşmemesi sonucunda Menkes hastalığı ortaya çıkmaktadır (Tumer ve Moller, 2010). Bu hastalık bağırsaktan bakırın kana verilmesinden sorumlu transport protein (Atp7a) geninde yer alan mutasyon sonucu görülmekte ve doğum sonrası teşhis edilemediği takdirde ölüm ile sonuçlanmaktadır (Tumer ve Moller, 2010). Bakır mineralinin fazlalığı da vücutta istenmeyen sonuçlara neden olmaktadır. Bakırın karaciğerden kana verilmesinden sorumlu transport proteininin (Atp7b) tam olarak görevini yerine getirememesi, organ içerisindeki hücresel yıkıma neden olmakta ve karaciğer organ fonksiyonlarında bozulma gözlenmektedir. Bu hastalık literatürde Wilson's hastalığı olarak bilinmektedir (Sternlieb, 2000). Bu yüzden demirde olduğu gibi hücre içi bakır miktarı çok sıkı bir şekilde kontrol edilmelidir.

## 2.2.4 Enterosit Bakır Metabolizması

Bağırsak enterosit hücrelerinden bakır emilimi ve hücre içi bakır metabolizmasında yer alan proteinler Şekil-3 de özetlenmiştir. Besinlerde bulunan bakır, genellikle kuprik ( $\text{Cu}^{2+}$ ) formdadır. İlk olarak enterosit hücrelerinde bulunan redüktaz proteini tarafından bu formdaki bakır ( $\text{Cu}^{1+}$ ) formuna dönüştürülür (Wyman vd., 2008). Bu proteinin Dcytb olduğu düşünülse de bakırın indirgenmesinden sorumlu faktör tam olarak bilinmemektedir. Daha sonrasında enterosit hücrelerinin apikal tarafında (besinlerin ilk karşılaştığı kısım) bulunan bakır transport protein-1 (Ctr1) tarafından hücre içerisine endozom



Şekil 3. İnce bağırsak enterosit hücrelerinden bakır emilimi ve metabolizması.

kompleksi oluşturularak alınmaktadır (Sharp, 2003). Hücre içerisindeki serbest bakır toksik etkiye sahip olduğu için bakır, hücre içerisindeki hedef proteinlere ve organellere götürülür. Bakır minerali, bakır taşıyıcı protein (Ccs) ile süperoksid dismutaz proteinine (süperoksid dismutase, Sod1) götürülür (Kim vd., 2008). Diğer bir taşıyıcı protein olan antioksidant protein-1 (Atox-1) ile bakır Atp7a proteinine verilir (Prohaska ve Gybina, 2004). Atp7a proteini de bakır, bakıra bağımlı proteinlerin sentezi için golgi sistemine götürmekten sorumludur (Prohaska ve Gybina, 2004). Hücre içerisindeki bakır minerali sitozolik Metallothionein (Metallothionein 1a, Mt1a) proteini tarafından depolanır veya enterosit hücrelerinden kana Atp7a transport proteini ile verilir (Kim ve Petris, 2007). Kana geçen bakır burada kandaki oksijen ile oksidasyona uğrayarak  $\text{Cu}^{2+}$  formuna dönüştürülür ve albümin veya makroglobülin proteinleri aracılığı ile kandan vücuttaki organlara iletilirler (Prohaska, 2008).

## 2.2.5 Bakırın Fizyolojik Olarak Demir Metabolizmasındaki Bilinen ve Bilinmeyen Etkileri

Bakırın demir metabolizmasındaki etkisi ilk olarak 1930'lu yıllarda bakır eksikliğinin anemiye (cholorosis=green sickness) yol açtığı gözlenmesi ile ortaya çıkmıştır. Bu şekilde oluşan anemide demir takviyesinin faydası gözlenemez iken bu hastalarda ancak bakır takviyesinin anemiye düzelttiği gözlenmiştir (Sharp, 2004). Bakır eksikliğinin dünyada çok fazla görülmemesi nedeni ile normal şartlarda bakır eksikliğine bağlı anemi günümüzde yaygın olarak görülmemektedir. Bakır ve demir metabolizmalarının arasındaki fizyolojik ilişki

iki farklı dokuda çok iyi tanımlanmıştır. Bağırsak enterosit hücrelerindeki demirin oksidasyonundan ( $Fe^{+2} \rightarrow Fe^{+3}$  dönüşümü demirin transferin proteinine bağlanması için gerekli bir basamaktır) sorumlu protein, hephestin (Heph), bakırı yapısına alarak fonksiyonel olmaktadır (Fox, 2003). Yapılan sıçan çalışmasında diyete bağlı bakır eksikliğinin, demirin enterosit hücrelerinden kana salınmasını azalttığı ve demir eksikliğine neden olduğu bulunmuştur (Reeves ve DeMars, 2004). Diğer yandan Heph geninde mutasyon bulunan fare modelinde (Sla), farelerin doğum sonrası erken dönem içinde hafif anemik oldukları ancak bu durumun sonraki aylarda gözlenmediği belirtilmiştir (Vulpe vd., 1999). Diğer bir çalışmada ise enterosit hücrelerinde, demir oksidasyonundan sorumlu ve bakıra bağımlı olabilecek Heph'den farklı başka tanımlanamamış protein(lerin) olabileceği düşünülmektedir (Ranganathan vd., 2012; Gulec vd., 2014). Heph ile aynı fonksiyona sahip ve karaciğerde görev yapan seruloplazmin (Cp) proteini de bakıra bağımlı çalışmaktadır ve karaciğerde depolanan demirin salınması için bu protein gerekmektedir (Harris vd., 1995). Heph proteininde olduğu gibi bakır eksikliğinin Cp proteinin fonksiyonunu azaltarak, karaciğerden demir salınımını azalttığı gösterilmiştir (Broderius vd., 2010).

Düşük demir verilerek oluşturulan anemi durumunda (kontrol ve demir seviyesi düşük olan diyetlerde bakır seviyesi aynıdır) enterosit hücrelerinde ve kanda bakır miktarının arttığı gözlenmiştir (Ravia vd., 2005). Ancak bu artışın enterosit hücrelerindeki fizyolojik nedeni bilinmemektedir. Diyete bağlı demir eksikliği oluşturulmuş sıçan enterosit hücrelerinde bakırı bu hücrelerden kana veren transport proteini Atp7a gen ekspresyon seviyesinin anlamlı derecede arttığı gözlenmiştir (Ravia vd., 2005). Atp7a geni mutant hayvan modelinde (brindled), hemoglobin seviyesi düşük bulunmasına rağmen, bağırsak enterosit hücrelerinden anemik durumda demir emiliminde kontrol hayvan grubuna göre bir farklılık gözlenmemiştir (Gulec ve Collins, 2013). Bu fare modelinde bakır enjeksiyonu ile hayatta kalan yavruların, sistemik bakır miktarlarının az olduğu bulunmuştur ve bunun bir etkisi olarak aneminin ortaya çıkabileceği önerilmiştir. Diğer bir çalışmada, *in vitro* olarak Atp7a mRNA'sı ortadan kaldırılarak oluşturulan sıçan enterosit hücre modelinde, demir metabolizması çalışılmış ve demir metabolizmasında rol alan genlerin ekspresyon seviyelerinde ve regülasyonunda değişiklik olduğu gösterilmiştir (Gulec ve Collins, 2014). Özellikle enterosit hücrelerinde demiri hücre dışına veren Fpn1 geninin mRNA seviyesinin arttığı ve bu artışın transkripsiyon düzeyinde olduğu bulunmuştur. Atp7a protein miktarının bu hücrelerde azaltılması, hücre için bakır miktarını artırmaktadır. Fpn1 gen regülasyonundaki artış direk Atp7a proteininin eksikliğinden gelebileceği gibi, hücre içi bakır mineral artışından da kaynaklanabilir. Ancak bu etkinin moleküler mekanizması tam olarak bilinmemektedir (Gulec ve Collins, 2013). Demir eksikliğinin neden olduğu hipoksik koşulda,

enterosit hücrelerinde demir ve bakır metabolizmalarında görev alan bazı genlerin koordineli olarak benzer regülasyon gösterdiği bulunmuştur (Xie ve Collins, 2011). Bu da demir eksikliğine bağlı aneminin enterosit hücrelerindeki demire ve bakıra bağımlı mekanizmaları etkilediği ve bakır mineralinin de demir eksikliğine bağımlı regülasyonda rol oynayabileceğini düşündürmektedir.

Bu çalışmalar bakırın anemiye bağımlı demir metabolizmasına etkisinin olabileceğini işaret etmesine rağmen hala bilinmeyen mekanizmaların olduğunu da göstermektedir. Diğer önemli bir nokta ise anemik durumda, besinlerden gelen veya kanda bulunan bakırın, enterosit hücrelerindeki demir metabolizmasına farklı şekilde olası bilinmeyen etkilerinin araştırılmasıdır. Aneminin oluşmasında, besinlerden gelen demirin vücuda tek giriş noktası olan enterosit hücreleri büyük öneme sahiptir. Bu yüzden bu çalışmada, bakırın anemik koşulların oluşturulduğu enterosit hücrelerindeki demir metabolizmasına etkisi moleküler ve genetik düzeyde araştırılmıştır.

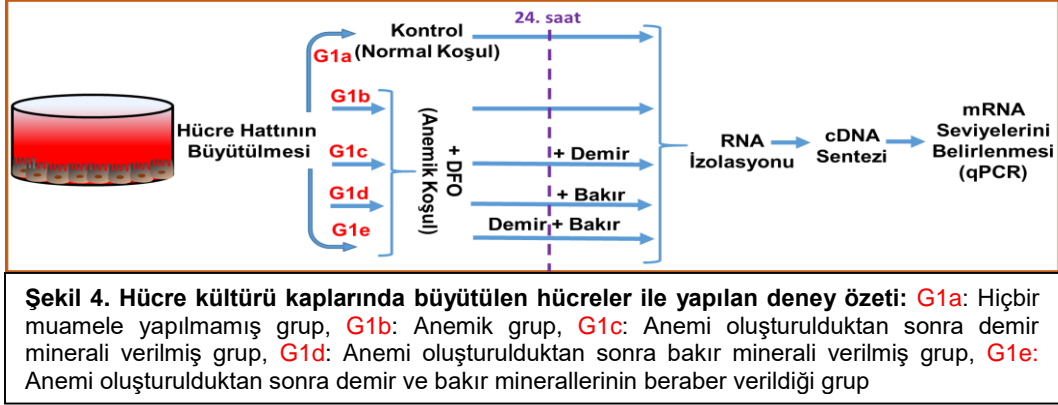
### 3. YÖNTEM

Bu projede izlenen yöntemler iki başlık altında toplanmıştır. İlk kısımda, bakır mineralinin anemi oluşturulmuş hücrelerdeki moleküler ve genetik regülasyona olan etkisi araştırılmış ve ikinci kısımda ise insan bağırsak sistemi oluşturulmuş in vitro hücre modelinde, diyetten gelen ve kandaki bakırın etkileri modellenerek ayrı ayrı test edilmiştir. Bu projede kullanılan tüm açıklayıcı şekiller yürütücü tarafından hazırlanmıştır, aksi şekillerin altında belirtilmiştir.

#### 3.1 BAKIRIN ANEMİK DURUMDA, DEMİR METABOLİZMASINA ETKİSİNİN MOLEKÜLER VE GENETİK DÜZEYDE BELİRLENMESİ

Bu kısımda yapılan deneysel aşamalar aşağıdaki şekilde özetlenmiştir. Genel hatları ile hücreler 12 bölmeli hücre kültür kaplarında büyütülüp farklılaştırılmıştır. Sonrasında demir eksikliğine bağlı anemik koşullar oluşturulup demir ve bakır muameleleri yapılmıştır. Bu aşamalar detaylı bir şekilde aşağıda açıklanmıştır.





### 3.1.1 Hücre Kültürü Çalışmaları

Enterosit hücrelerinin direk olarak bağırsak dokusundan alınarak kısa bir zaman diliminde ex vivo olarak kullanılmasının zorluğundan dolayı, oluşturulacak kültüre edilebilen ve uygun koşullar içinde metabolik olarak aktif olan alternatif hücre modelleri önem kazanmıştır. Yapılan çalışmalar sonucunda Caco-2 hücre modeli, yaklaşık 21 gün boyunca uygun koşullarda kültüre edildiğinde, insan bağırsak enterosit hücresine fonksiyonel, metabolik ve biyolojik aktivite özellikleri olarak büyük oranda benzerlik gösterdiği anlaşılmıştır (Sambuy vd., 2005). Ulaşılabilir hücre modellerine bakıldığında normal insan enterosit hücre modellerine hemen hemen hiç rastlanmamaktadır. Bu yüzden insan enterosit modeline en yakın hücre modellerin bulunması önemlidir. Diğer kolon karsinoma hücre hatları ile karşılaştırıldığında, Caco-2 hücre hattının, besin metabolizma çalışmaları için daha iyi morfolojik ve fonksiyonel özelliklere sahip olduğu gösterilmiştir (Chantret vd., 1988). Caco-2 hücre modeli besin (Yin vd., 2014), ilaç (Wilson, 1990) ve fonksiyonel maddelerin etkileri ile ilgili çalışmalarda (Satake vd., 2002), enterosit demir ve bakır metabolizmalarında sıklıkla kullanılan in vitro hücre tipidir (Han ve Wessling-Resnick, 2002; Linder vd., 2003; Chicault vd., 2006; Zhu vd., 2006; Pourvali vd., 2012).

Caco-2 hücreleri için, 20% sığır serumu, 1% penisilin-streptomisin, 1% esansiyel olmayan amino asit karışımı, 1% sodyum purivat içeren MEM (Essential Media) besi yeri kullanılmıştır. Hücreler, laboratuvarda 100 mm çaplı hücre kültürü kaplarında, 1.000.000 hücre/ 10 mL hazırlanmış besi yerinde, 37 °C nemli atmosfer altında, %5 CO<sub>2</sub> içeren hücre inkübatöründe büyütülmüştür. Gerekliğinde kullanılmak üzere, sıvı azot içinde hücre stokları yapılarak saklanmıştır. Deney için kullanılan hücre pasaj sayısı (hücrelerin %95 oranında büyüdükten sonra, her bir yeni besi yeri içeren hücre kültürü kaplarına alındığındaki sayı) 20-30 arasında tutulmuştur.

### 3.1.2 Hücre Hattının Hazırlanması

Gen ekspresyon seviyelerinin belirlenmesi için kullanılacak hücreler standart hücre kültürü kaplarında büyütülmüştür. Bunun için, 10.000 hücre/bölme olacak şekilde 12 bölmeli hücre kültürü kabı kullanılmıştır. Hücreler yüzeyi tamamen kapladıktan sonra her iki günde bir, eski hücre besi yeri değiştirilip yeni besi yeri eklenerek bu işlem 21. güne kadar devam etmiştir. Daha sonrasında demir eksikliğine bağlı anemik koşullar oluşturulmuştur.

### 3.1.3 Demir Eksikliğine Bağlı Anemik Koşulların Oluşturulması ve Demir, Bakır Mineralleri ile Hücrelerin Muamele Edilmesi

Demir eksikliğine bağlı anemi, demiri bağlayan kimyasal ajan (Deferoksamin, DFO) kullanılarak oluşturulmuştur. DFO, demir metabolizmasında anemik koşul için kullanılan çok yaygın bir moleküldür (Zerounian ve Linder, 2002; Hu vd., 2010). DFO, ortamdaki demiri hücre için kullanılamayacak duruma getirir ve hücreler bu oluşturulan ortamda demir minerali yokmuş gibi anemik fenotipi göstermektedirler. Hücreler 21. günlük bekleme süresine geldiklerinde, daha önce farklı bir çalışmada kullanılan oranda 200  $\mu$ M DFO eklenerek 24 saat süre ile muamele edilerek demir eksikliği şartları oluşturulmuştur. 24. saatten itibaren ortama 100  $\mu$ g/mL demir (FAC, Ferrik Amonyum Sitrata formunda), 100  $\mu$ M bakır ( $\text{CuCl}_2$ , Bakır (II) Klorür formunda) minerali ve demir-bakır mineralleri beraber eklenerek 18 saatlik inkübasyona bırakılmışlardır. Demir olarak FAC formunun seçilmesinin nedeni bu formun fizyolojik şartlara uygun olması ve daha önceki çalışmalarda kullanılmasıdır (Hu ve ark., 2010). Menkes hastalığının görüldüğü hayvan ve insanların hayatta kalabilmesi için  $\text{CuCl}_2$  kullanılmasından dolayı deneysel olarak kullanılan bakır bu formda seçilmiştir (Gulec ve Collins, 2013). Mineral muamelelerinden sonra RNA izolasyonu, cDNA sentezi yapılmış ve bu aşamayı takiben qPCR yöntemi ile deneysel gruplar arasındaki mRNA seviyelerindeki farklılıklar hesaplanmıştır.

### 3.1.4 Örneklerden RNA İzolasyonu

RNA örnekleri, RNase enzimi ile çok kolay bir şekilde degrade olan (parçalanabilen) bir yapıya sahiptir. RNA örneklerinin degrade olması, diğer aşamalarda deneyleri ve sonuçları etkileyebilmektedir. Bunun önüne geçebilmek için, RNase enzimlerini inaktif eden 'RNase Free' solüsyonu ile tüm malzemeler muamele edilmiştir. Bunun yanında RNA

izolasyon aşamasında hücresel örnekler, düşük sıcaklıkta ( $\sim 4^{\circ}\text{C}$ ) muhafaza edilerek çalışılmış ve tüm gerekli örnekler  $-80^{\circ}\text{C}$ ' de saklanmıştır.

RNA izolasyonu, RNAzol kimyasalı kullanılarak ve firma protokolü (MRC. Inc.) takip edilerek yapılmıştır. Genel olarak, örnek başına 1mL RNAzol muamele edilerek hücrelerin yüzey ile ilişkisi kesilip, parçalanmıştır. Daha sonra parçalanmış hücre popülasyonu içeren RNAzol solüsyonu, steril bir tüpe aktarılarak üzerine 400 uL steril su konup 15 saniye kadar çalkalanıp oda sıcaklığında 10 dakika bekletilmiştir. Bunu takiben, 12.000g hızda 15 dakika santrifüj yapılmıştır. Yaklaşık 0,750 mL süpernatant kısmından alınarak üzerine 0,750 mL %75'lik etanol eklenmiştir. Daha sonra, 12.000g hızda, 10 dakika santrifüj yapılmış ve elde edilen beyaz renkli RNA pelleti iki defa daha 1 mL etanol ile 500g hızda, 2 dakika süresince santrifüj yapılmıştır. Sonra etanol uzaklaştırılıp, RNA pelleti üzerine yaklaşık 40  $\mu\text{L}$  steril su konularak çözülmüş ve gen mRNA ekspresyon seviyelerinin belirlenmesi için cDNaya çevrilmiştir.

### 3.1.5 cDNA Sentezi ve Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qPCR)

Elde edilen RNA örnek kalitesi %2'lik agaroz jelde belirlenmiştir. Basitçe, örnek başına 2  $\mu\text{g}$  RNA ile glyoxal kimyasalı, bire bir hacimde karıştırılmış ve 30 dakika,  $50^{\circ}\text{C}$ 'de inkübe edilmiştir. Daha sonra, örnekler oda sıcaklığına getirilip agaroz jele yüklenmiş ve UV ışık kaynağı altında RNA fragmentleri görüntülenmiştir. 18S ve 5S RNA bantlarına bakılarak, RNA degradasyonunun olup olmadığına (eğer RNA parçalanmışsa jelde simir ve düzgün tek bir bant şeklinde görülememektedir) bakılmıştır. Örneklerdeki, RNA konsantrasyonu, 260 nanometre dalga boyunda ölçülüp her bir örnekten 1  $\mu\text{g}$  olacak şekilde cDNA (komplementer RNA) reaksiyonu için kullanılmıştır.

cDNA reaksiyonu, izole edilmiş tek iplik RNA fragmentlerinin tamamlayıcı zincir sentez işlemi olarak tanımlanabilir. Basitçe, RNA örnekleri, poly-A nükleotidi ve küçük altı bazlık nükleotit primerleri içeren cDNA sentez solüsyonu (enzim ve gerekli kofaktörleri içermektedir) ile 20  $\mu\text{L}$  'lik hacimlerde uygun sıcaklık değişimlerine bağlı olarak sentezlenmiştir. Daha sonra spesifik genlerin ekspresyon seviyesine bakmak için, mRNA sekans dizisine özgü primerler tasarlanmıştır. Bu işlem için referans sekans dizileri '<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>' web sayfasından alınmış ve ücretsiz olarak internet ortamında bulunan '<http://www.premierbiosoft.com/netprimer>' programı kullanılarak, RNA spesifik primerler dizayn edilmiştir. Ayrıca gerektiğinde daha önceki çalışmalarda kullanılan

primerlerden de yararlanılmıştır. İsmarlanan primerler firmadan alındıktan sonra, belli dilüsyonlardaki RNA örnekleri klasik ‘SYBR Green’ metodu (Arya ve ark., 2005) kullanılarak qPCR (kuantitatif polimeraz zincir reaksiyonu) yöntemi ile verimli şekilde çalışıp çalışmadıkları test edilmiştir.

Deneysel gruplar arasındaki mRNA gen ekspresyon seviyeleri ‘SYBR Green’ metodu ile qPCR cihazı kullanılarak belirlenmiştir. Genel olarak çok fazla kullanılan bu metot, floresan özellikteki yeşil renkli boyanın çift iplikli nükleotit fragmentine bağlanması ve bu fragmentin yüksek sıcaklıkta denatüre olması sonucu bu boyanın nükleotit birlikteliğinden ayrılarak floresan ışımaya vermesi ve bunun qPCR cihazı tarafından yakalanıp sayısal bir değer olarak belirlenmesi ile hesaplanır. Sonuçta, gen ekspresyon seviyesi relatif olarak belirlenmiş olur. Ct (cihazın mRNA fragmentinden gelen floresan sinyali gördüğü anda verdiği sayısal değer) değerleri her bir örnek için alınmış ve daha sonra  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  analiz metoduna göre (Gulec ve Collins, 2014) hesaplanıp örneklerdeki mRNA seviyeleri karşılaştırılmıştır. Bu çalışmada normalizasyon için cyclophilin gen mRNA’sı kullanılmıştır.

### 3.1.6 Ekspresyon Seviyeleri Araştırılacak Genlerin Demir Metabolizması ile İlişkileri

Bu proje hedefleri doğrultusunda, demir ve bakır metabolizmasında regüle olan genlerin seviyelerine bakılmıştır. Bunların dışında, demir eksikliğine bağlı olarak oluşan hipoksik sinyalin hücrelere demir ve bakır verildiğinde nasıl değiştiği, regülasyonu en iyi bilinen bakır genler için, ankyrin repeat domain 37 (Ankrd37) ve prolyl 4-hydroxylase (P4ha1), Hif prolyl hydroxylase 3 (Egln3) mRNA seviyelerine bakılarak bakırın hipoksiya üzerindeki etkisi araştırılmıştır (Hu vd., 2010). Aşağıdaki tabloda bu çalışmada araştırılmış genler özetlenmiştir.

Demir Metabolizması	Bakır Metabolizması	Hipoksiya
Cybrd1 (Dcytb)	Ctr1	Ankrd37
Dmt1	Atox1	P4ha1
Ftn	Ccs	Egln3
Fpn	Mt1a	
Tfr	Atp7a	
Heph	Sod1	

## **3.2 SİSTEMİK (KANDAKİ) VEYA DİYETSEL BAKIRIN DEMİR METABOLİZMASINDAKİ ETKİSİNİN İN VITRO OLARAK TEST EDİLMESİ**

Bu kısımda izlenen yöntemler kısaca aşağıdaki şekilde özetlenmiştir. Bu bölümde Caco-2 hücreleri özel büyütme şartlarında geliştirilerek insan ince bağırsak sistemi modellenmiştir. Daha sonrasında, diyetten gelen veya kanda bulunan bakır mineralinin polarize olmuş anemik hücrelerdeki etkisi araştırılmıştır.

### **3.2.1 İnsan Bağırsak Sisteminin Modellenmesi ve Hücre Bariyer Sisteminin Oluşturulması**

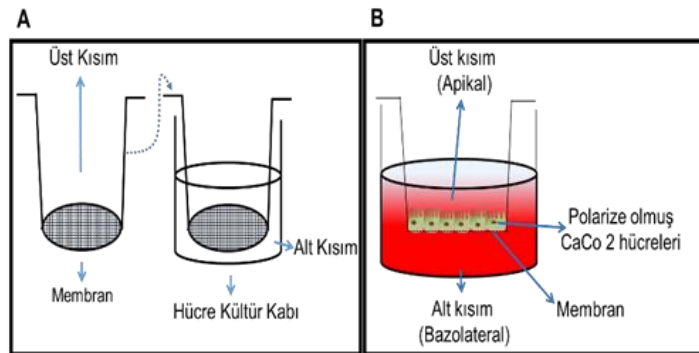
3.1’de belirtildiği gibi insan bağırsak modeline en yakın in vitro model olarak Caco-2 hücre hattı kullanılmaktadır. İnsan vücudundaki bağırsak dokusuna ait emilimden sorumlu enterosit hücrelerinin en önemli özelliklerinden bir tanesi kutuplaşarak polarize olmalarıdır. Yani gıdalardan gelen besinleri alan transport proteinler (importers, alıcılar) hücrenin bir kutbunda, bu besinleri kana veren transport proteinler (exporter, vericiler) ise diğer kutupta lokalize olmuştur. Caco-2 hücre hattını ön plana çıkaran özelliklerden bir tanesi de bu hücrelerin özel membran yüzeylerde ve ideal koşullarda 21 gün süre ile bekletildiğinde polarize olmalarıdır. Polarize olan hücreler, insan ince bağırsak sisteminde olduğu gibi apikal (besinlerin ilk temas ettiği lümen kısmı) ve bazolateral (vücut içine açılan kan damarları ile temas eden kısım) bölgeler olarak özelleşmektedirler (Hidalgo vd., 1989). Bu özelliklerinden dolayı in vivo koşullar için hedeflenen çalışmalar öncesinde en yaygın kullanılan in vitro sistemdir. Örneğin bu hücre sistemi, bebeklere ait yardımcı besinleri içeren gıdaların geliştirilmesinde (Glahn vd., 1999), ilaç firmalarının insanlar için demir takviyelerinin oluşturmasında (Glahn vd., 2000) kullanılmıştır. Diğer bir demir emiliminin yapıldığı çalışmada Caco-2 transport hücre sisteminin insan bağırsak demir emilim parametreleri ile anlamlı derecede korale olduğu belirtilmiştir (Yun vd., 2004). Bu çalışmalar bu projede kullanılan in vitro sistemin in vivo koşullar için uygun olduğunu göstermektedir.

Membranda büyütülen hücre sistemi yukarıdaki şekilde gösterildiği gibi deneysel sistemi iki bölüme ayırmıştır. Üst kısım besinlerin geldiği, alt kısım ise besinlerin kana geçtiği bölüm olarak modellenmiştir. Bu model, demir ve bakır metabolizmalarını içeren bilimsel çalışmalarda in vivo insan bağırsak sistemi için tanımlanmış alternatif in vitro sistem olarak kullanılmaktadır (Alvarez-Hernandez vd., 1991; Louvard vd., 1992; Nunez vd., 1994; Han ve Wessling-Resnick, 2002; Linder vd., 2003). Ayrıca bu hücre büyütme sistemi vücut

içerisindeki organ sistemlerinin metabolik olarak etkileşimleri için de modellenmiştir. Örneğin membran üzerine Caco-2 hücreleri ve hücre kültür kabının alt yüzeyine ise HepG2 (karaciğer hücre modeli) hücreleri konulup büyütülerek bağırsak ve karaciğer organlarına ait sistemik etkileşimin araştırıldığı çalışmada kullanılmıştır ve fizyolojik çalışmalar için önemli bir in vitro model olduğu belirtilmiştir (Scheers vd., 2014).

Bağırsak demir Emilimi karaciğer tarafından kontrol edilebilmektedir. Kandaki demir seviyesi ile ters orantılı olarak karaciğer tarafından hepcidin proteini üretilmektedir. Bu protein genetik olarak birçok sistemik faktör tarafından kontrol edilmektedir. Kandaki demir miktarı arttığında hepcidin proteini, kana bağırsaktan gelen demir Emilimini azaltmakta veya demir eksikliğinde bu protein karaciğerde üretimini düşmekte ve bağırsak enterosit hücrelerinden demir Emilimi artmaktadır (Ganz ve Nemeth, 2012). Bu etki düşünüldüğünde enterosit demir metabolizması, sistemik faktörlerin etkisi altındadır ve bağırsak enterosit hücresine spesifik in vivo çalışmalar buna bağlı olarak zorlaşmaktadır. Bu durumda da in vivo koşulların oluşturulabileceği in vitro sistem(ler) ön plana çıkmaktadır. Bu projede enterosit odaklı bir çalışma olmasından dolayı in vivo sisteme en yakın hücre ve büyüme yöntemi olarak Caco-2 hücre bariyer sistemi seçilmiştir.

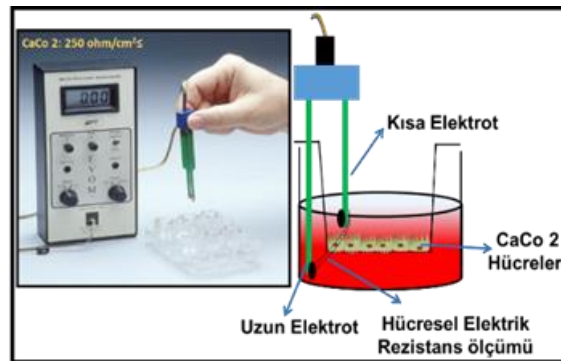
DeneySEL hücre hattı hazırlanırken kullanılan malzemeler ve yöntem bu bölümde belirtildiği şekilde A ve B kısımlarında kısaca gösterilmiştir. Hücrenin büyütüldüğü sistem, iki parçadan oluşmaktadır. Birinci parça, hücrelerin tutunmasına yardımcı kollajen proteini ile kaplı, 0,4 mikron büyüklüğünde porları, 12 mm çapında polytetrafluoroethylene malzemesinden oluşan bir membran ve bu membranın yerleştiği bir hücre kültür kabından meydana gelmektedir.



**Şekil 5. Hücre büyütülmesinde kullanılan sistem**

Deneysel hücreler hazırlanırken, ilk olarak membran üzerine 10.000 sayısında olacak şekilde Caco-2 hücreleri konulmuştur. Üst taraftaki kısma 500 µL alt kısma ise 1,5 mL hazırlanmış besi yeri ilavesi sonucunda hücrelerin büyümeleri mikroskopta düzenli olarak kontrol edilmiştir. Hücrelerin membranın tüm yüzeyini kaplaması için gerekli süre (yaklaşık 3 gün) beklenmiştir. Daha sonra, hücrelerin farklılaşması için toplam 21 gün süresince hücreler bu ortamda, düzenli zaman periyotlarında (her 2 günde bir) besi yerleri yukarıda verilen hacimlerde, yeni besi yeri ile değiştirilmiştir. Bu model tam olarak insan ince bağırsak sistemini taklit ederek, araştırılan olası aktif moleküllerin transportunda en yaygın olarak kullanılan hücre modelidir (Meunier vd., 1995; Delie ve Rubas, 1997; Failla vd., 2008). Bu sistemde, üst taraf apikal (lümen veya besinlerin mideden gelerek bağırsak ile ilk temas ettiği kısım) ve alt taraf ise bazolateral (besinlerin emildikten sonra kana verildiği kısım) olarak tanımlanmaktadır.

Hücre bariyer sisteminin tam olarak istenilen düzeyde olup olmadığının takibi çok önemlidir. Hücrelerin tek bir sıra halinde boşluksuz bir yapı ve şekilde olup olmadığı, hemen hemen birçok çalışmada kullanılan (Hidalgo vd., 1989) hücre elektriksel bariyer direnci (trans epithelial electrical resistance (TEER))' ne bakılarak karar verilmiştir (ölçümün genel olarak nasıl yapıldığı şekilde gösterilmiştir). Bu ölçümü yapan cihaz, farklı uzunlukta iki ucu olan bir elektroda sahiptir. Bu elektrotun uzun olan ucu, hücrelerin bazolateral kısmının baktığı tarafa, kısa ucu ise apikal kısmının baktığı tarafa yerleştirilmiştir. Hücrelerin oluşturduğu bariyer direnci (TEER) ohm cinsinden cihaz tarafından ölçülmüştür. Bu değerin Caco-2 için en az 250 ohm/ cm<sup>2</sup> olduğu belirtilmiştir ve bu değere hücre inkübasyonunun ortalama olarak 4 günden başlayarak ulaşıldığı (Liang vd., 2000) ve TEER değerinin 21-25. günlerde yaklaşık 900-1200 ohm/ cm<sup>2</sup> kadar çıktığı gözlenmiştir (Louvard vd., 1992).

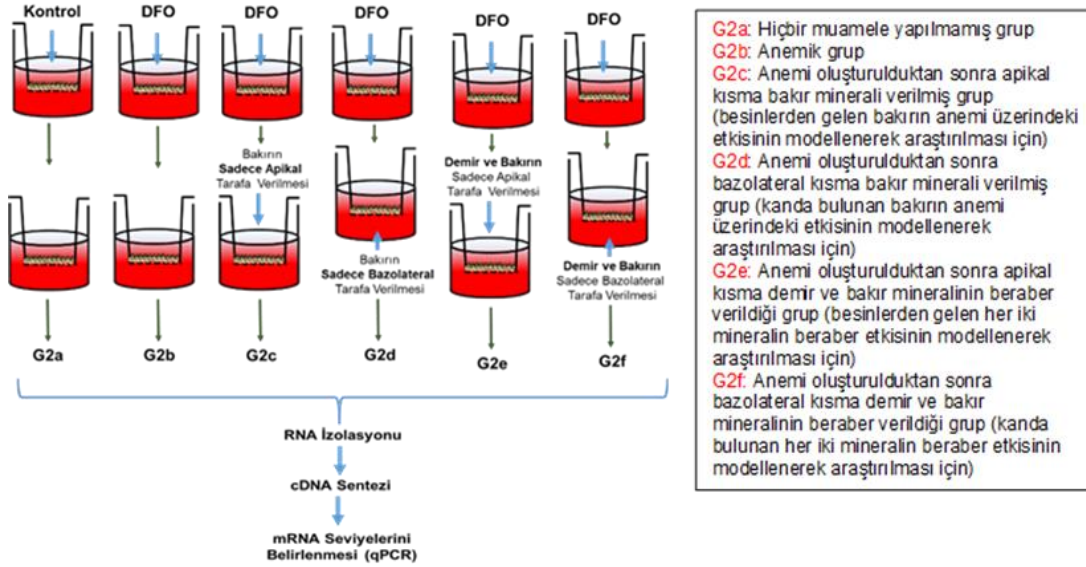


Cihazla ait resim [www.wpiinc.com](http://www.wpiinc.com) web adresinden alınmıştır.

Şekil 6. Hücre elektriksel bariyer direnci (trans epithelial electrical resistance (TEER)) ölçümü

### 3.2.2 Demir Eksikliğine Bağlı Anemik Koşulların Oluşturulması ve Bakır Minerali ile Hücrelerin Muamele Edilmesi

Membran üzerinde büyütülmüş ve farklılaşmış hücreler 21. güne ulaştığında hem apikal hem de bazolateral bölümlere, 3.1’de belirtilen miktar ve sürelerde DFO ve  $\text{CuCl}_2$  muameleleri yapılmıştır. Daha sonrasında ise yöntem 3.1’de anlatıldığı gibi RNA izolasyonu, cDNA sentezi ve takiben 3.1’de belirtilen hedef genler için qPCR metodu kullanılmıştır. Bu deneyin amacı, diyetten gelen veya kanda bulunan bakırın olası dengeleyici ve düzeltici etkisinin, yukarıda anlatıldığı gibi oluşturulmuş insan ince bağırsak modelinde test edilmesidir. Buna ilaveten G2c ve G2d gruplarda bulunan örnekler için gen ekspresyon seviyeleri karşılaştırılarak diyetel ve kandaki bakırın olası etkileri arasındaki farkın ortaya çıkarılmasıdır.



Şekil 7. Membran sisteminde büyütülen hücreler ile yapılan deney özeti

### 3.2.3 İstatistik

Proje kapsamında yapılan analizler, birbirinden bağımsız deney olarak en az 3 defa ve her bir deneyde de en az 3 deneysel tekrar olacak şekilde yapılmıştır. Projeye ait tüm analizlerin ve figürlerin hazırlanmasında, GraphPad Prism (versiyon 5.0) programı kullanılmıştır. İki gruba ait örneklerin karşılaştırılmasında her bir gruba ait ortalama değerler, student t-test metodu kullanılarak karşılaştırılmıştır. İki veya daha fazla grup birbiri ile karşılaştırılırken ‘Tek yönlü varyans analizi (one-way ANOVA)’ testi ve ‘Tukey’ yardımcı test kullanılmıştır. Grafik sonuçları ortalama  $\pm$  SD olarak verilmiştir

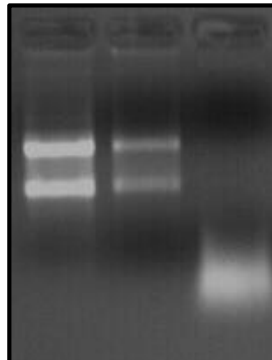


#### 4. BULGULAR VE TARTIŞMA

Demir eksikliğine bağlı anemi, tüm dünyada görülen besin eksikliğine bağlı problemler arasında ilk sırada yer almaktadır. Genel olarak demir, hemoglobinin yapısında bulunan 'heme' proteinine bağlanarak oksijenin vücutta taşınmasını sağlamanın yanında enerji üretimi, hücre bölünmesi gibi biyolojik görevleri de üstlenmiştir (Knutson ve Wessling-Resnick, 2003). Demirin vücuttaki önemi düşünüldüğünde, vücut içerisindeki demir miktarının gerekli düzeyde tutulması önemli bir gereklilik olarak karşımıza çıkmaktadır. Demirin vücuttan atılması adına memelilerde aktif bir sistem bulunmaması, ince bağırsaktan demir emiliminin önemini ortaya çıkarmıştır. Yapılan çalışmalarda bakır minerali eksikliğinin anemiye neden olduğu ve aneminin sadece bakır verildiğinde ortadan kalktığı gözlenmiştir (Fox, 2003). Bunun yanında son yapılan araştırmalarda, demir eksikliğinin gözlemlendiği durumlarda, hücre içerisindeki bakır minerali seviyesinin arttığı bulunmuştur ve bunun bakırın anemiyi önlemek adına koruyucu bir görevi olduğu düşünülmektedir (Gulec ve Collins, 2014). Ancak bunun fizyolojik nedeni tam olarak ortaya konamamıştır. Bu sunulan projede temel olarak, anemi durumunda vücutta bulunan (kandaki bakır) veya diyetle alınan bakırın ayrı ayrı olası etkilerinin ince bağırsaktaki anemiyi önleyici özellikleri genetik düzeyde araştırılmıştır. Bunun için özel membranda büyütülen polarize olmuş hücre hattı ve insan bağırsak sistemi *in vitro* olarak modellenmiştir.

##### 4.1 RNA İzolasyonu Kalitesinin Belirlenmesi ve Primer Çalışma Verimliliğinin Test Edilmesi

RT-qPCR çalışmalarında, çalışma gruplarından izole edilen RNA örneklerinin kalitesinin belirlenmesi sonuçların doğruluğu yönünden çok önemlidir. Klasik olarak kullanılan spektrofotometrik yaklaşım örneklere ait miktarsal değerleri verirken örneğin degradasyonu hakkında net bir bilgi verememektedir. Bu nedenle deneysel örnekler tek bir grup altında birleştirilip agaroz jelde yürütülmüş ve RNA izolasyon kalitesinin kontrolü yapılmıştır. Elde

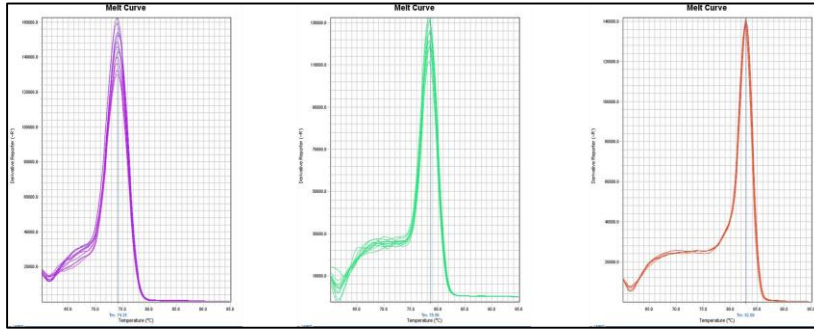


**Şekil 8. RNA izolasyon verimliliğinin ve RNA kalitesinin belirlenmesi.** Deneysel gruplardan elde edilen RNA örnekleri 200ng olacak şekilde tek bir grup olarak 2 µg ve 0.5 µg olacak şekilde jele yüklenmiştir. Ayrıca oda sıcaklığında bekletilmiş RNA örneğinde degradasyonun gösterilmesi adına deneye eklenmiştir.

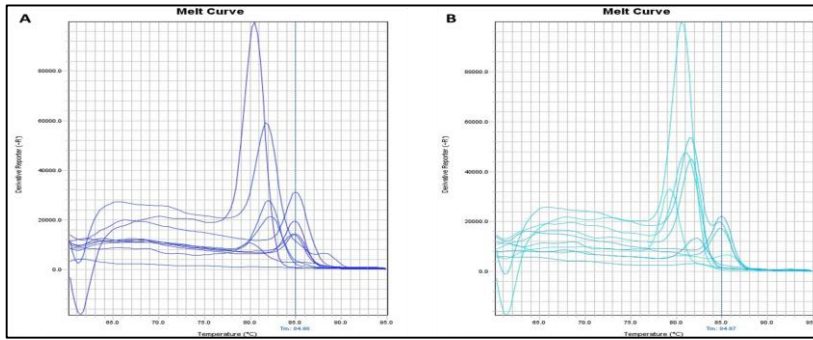
edilen örneklerin birçok gen için test edilecek olmasından dolayı tüm örnekler eşit konsantrasyonda alınarak tek bir grup olarak birleştirilmiştir. Daha sonra örnekler jelle iki farklı konsantrasyonda yüklenmiştir. Degredasyonu göstermesi adına 2 gün süre ile oda sıcaklığında bekletilmiş RNA örneği de deneye eklenmiştir (Şekil 8). Şekil-8’ de görüldüğü gibi RNA örneklerine ait bantlar net bir şekilde görülürken, degrade olmuş RNA örneğinde alt kısımda tek simir şeklinde bir bant gözlenmiştir. Bu jel sonucuna bağlı olarak RNA izolasyon metodunun ve elde edilen örneklerin daha sonraki aşamalarda kullanılabilirliği ortaya konmuştur. Bunun yanında örnek kalitesi ve RT-qPCR çalışma verimliliği elde edilen sonuçlardaki ( $C_T$ ) değerleri yakından izlenerek kontrol edilmiştir.

Primerlerin RT-qPCR sisteminde çalışma verimliliği kontrol edilirken, RT-qPCR protokolünde yer alan ve primerlerin hedef mRNA’ları tanıyıp tanımadıklarını ve spesifik olmayan başka dizilere bağlanıp bağlanmadıklarını kontrolü için “Melting Curve” denilen aşamadan yararlanılmıştır ve projede yapılan her RT-qPCR deneyi için bu aşama protokole eklenmiştir. Bazı genler için “Melting Curve” sonuçları Şekil 9’da gösterilmiştir. Şekilde görülen *Fpn*, *Atp7a* ve *Egln3* primerleri için tek tip pik gözlenirken bu tek tip pikler primerlerin spesifik olarak hedef dizilere bağlandığını göstermektedir. Bunun yanında proje kapsamında çalışılması planlanan genlerden *P4ha1*, *Dcytb* ve *Mt1a* ve primerleri için ‘Melting Curve’ analizleri incelendiğinde problemler yaşanmış ve farklı firmaya yeniden ısmarlanan primerlerde de sorun çıkmıştır. Son olarak yakın zamanda alternatifli yeni primerler sipariş edilmiştir. Proje teslim süresi bitiminden önce 3. defa ısmarlanan primerler elimize geçmediğinden dolayı bu üç gen için sonuçlar verilememiştir. Ancak elimizdeki örneklerle yeni primerler kullanılarak deneyler yapılacaktır. Sonuçlar hazırlanmakta olan makaleye bu üç gen için eklenecektir. Ayrıca anemi durumunda bakır mineralinin demir ve hipoksiya üzerindeki etkilerinin araştırılmasında diğer analizi yapılan genlerin proje için doğru yorumların yapılması adına yeterli olduğunu düşünmekteyiz.

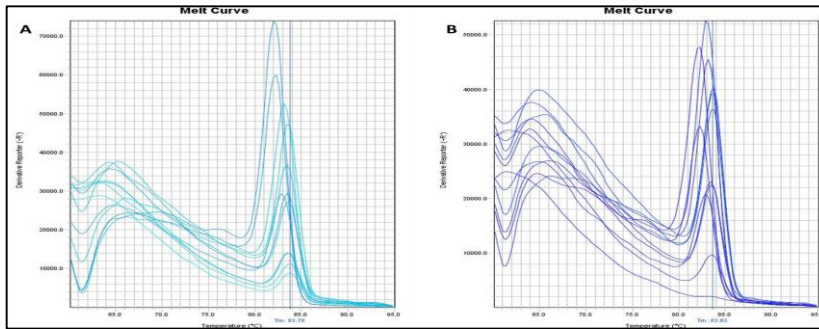
**A**



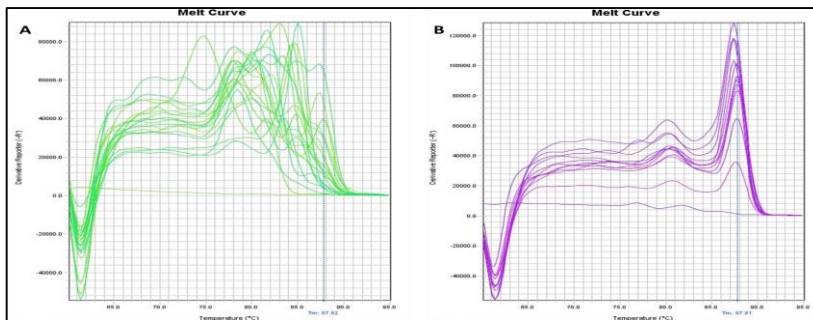
**B**



**C**



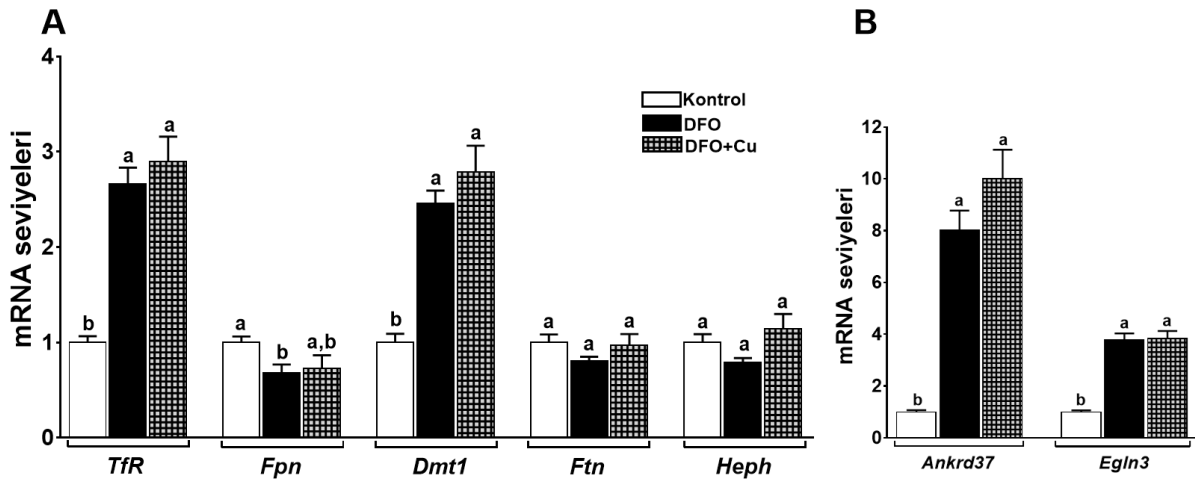
**D**



**Şekil 9.** Seçilen bazı primerlere ait 'Melting Curve' sonuçları. Fpn, Atp7a ve EglN3 primerlerine ait 'Melting Curve' analiz pikleri (A). İki farklı firmadan ısmarlanan *P4ha1* primerleri için 'Melting Curve' analiz pikleri (B). İki farklı firmadan ısmarlanan *Dcytb* primerleri için 'Melting Curve' analiz pikleri (C). İki farklı firmadan ısmarlanan *Mt1a* primerleri için 'Melting Curve' analiz pikleri (D). *P4ha1*: Prolyl 4-hydroxylase subunit alpha 1, *Dcytb*: Duodenal cytochrome b, *Mt1a*: Metallothionein 1a.

## 4.2 Hücre Kültürü Kaplarında Büyütülen Anemik Caco-2 Hücrelerinde Bakır Mineralinin Anemi Durumunda Demir Metabolizmasında ve Hipoksiyadaki Etkisinin Genetik Düzeyde İncelenmesi

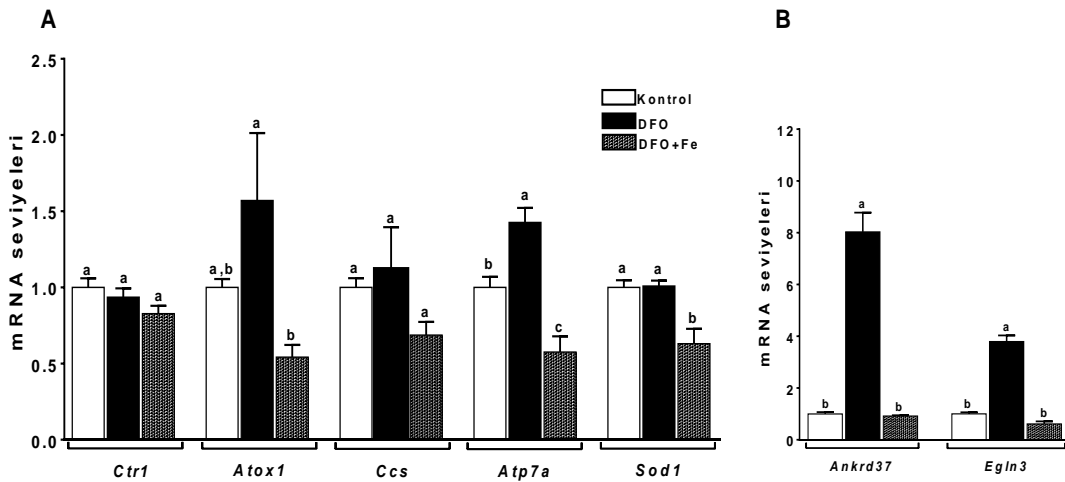
Projemizde, anemik Caco-2 hücrelerinde Fe ve Cu minerallerinin ayrı ayrı ve beraber verildiği durumlarda gen regülasyonlarındaki değişimi incelenmiştir. Bu kısımda Caco-2 hücreleri çok yaygın olarak kullanılan 12 bölmeli hücre kültürü kaplarında 21 gün boyunca büyütüldü ve anemi oluşturulduktan sonra bakır mineralinin ince bağırsak demir metabolizmasında ve hipoksiyada rol oynayan genlerin mRNA seviyelerindeki değişimler incelendi (Şekil 10A ve 10B). Sonuçlara bakıldığında DFO verildiğinde oluşan anemi *TfR*, *Dmt1* genlerinin regülasyonunu anlamlı derecede artırırken *Fpn*, *Ftn* ve *Heph* genlerine ait mRNA seviyeleri DFO verildiği durumda artmamıştır. Bunun yanında anemiye bağlı olarak oluşan hipoksiya, *Ankrd37* ve *Egln3* mRNA ekspresyonunu sırası ile yaklaşık 8 ve 4 kat oranında arttırmıştır. Burada üzerinde durulması gereken önemli nokta ise anemik durumdaki hücelere bakır verildiğinde DFO ile artan genlerin mRNA seviyelerinde anlamlı değişiklik olmadığıdır. Bu sonuç bize hücre kaplarında 21 gün boyunca büyüyen anemik Caco-2 hücrelerinde bakır mineralinin anemi ve hipoksiya üzerinde etkisinin bulunmadığını göstermektedir.



**Şekil 10. Bakır Mineralinin Demir Metabolizmasındaki ve Hipoksiyada Rol Oynayan Genlerin Ekspresyonlarına Etkisi.** Gruplarda yer alan örnekler için mRNA ifadenme seviyeleri belirlendikten sonra Cyclophilin A (*CypA*) mRNA'sına göre normalize edilerek  $C_T$  değerleri bulunmuştur. Sonrasında ekspresyon değerleri hesaplanmış ve her bir gene ait gruplar kendi içerisinde birbirleri ile karşılaştırılmıştır. Gruplar arasındaki farklılık tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve Tukey post-hoc testi ile hesaplanmış ve  $p \leq 0,05$  olan gruplar anlamlı olarak kabul edilmiştir. Deneylerde kullanılan örnek sayısı: n:3/grup ve deneyler 3 farklı bağımsız tekrarlı olarak yapılmıştır. Sonuçlar ortalama  $\pm$  SD olarak verilmiştir. *TfR*: Transferrin Receptor, *Fpn*: Ferroportin, *Dmt1*: Divalent metal transporter 1, *Ftn*: Ferritin, *Heph*: Hephaestin, *Ankrd37*: Ankryin Repeat Domain 37, *Egln3*: Hif prolyl hydroxylase 3

### 4.3 Hücre Kültürü Kaplarında Büyütülen Anemik Caco-2 Hücrelerinde Demir Mineralinin Anemi Durumunda Bakır Metabolizmasında ve Hipoksiyadaki Etkisinin Genetik Düzeyde İncelenmesi

Demir eksikliğine bağlı anemide gen düzeyindeki çalışmalar yine demir metabolizmasında rol oynayan genler üzerine yapılmıştır (Linder vd., 2003; Collins, 2006; Hu vd., 2010). Son yıllarda yapılan çalışmalarda demir eksikliğine bağlı aneminin ve hipoksiyanın bakır metabolizmasındaki genleri regüle ettiği gösterilmiştir (Collins, 2006; Xie ve Collins, 2011). Ancak anemi görüldüğü durumlarda hücelere verilen bakırın demir metabolizmasına etkisi bilinmemektedir. Yaptığımız çalışmada anemi olan ve hücre kaplarında büyütülen Caco-2 hücrelerine demir minerali verildiğinde bakır metabolizmasında rol oynayan genlerin mRNA seviyeleri incelenmiştir (Şekil 11A ve 11B). DFO, anlamlı derece *Atp7a* mRNA seviyesini artırırken, demir verildiğinde bu artış hem DFO ve hem kontrol grubunda anlamlı derecede azalmıştır. *Atp7a* proteinin demir eksikliğindeki regülasyonu araştırılmış ve *ATP7a* geni silinmiş sıçan enterosit hücrelerinde demir metabolizmasının etkilendiği gösterilmiştir (Gulec ve Collins, 2014). *Atox1* ve *Sod1* mRNA seviyeleri demir verildiğinde kontrol ve DFO verilen gruplara göre anlamlı derecede düşmüştür. Demir tek başına veya DFO ile beraber verildiği durumlarda bu genler üzerindeki etkinin fizyolojik nedeninin anlaşılabilmesi adına hayvan ve hücre düzeyinde fonksiyonel çalışmaların yapılması önemlidir. Demir mineralinin artan hücre içi hipoksik ortamı ortamdan kaldırdığı

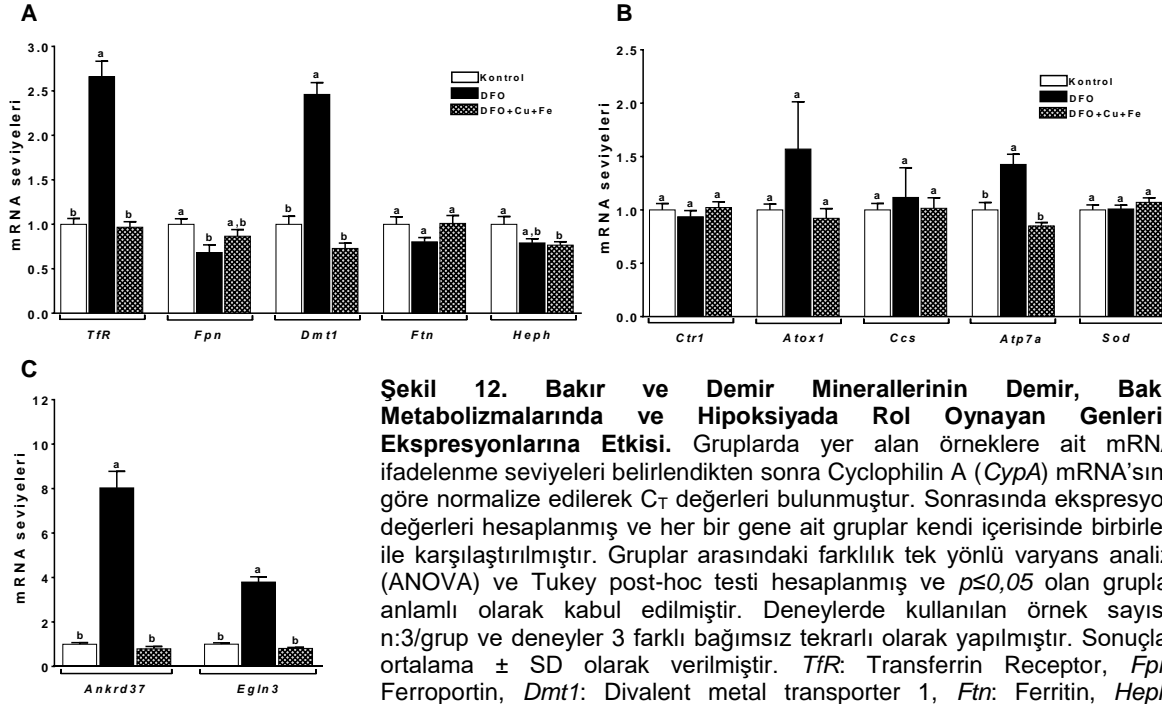


**Şekil 11. Demir Mineralinin Bakır Metabolizmasındaki ve Hipoksiyada Rol Oynayan Genlerin Ekspresyonlarına Etkisi.** Gruplarda yer alan örnekler için mRNA ifadenme seviyeleri belirlendikten sonra Cyclophilin A (*CypA*) mRNA'sına göre normalize edilerek C<sub>T</sub> değerleri bulunmuştur. Sonrasında ekspresyon değerleri hesaplanmış ve her bir gene ait gruplar kendi içerisinde birbirleri ile karşılaştırılmıştır. Gruplar arasındaki farklılık tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve Tukey post-hoc testi hesaplanmış ve  $p \leq 0,05$  olan gruplar anlamlı olarak kabul edilmiştir. Deneylerde kullanılan örnek sayısı: n:3/grup ve deneyler 3 farklı bağımsız tekrarlı olarak yapılmıştır. Sonuçlar ortalama  $\pm$  SD olarak verilmiştir. *Ctr1*: Copper transporter 1, *Atox1*: Antioxidant 1 copper chaperone, *Ccs*: Copper chaperone for superoxidase dismutase, *Atp7a*: ATPase copper transporting alpha, *Sod1*: Superoxidase dismutase 1, *Ankrd37*: Ankryin Repeat Domain 37, *EglN3*: Hif prolyl hydroxylase 3

bilinmektedir (Hu vd., 2010). Bizim çalışmamızda da anemik hücelere verilen demir *Ankrd37* ve *Egln3* mRNA seviyesi anlamlı derecede düşürerek kontrol grubundaki mRNA düzeyine getirmiştir.

#### **4.4 Hücre Kültürü Kaplarında Büyütülen Caco-2 Hücrelerinde Bakır ve Demir Mineralinin Anemi Durumunda Bakır, Demir Metabolizmalarında ve Hipoksiyadaki Etkisinin Genetik Düzeyde İncelenmesi**

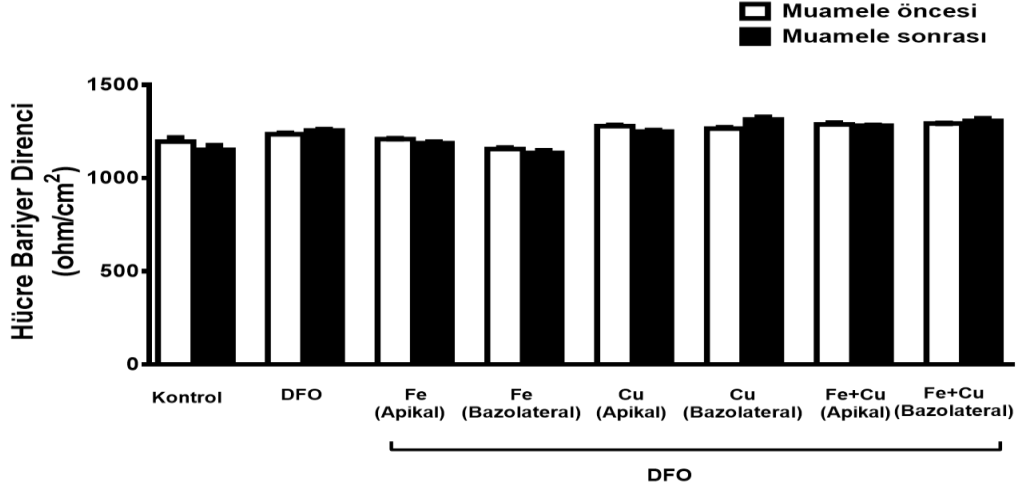
Demir ve bakırın ince bağırsaktan hücre içerisine transport protein aracılığı ile alındıkları bilinmektedir. Yapılan çalışmalarda demir eksikliği olduğunda, ince bağırsakta demir emilinden sorumlu olan Dmt1 proteinin bakır mineralini de transport etme kapasitesinin olduğu düşünülmektedir (Jiang vd., 2011). Diğer yapılan bir çalışmada Dmt1 proteinin bakır mineralini transport edemeyeceği gösterilmiştir (Shawki vd., 2015). Demir ve bakır minerallerinin fizyolojik ilişkilerinin genetik regülasyonları düzeyinde detayları hala araştırılmaktadır. Bu çalışmada bakır ve demir minerali anemi hücrelerine beraber verilmiş sonrasında demir, bakır metabolizmalarında ve hipoksiyada rol oynayan genlerin mRNA seviyeleri incelenmiştir (Şekil 12). Anemik Caco-2 hücrelerine bakır ve demir beraber verildiğinde anemik durumda mRNA seviyeleri artan *Tfr* ve *Dmt1* genlerindeki artış kontrol grubundaki mRNA seviyeleri ile aynı düzeye düşmüştür. Ancak bu etkinin verilen demirin neden olduğu ve bakır mineralinin bu regülasyonda rolü bulunamamıştır. Aynı şekilde hipoksiyada rol alan *Ankrd37* ve *Egln3* seviyelerinin de demir ve bakır verildiği durumlarda düşmesinin yine demirin etkisinden kaynaklandığı açıktır. Bakır tek başına verildiğinde *Tfr*, *Dmt1*, *Ankrd37* ve *Egln3* mRNA seviyelerinde bir değişikliğe yol açmamıştır (Şekil 3B).



**Şekil 12. Bakır ve Demir Minerallerinin Demir, Bakır Metabolizmalarında ve Hipoksiyada Rol Oynayan Genlerin Ekspresyonlarına Etkisi.** Graplarda yer alan örneklere ait mRNA ifadenme seviyeleri belirlendikten sonra Cyclophilin A (*CypA*) mRNA'sına göre normalize edilerek C<sub>T</sub> değerleri bulunmuştur. Sonrasında ekspresyon değerleri hesaplanmış ve her bir gene ait gruplar kendi içerisinde birbirleri ile karşılaştırılmıştır. Gruplar arasındaki farklılık tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve Tukey post-hoc testi hesaplanmış ve  $p \leq 0,05$  olan gruplar anlamlı olarak kabul edilmiştir. Deneylerde kullanılan örnek sayısı: n:3/grup ve deneyler 3 farklı bağımsız tekrarlı olarak yapılmıştır. Sonuçlar ortalama  $\pm$  SD olarak verilmiştir. *Tfr*: Transferrin Receptor, *Fpn*: Ferroportin, *Dmt1*: Divalent metal transporter 1, *Ftn*: Ferritin, *Heph*: Hephaestin *Ctr1*: Copper transporter 1, *Atox1*: Antioxidant 1 copper chaperone, *Ccs*: Copper chaperone for superoxidase dismutase, *Atp7a*: ATPase copper transporting alpha, *Sod1*: Superoxidase dismutase 1, *Ankrd37*: Ankryin Repeat Domain 37, *Egl3*: Hif prolyl hydroxylase 3

#### 4.5 İnsan İnce Bağırsak Sisteminin Modellenmesi ve DFO, Cu, Fe Muamelelerinin Hücre Bariyer Direncine Etkisinin Araştırılması

Kolon kanser hücresi (Caco-2) özel membranlarda 21 gün boyunca büyütüldüğünde insan bağırsak sistemini ve emilimden sorumlu enterosit hücrelerinin fizyolojik özelliklerini modellemektedir (Alvarez-Hernandez vd., 1991). Deneysel olarak Caco-2 hücrelerinin polarizasyonu, hücrelerin oluşturdukları hücre bariyer direnç (TEER) değerlerinin EVOM metre ile ölçülmesiyle belirlenmiştir. TEER ölçümü 21 günün sonunda ve hücrelere DFO, Fe ve Cu verilmeden ve verildikten sonra yapılmıştır. Şekil 13'te görüldüğü gibi deneysel gruplar arasında hücre muamelesi öncesi ve sonrasında TEER değerlerinde anlamlı bir değişim gözlenmemiştir. Ayrıca TEER değerlerinin 250 ohm/cm<sup>2</sup>'den çok daha fazla olması hücrelerin *in vitro* insan bağırsak sistemindeki gibi polarize olmasını (apikal ve basolateral) deneysel olarak sağlanmıştır. Elde edilen TEER değerleri, litaretürdeki Caco-2 için verilen değerler ile paralellik göstermektedir (Sambuy vd., 2005).



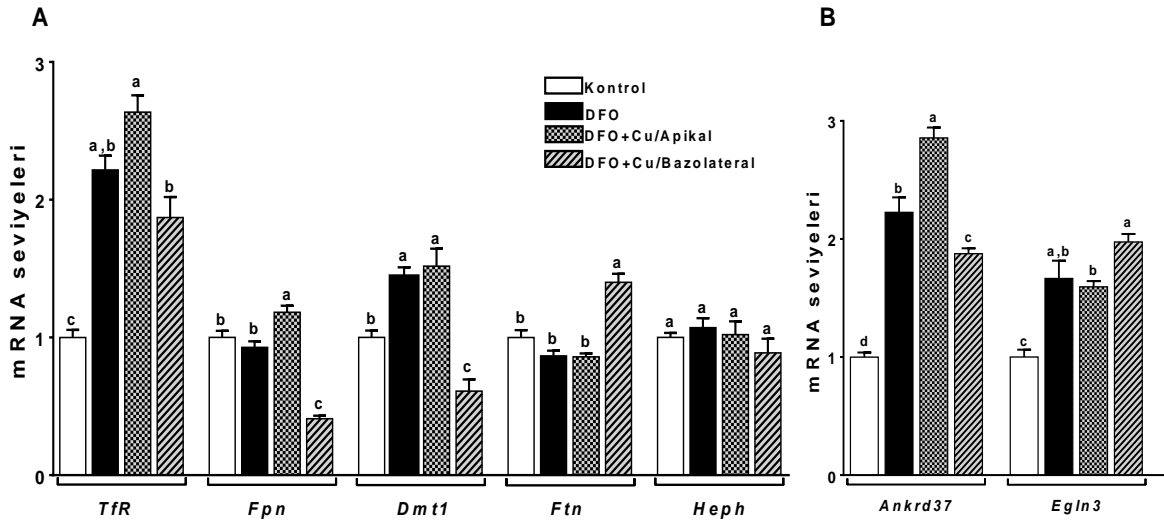
**Şekil 13. Hücre Polarizasyonun TEER ile Belirlenmesi ve Deneysel Muamelelerin Hücre Bariyer Direncine Etkisi.** Hücreler membran üzerinde 21 gün boyunca büyütüldükten sonra hücre bariyer direnci TEER ölçümü ile kontrol edilmiştir. Sonrasında deneysel muamelelerin hücre bariyer direncine etkisi olup olmadığının belirlenmesi adına tekrardan ölçüm yapılmıştır. Gruplar arasındaki farklılık student t-testi ile hesaplanmıştır. Tüm gruplar için  $p \geq 0,05$  olarak bulunmuştur. Deneylerde kullanılan örnek sayısı: n:3/grup ve deneyler 3 farklı bağımsız tekrarlı olarak yapılmıştır. Sonuçlar ortalama  $\pm$  SD olarak verilmiştir.

#### 4.6 Membran Üzerinde Büyütülen Caco-2 Hücrelerinde Bakır Mineralinin Anemi Durumunda Demir Metabolizmasında ve Hipoksiyadaki Etkisinin Genetik Düzeyde İncelenmesi

Hücrelerin membran sisteminde büyütülmelerinin amacı insan bağırsak sistemindeki fizyolojik yapıyı modellemektir. Oluşturulan apikal ve bazolateral kısımlar sırası ile diyetten gelen besinlerin bulunduğu lümen kısmını ve kan damar sistemi ile temasta olan bölgeyi ifade etmektedirler. İnsan vücudunda sistemik olarak organların birbiri ile olan ilişkisi düşünülürse hayvan çalışmalarında diyetel ve kandaki faktörlerin etkilerinin ayrı ayrı çalışılması çok güç olarak düşünülebilir. Bu çalışmada kullanılan *in vitro* hücre modeli, besinlerden gelen veya kanda bulunan bakır ve demir minerallerinin anemi oluşturulmuş enterosit hücrelerindeki etkilerinin ayrı ayrı çalışılmasına olanak sağlamıştır. İlk olarak bakır mineralinin demir metabolizmasında ve hipoksiyadaki etkisi araştırılmıştır (Şekil 10A ve 10B). Bu kısımda özellikle diyetdeki (apikal) ve kandaki (bazolateral) bakırın etkisi ayrı ayrı araştırılmış olmuştur. DFO ile oluşturulmuş demir eksikliğine bağlı anemide, *TfR*, *Fpn* ve *Dmt1* mRNA seviyeleri apikal ve bazolateral kısımlara bakır verildiğinde karşılaştırılmış ve bazolateral kısımdaki bakırın etkisinin daha fazla olduğu ve DFO ile artan gen ekspresyonlarının apikale verilen bakırın etkisine göre anlamlı bir şekilde düştüğü gözlenmiştir. Ancak bu düşüş *TfR* ve *Dmt1* için DFO'nun etkisini tamamen yok edecek düzeyde olmamıştır. Nedeni ise bu genlerin mRNA seviyeleri ile DFO verildiğindeki düzeyleri



arasında farklılığın gözlenmemesinden kaynaklanmaktadır. Bakır, bazolateral kısma verildiğinde *Fpn* mRNA seviyesi tüm deneysel gruplara göre anlamlı bir şekilde azalmıştır. *Fpn* proteinin demir metabolizmasındaki olası ilişkisi enterosit hücrelerinde bakırı kana veren proteinin (*Atp7a*) olmadığı durumlarda gösterilmiştir (Gulec ve Collins, 2014). Yaptığımız çalışmada elde ettiğimiz sonuçlar ile bakırın *Fpn* gen ekspresyonuna etkisi gösterilmiş olmuştur. İleriki çalışmalarda bu ilişkinin fizyolojik nedenleri moleküler düzeyde ortaya konmalıdır. Yapılan diğer bir *in vivo* fare çalışmasında, 'Atp7a mutant brindle' farede sistemik bakır eksikliği gözlenirken ince bağırsak enterosit hücrelerinde ise bakır mineralinin arttığı bir fenotip oluşmaktadır. Bu hayvanlarda demir eksikliği olduğunda hücre içi ve kan bakır miktarlarının belirli bir seviyede olmasının önemli olabileceği vurgulanmıştır (Gulec ve Collins, 2013). Bizim çalışmamızda çıkan sonuçlar, özellikle vücuttaki bakır seviyesinin ince bağırsak demir metabolizmasına diyetten gelen bakıra göre daha önemli olabileceğini işaret etmektedir. Bazolateral bakır minerali anemi durumunda demirin depolanmasından sorumlu ferritin proteinine ait mRNA ekspresyonunu diğer deneysel gruplara göre anlamlı derece artırırken *Heph* mRNA seviyesi bakır mineraline bağlı olarak herhangi bir değişim göstermemiştir. Özellikle ferritin mRNA seviyesindeki artış bazolateral kısımdaki bakırın hücre içine demir girişini arttırdığı gibi yorumlanabilir. Bu yüzden bu deneysel gruplarda hücre içi demir miktarının ölçülmesi önem taşımaktadır. Bakır mineralinin hipoksiyada DFO ile artan *Ankrd37* ve *Egln3* mRNA seviyeleri üzerinde kontrol seviyesine düşürecek kadar bir etki göstermemiştir. Ancak bazolateral kısma verilen bakır *Ankrd37* mRNA seviyesini apikal kısma verilene göre daha fazla oranda düşürmüştür. Bazolateral ve apikal kısımda bulunan bu fark *Egln3* geni için gözlemlenememiştir. Bakır mineralinin hipoksiyada rol oynayan Hif transkripsiyon faktörünün protein stabilitesini arttırdığı ve hipoksik ortamın korunması ve devamı adına önemli olduğu vurgulanmıştır (Martin vd., 2005). Bizim çalışmamızda da bakır mineralinin DFO'ya bağımlı oluşan hipoksiyada rol oynayan ve mRNA seviyesi artan genler üzerinde mRNA düzeylerini azaltıcı bir etki gözlenmemiştir. Bu da bakırın hipoksiyadaki pozitif etkisinden kaynaklanabilir.

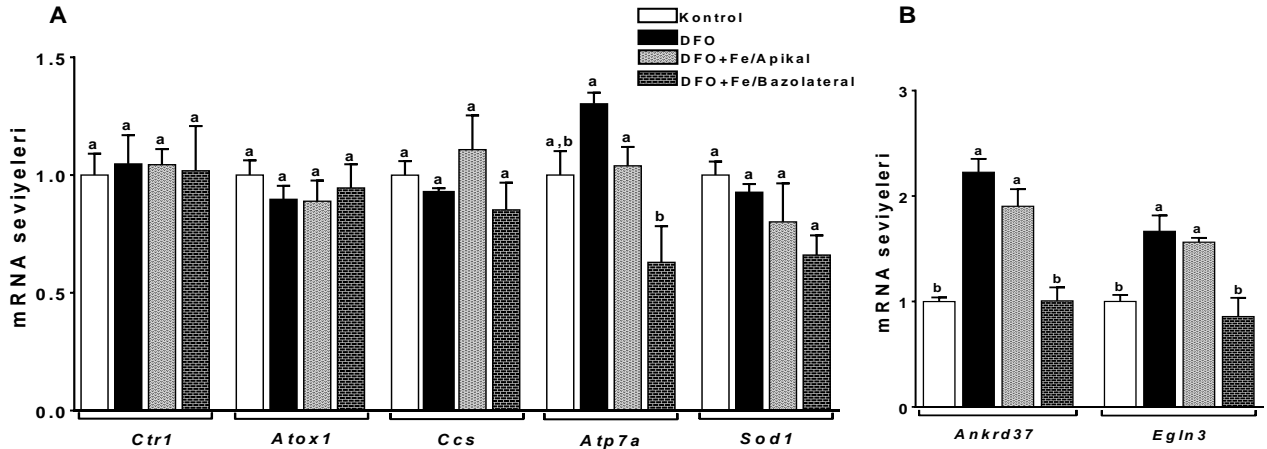


**Şekil 14. Bakır Mineralinin Demir Metabolizmasında ve Hipoksiyada Rol Oynayan Genlerin Ekspresyonlarına Anemi Durumundaki Etkisinin *In vitro* İnsan İnce Bağırsak Sisteminde İncelenmesi.** Hücreler 21 gün boyunca membran sisteminde büyütülerek polarize olmaları sağlanmıştır. Polarizasyonları TEER ölçümü ile kontrol edilmiştir. DFO ile muamele edilen örnekler sonrasında bakır minerali, apikal ve bazolateral kısımlara verilmiştir. Örneklerden RNA izolasyonu yapılmış ve cDNA sentezi sonrasında RT-qPCR metodu uygulanmıştır. Gruplarda yer alan örnekler ait mRNA ifadenme seviyeleri belirlendikten sonra Cyclophilin A (*CypA*) mRNA'sına göre normalize edilerek  $C_T$  değerleri bulunmuştur. Sonrasında ekspresyon değerleri hesaplanmış ve her bir gene ait gruplar kendi içerisinde birbirleri ile karşılaştırılmıştır. Gruplar arasındaki farklılık tek yönlü varyans analizi (ANAVO) ve Tukey post-hoc testi ile hesaplanmış ve  $p \leq 0,05$  olan gruplar anlamlı olarak kabul edilmiştir. Deneylerde kullanılan örnek sayısı: n:3/grup ve deneyler 3 farklı bağımsız tekrarlı olarak yapılmıştır. Sonuçlar ortalama  $\pm$  SD olarak verilmiştir. *Tfr*: Transferrin Receptor, *Fpn*: Ferroportin, *Dmt1*: Divalent metal transporter 1, *Ftn*: Ferritin, *Heph*: Hephaestin, *Ankrd37*: Ankryin Repeat Domain 37, *Egl3*: Hif prolyl hydroxylase 3

#### 4.7 Membran Üzerinde Büyütülen Caco-2 Hücrelerinde Demir Mineralinin Anemi Durumunda Bakır Metabolizmasında ve Hipoksiyadaki Etkisinin Genetik Düzeyde İncelenmesi

Demir minerali, DFO ile muamele edilmiş hücrelerin apikal ve bazolateral kısımlarına ayrı ayrı verilerek diyet ve kandaki demir mineralinin enterosit bakır metabolizmasındaki ve hipoksiyadaki etkisi modellenmiştir. Şu ana kadar literatürde demirin ince bağırsak enterosit hücrelerindeki bakır metabolizmasına etkisi üzerinde çalışmalar bulunmamaktadır. Bu projede kullanılan deneysel yaklaşım bize bu konu üzerinde araştırma yapma imkanı sağlamıştır. Anemi oluşturulmuş hücrelerde apikal ve bazolateral kısımlara verilen demir minerali bakır metabolizmasında yer alan *Ctr1*, *Atox1*, *Ccs* ve *Sod1* genlerine ait mRNA ekspresyonlarında herhangi bir değişikliğe yol açmazken, bazolateral kısma anemi durumunda demir minerali verildiğinde *Atp7a* mRNA seviyesi apikal kısma demir verilen duruma göre anlamlı şekilde düşmektedir (Şekil 15A). Ayrıca bu düşüş kontrol grubundaki gen ekspresyon seviyesinde altına kadar gerilememektedir. *Atp7a* proteinin demir

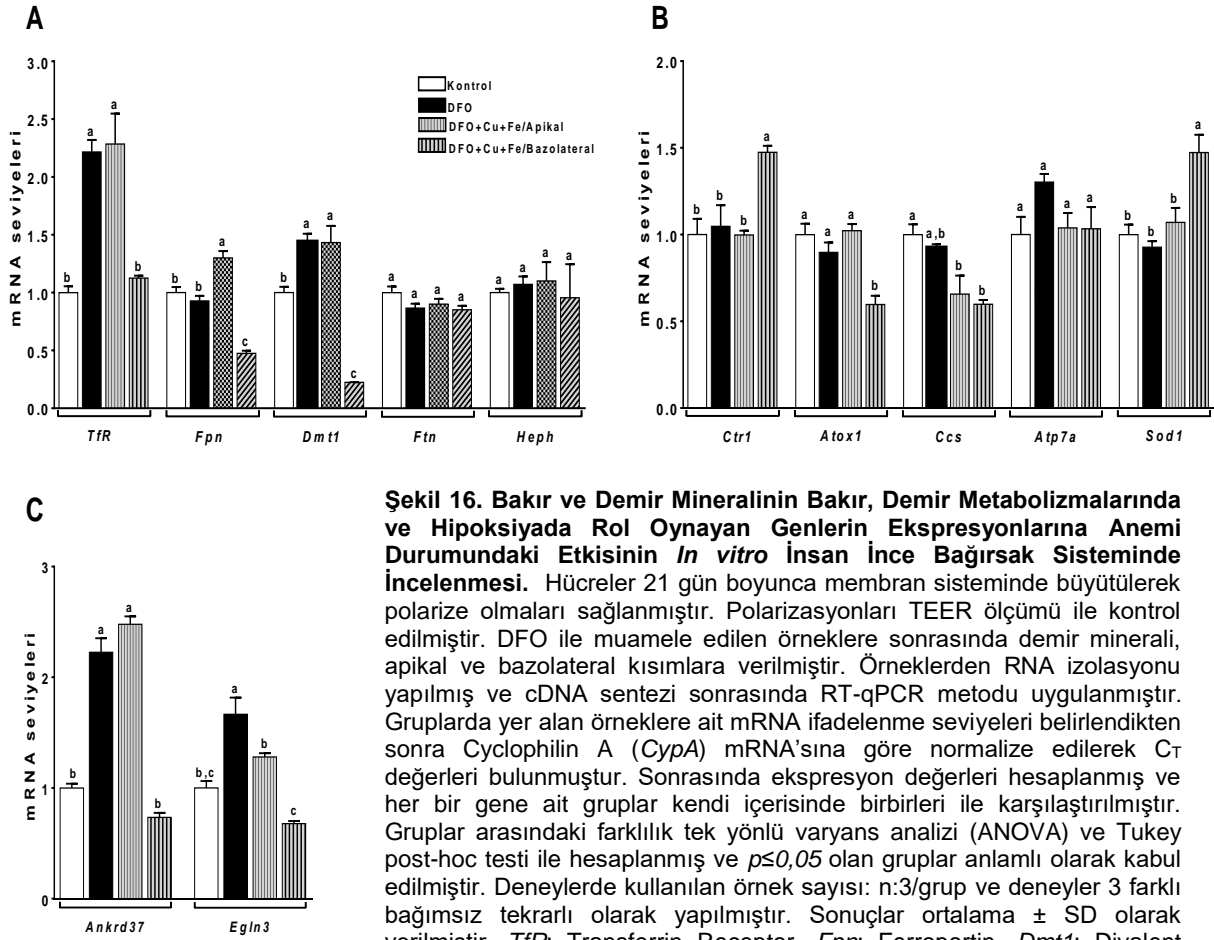
metabolizması ile ilişkisi bilinmesine rağmen gözlemediğimiz *Atp7a*'ın regülasyonu demirin *Atp7a* gen regülasyonunda etkisi olabileceği düşündürmektedir. Klasik hücre kültürü kaplarında büyütülen Caco-2 hücrelerine DFO verildiğinde Hif2alfa protein seviyesinin arttığı ve bu artışın *Ankrd37* ve *Egln3* seviyesindeki artışa neden olduğu gösterilmiştir (Hu vd., 2010). Bu artış hücrelere verilen demire bağlı olarak hipoksiya durumunun ortamdaki kaybolmasıyla gen regülasyonlarındaki artış azalmaktadır. Bizim yaptığımız bu çalışmada da ortama verilen demir minerali *Ankrd37* ve *Egln3* mRNA seviyesini kontrol grubundaki seviyeye kadar azaltmıştır (Şekil-15B). Ancak bu etkinin apikal ve bazolateral kısımlara verilen demirle nasıl değiştiği bilinmemektedir. Şekil-15B'de görüldüğü gibi demir sadece bazolateral kısma verildiğinde *Ankrd37* ve *Egln3* mRNA seviyelerinde anlamlı bir şekilde düşüş gözlenmiştir. Bu sonuç bize kandaki demir mineral seviyesinin enterosit hücrelerindeki hipoksik yanıtın regülasyonunda daha önemli olduğunu ortaya koymaktadır.



**Şekil 15. Demir Mineralinin Bakır Metabolizmasında ve Hipoksiyada Rol Oynayan Genlerin Ekspresyonlarına Anemi Durumundaki Etkisinin *In vitro* İnsan İnce Bağırsak Sisteminde İncelenmesi.** Hücreler 21 gün boyunca membran sisteminde büyütülerek polarize olmaları sağlanmıştır. Polarizasyonları TEER ölçümü ile kontrol edilmiştir. DFO ile muamele edilen örnekler sonrasında demir minerali, apikal ve bazolateral kısımlara verilmiştir. Örneklerden RNA izolasyonu yapılmış ve cDNA sentezi sonrasında RT-qPCR metodu uygulanmıştır. Gruplarda yer alan örnekler için mRNA ifadenme seviyeleri belirlendikten sonra Cyclophilin A (*CypA*) mRNA'sına göre normalize edilerek  $C_T$  değerleri bulunmuştur. Sonrasında ekspresyon değerleri hesaplanmış ve her bir gene ait gruplar kendi içerisinde birbirleri ile karşılaştırılmıştır. Gruplar arasındaki farklılık tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve Tukey post-hoc testi ile hesaplanmış ve  $p \leq 0,05$  olan gruplar anlamlı olarak kabul edilmiştir. Deneylerde kullanılan örnek sayısı: n:3/grup ve deneyler 3 farklı bağımsız tekrarlı olarak yapılmıştır. Sonuçlar ortalama  $\pm$  SD olarak verilmiştir. *Ctr1*: Copper transporter 1, *Atox1*: Antioxidant 1 copper chaperone, *Ccs*: Copper chaperone for superoxidase dismutase, *Atp7a*: ATPase copper transporting alpha, *Sod1*: Superoxidase dismutase 1, *Ankrd37*: Ankryin Repeat Domain 37, *Egln3*: Hif prolyl hydroxylase 3

#### 4.8 Membran Üzerinde Büyütülen Caco-2 Hücrelerinde Bakır ve Demir Mineralinin Anemi Durumunda Bakır, Demir Metabolizmalarında ve Hipoksiyadaki Etkisinin Genetik Düzeyde İncelenmesi

Demir eksikliğine bağlı anemide, bakır ve demir metabolizmalarının ilişkisi bilinmektedir (Gulec ve Collins, 2014). Demir eksikliğinde hücre içerisine bakır mineralinin girişinin artması bakırın anemik durumu kompanse etmeye çalışmasından kaynaklandığı düşünülmeye rağmen bu ilişkinin fonksiyon düzeyindeki araştırmaları hala devam etmektedir. Ayrıca yapılan farklı çalışmalarda ince bağırsaktan demir emiliminden sorumlu olan Dmt1 proteinin, anemi durumunda bakır mineralini de hücre içerisine alma kapasitesinin olduğu vurgulanmıştır (Jiang vd., 2011). Bu çalışmalar bakır ve demir minerallerinin beraber olduğunda genetik olarak birbirini etkileyebileceklerini düşündürmektedir. Bu yüzden bu iki mineralin birlikteliğinde bakır ve demir metabolizmalarında ve ayrıca hipoksiyaya etkisi genetik düzeyde incelenmiştir (Şekil 16A, 16B ve 16C). Özellikle bakır ve demir bazolateral kısma verildiğinde *Tfr* mRNA seviyesi kontrol grubundaki mRNA seviyesine düşerken, *Fpn* ve *Dmt1* mRNA seviyeleri kontrol grubuna göre anlamlı derecede azalmıştır (Şekil 16A). Bunun yanında *Ftn* ve *Heph* mRNA seviyeleri gruplar arasında farklılık göstermemektedir. Buradaki sonuçlardan çıkan en önemli nokta ise apikal ve bazolateral kısma verilen bakır ve demir mineralleri demir metabolizmasında rol oynayan genler üzerine etkilerini özellikle bazolateral bölgeden (enterosit hücresinin kana bakan kısmı) verildiğinde göstermesidir. Yine aynı şekilde anemik hücrelere bakır ve demir verildiğinde bakır metabolizmasındaki genlerin ekspresyon seviyeleri karşılaştırılmıştır (Şekil 16B). Mineraller bazolateral kısma verildiğinde hücre içi bakır taşınımından sorumlu Atox proteinine ait mRNA seviyesi diğer gruplara göre anlamlı bir şekilde düşerken *Ccs* mRNA seviyesi ise apikal ve bazolateral bölgelere verilen minerallere benzer etki göstermiştir. *Ctr1* ve *Atp7a* mRNA seviyelerinde gruplar arasında bir değişiklik gözlenmemiştir. Metallerin toksik etkilerine bağlı olarak hücre için koruma mekanizmalarından sorumlu olan Sod1 proteinini kodlayan mRNA seviyesi, mineraller bazolateral kısma verildiğinde diğer gruplarla karşılaştırıldığında anlamlı bir şekilde artmaktadır. Bu artışın bakır ve demir minerallerinin beraber verilmesinden kaynaklandığı düşünülebilir. DFO'ya bağlı hipoksiyada seviyeleri artan *Ankrd37* ve *Egln3* mRNA'ları bakır ve demir mineralleri beraber bazolateral kısma verildiğinde indüklenmiş mRNA seviyeleri azalmıştır. Bakırın tek başına *Ankrd37* ve *Egln3* genleri üzerine herhangi bir etkisi gözlenmemesinden dolayı bu azalışın demir üzerinden olabileceği düşünülmektedir.



**Şekil 16. Bakır ve Demir Mineralinin Bakır, Demir Metabolizmalarında ve Hipoksiyada Rol Oynayan Genlerin Ekspresyonlarına Anemi Durumundaki Etkisinin *In vitro* İnsan İnce Bağırsak Sisteminde İncelenmesi.** Hücreler 21 gün boyunca membran sisteminde büyütülerek polarize olmaları sağlanmıştır. Polarizasyonları TEER ölçümü ile kontrol edilmiştir. DFO ile muamele edilen örnekler sonrasında demir minerali, apikal ve bazolateral kısımlara verilmiştir. Örneklerden RNA izolasyonu yapılmış ve cDNA sentezi sonrasında RT-qPCR metodu uygulanmıştır. Gruplarda yer alan örnekler ait mRNA ifadenme seviyeleri belirlendikten sonra Cyclophilin A (*CypA*) mRNA'sına göre normalize edilerek  $C_T$  değerleri bulunmuştur. Sonrasında ekspresyon değerleri hesaplanmış ve her bir gene ait gruplar kendi içerisinde birbirleri ile karşılaştırılmıştır. Gruplar arasındaki farklılık tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve Tukey post-hoc testi ile hesaplanmış ve  $p \leq 0,05$  olan gruplar anlamlı olarak kabul edilmiştir. Deneylerde kullanılan örnek sayısı: n:3/grup ve deneyler 3 farklı bağımsız tekrarlı olarak yapılmıştır. Sonuçlar ortalama  $\pm$  SD olarak verilmiştir. *TfR*: Transferrin Receptor, *Fpn*: Ferroportin, *Dmt1*: Divalent metal transporter 1, *Ftn*: Ferritin, *Heph*: Hephaestin *Ctr1*: Copper transporter 1, *Atox1*: Antioxidant 1 copper chaperone, *Ccs*: Copper chaperone for superoxidase dismutase, *Atp7a*: ATPase copper transporting alpha, *Sod1*: Superoxidase dismutase 1, *Ankr37*: Ankryin Repeat Domain 37, *Egl3*: Hif prolyl hydroxylase 3

## 5. GENEL DEĞERLENDİRME VE GELECEKTE YAPILACABİLECEK PROJELER

Proje kapsamında kullanılan Caco-2 hücreleri klasik hücre kültürü kaplarında ve özel membran sisteminde 21 gün büyütülerek anemi durumunda bakır mineralinin demir metabolizmasına ve demir mineralinin ise bakır metabolizmasına etkileri araştırılmıştır. Bu çalışmanın en önemli kısımlarından bir tanesi de membran sisteminde hücrelerin büyütülerek insan ince bağırsak sisteminin oluşturulmasıdır. Bu şekilde, insan vücudundaki gibi besinlerden gelen lümen bölgesi (apikal) ve kan dolaşım sistemi ile temas halinde olan bölge (bazolateral) modellenmiştir. Bu polarizasyon (apikal/bazolateral bölgeler) bize besinsel ve kandaki bakır ve demir mineralinin ayrı ayrı insan ince bağırsakta emilimden sorumlu

enterosit hücrelerinde anemi ve anemiye bağımlı hipoksiya üzerindeki genetik etkileri araştırmamıza olanak sağlamıştır. Araştırma bu yönü ile literatürde yapılan ilk çalışmadır. Hücre kültürü kaplarında büyüyen hücrelerle membran üzerinde büyüyen hücrelerin DFO ve bakır verildiğindeki seviyeleri karşılaştırıldığında (Şekil 10A ve Şekil 14A) özellikle *Fpn* ve *Dmt1* genlerin regülasyonlarında farklılık gözlenmiştir.

Özellikle bu farklılık, bakır polarize hücrelerin bazolateral kısımlarına verildiğinde gözlenmiştir. Bunun temel nedeninin hücrelerin büyütülme şekillerindeki farklılıklardan kaynaklandığı düşünülmektedir. Örneğin insan enterosit hücrelerinde *Dmt1* proteini apikal bölgede, *Fpn* proteini ise bazolateral bölgede görev yapmaktadır. Hücre kültürü kaplarında polarizasyon olmadığı için bu tür bir farklılığı öngörmek imkansızken, membran üzerinde büyütülen hücrelerde polarizasyona bağlı olarak proteinlerin lokalizasyonu ve regülasyonu *in vivo* durum ile benzerlik gösterebilir. Bu da *Dmt1* ve *Fpn* genlerinin anemi durumunda bakıra bağlı regülasyonun iki hücre modelindeki farklılıktan kaynaklanabileceğini ortaya çıkarmaktadır. Ayrıca polarize olan hücrelerde bakırın hipoksiya üzerinde tam bir etkisi gözlenmemesine rağmen, *Ankrd37* mRNA seviyesindeki düşüklük bakır bazolateral kısma verildiğinde apikal kısma verildiğindeki duruma göre daha anlamlı bir şekilde gözlenmiştir. Demirin bakır metabolizması üzerindeki etkisi bu iki farklı çalışma modelinde kıyaslandığında *Atox1* ve *Ccs* mRNA seviyeleri düşerken, bu azalma polarize olmuş hücrelerde görülmemiştir. Polarizasyon özellikle hücre membran üzerinde lokalize olmuş proteinler için önemli iken stoplazma içerisindeki protein ve gen regülasyonları için farklılığın neden olduğunu fizyolojik olarak açıklamak veya fikir yürütmek bu sonuçlarla çok zordur. Bakır ve demir beraber verildiğinde hücre modelleri arasında fizyolojik olarak önemli olabilecek bir farklılık gözlenemezken, anemiye bağlı olarak genler üzerindeki etkinin demir minerali üzerinden olduğu söylenebilir. Genlere ait mRNA regülasyon çalışmalarındaki sonuçlar fonksiyon üzerine çok açıklayıcı olamamaktadırlar. Bunun için özellikle bu genlere ait protein seviyeleri veya bu genlerin hücrede olmadığına (hücrede geni silmek (knocked down)) fizyolojik değişimlerin test edilmesi direk fonksiyon üzerinde çalışmaya olanak sağlayabilir. Ancak sunulan bu projede birçok gen regülasyonuna bakılması bizim için ileri çalışmalar için yeni hipotezler ortaya çıkarmıştır. Proje kapsamındaki en önemli bilimsel çıktı ise bakır ve demir mineralinin anemi durumunda hücrelere etkisinin daha çok bazolateral kısımdan olmasıdır. Bu da insanda öncelikle ince bağırsak enterosit hücrelerindeki anemik durumun giderilmesine bağlı hücre içi sinyallerin kandaki (bazolateral kısımdan gelmesi) bakır ve demir minerali ile ilgili olduğunu ortaya koymuştur. Bu etki sadece bu iki minerale ilişkilidir. Özellikle *in vivo* çalışmalarda sistemik faktörlerin (örneğin karaciğerin enterosit hücrelerindeki demir metabolizmasına etkisi) olması enterosit hücrelerindeki gen regülasyonları üzerindeki etkilerin belirlenmesi adına problem yaratabilmektedir. Bizim kullandığımız polarize hücreler,



sadece bakır ve demirin olası etkilerini araştırmamıza olanak sağlamıştır. Bu çalışmada ortaya çıkan sonuçlar yeni çalışmaların yapılmasına direk olanak sağlayacaktır. Örneğin; *i-* Apikal ve bazolateral kısımlara verilen bakır ve demire bağlı olarak anemi durumunda değişen gen mRNA düzeylerinin protein ve fonksiyonel düzeyde araştırılması, *ii-* Bazolateral kısımda bakır ve demir ile ilişkili hücre için gen regülasyonlarında rol oynayan moleküler yolakların ortaya çıkarılması. Bu alışmalar, anemi durumunda kandaki bakır ve demir mineralinin etkilerinin fizyolojik olarak anlaşılmasına yardımcı olacaktır.

## EKLER

### EK-1. Projede kullanılan primerlerin baz dizileri

Gen Sembolü	İleri Yöndeki Sekans Dizisi	Geri Yöndeki Sekans Dizisi
DMT1	TGCATCTTGCTGAAGTATGTCACC	CTCCACCATCAGCCACAGGAT
FTN	CCAGAACTACCACCAGGACTCA	GTTCTTCAAAGCCACATCATCG
FPN	GCAGGAGAAGACAGAAGCAAAC	TCCTTCGAATTGTGGCATTTCAT
TFR	TCAGAGCGTCGGGATGATATCGG	CTTGATCCATCATCATTCTGAACTGCC
HEPH	TTCAAGAATAATGCCAGCCG	CAGGAAACACAAGCAGAGTCATT
CTR1	AGGACTCAAGATAGCCCCGAGAGA	CCTGGGACAGGCATGGAA
ATOX1	TGTCTCTCGGGTCCCAATAAG	AGGCCAAGGTAGGAAACAGTCT
CCS	GACCCTCTGCACGTTGGAGTT	GTGGGTGTGTACCAAGACCATCTG
ATP7A	AATGCTGATGAAGGAGATGGTGTT	TATGTACGCAGGAGGGACACG
SOD1	CTGAAGGCCTGCATGGATTC	CCAAGTCTCCAACATGCCTCTC
ANKRD37	AGCAGTCGCCTGTCCACTTAGC	AGCAGGCTTAGGCACTCCAGG
EGLN3	GCAAATACTACGTCAAGGAGAGGTCTAA	GGCATCCCAATTCTTGTTTCAGATAG



## KAYNAKLAR

- Alvarez-Hernandez X., Nichols, G. M., Glass, J., "Caco-2 Cell Line: A System for Studying Intestinal Iron Transport across Epithelial Cell Monolayers", *Biochim Biophys Acta*, 1070(1), 205-208, (1991).
- Anderson G. J., Frazer, D. M., McKie, A. T., Vulpe, C. D., "The Ceruloplasmin Homolog Hephaestin and the Control of Intestinal Iron Absorption", *Blood Cells Mol Dis*, 29(3), 367-375, (2002).
- Andrews N. C., "Disorders of Iron Metabolism", *N Engl J Med*, 341(26), 1986-1995, (1999).
- Aruoma O. I., Halliwell, B., Laughton, M. J., Quinlan, G. J., Gutteridge, J. M., "The Mechanism of Initiation of Lipid Peroxidation. Evidence against a Requirement for an Iron(II)-Iron(III) Complex", *Biochem J*, 258(2), 617-620, (1989).
- Broderius M., Mostad, E., Wendroth, K., Prohaska, J. R., "Levels of Plasma Ceruloplasmin Protein Are Markedly Lower Following Dietary Copper Deficiency in Rodents", *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, 151(4), 473-479, (2010).
- Cassat J. E., Skaar, E. P., "Iron in Infection and Immunity", *Cell Host Microbe*, 13(5), 509-519, (2013).
- Chantret I., Barbat, A., Dussaulx, E., Brattain, M. G., Zweibaum, A., "Epithelial Polarity, Villin Expression, and Enterocytic Differentiation of Cultured Human Colon Carcinoma Cells: A Survey of Twenty Cell Lines", *Cancer Res*, 48(7), 1936-1942, (1988).
- Chicault C., Toutain, B., Monnier, A., Aubry, M., Fergelot, P., Le Treut, A., Galibert, M. D., Mosser, J., "Iron-Related Transcriptomic Variations in Caco-2 Cells, an in Vitro Model of Intestinal Absorptive Cells", *Physiol Genomics*, 26(1), 55-67, (2006).
- Collins J. F., "Gene Chip Analyses Reveal Differential Genetic Responses to Iron Deficiency in Rat Duodenum and Jejunum", *Biol Res*, 39(1), 25-37, (2006).
- Collins J. F., Klevay, L. M., "Copper", *Adv Nutr*, 2(6), 520-522, (2011).
- Collins J. F., Prohaska, J. R., Knutson, M. D., "Metabolic Crossroads of Iron and Copper", *Nutr Rev*, 68(3), 133-147, (2010).
- Crichton R. R., Charloreaux-Wauters, M., "Iron Transport and Storage", *Eur J Biochem*, 164(3), 485-506, (1987).
- Delie F., Rubas, W., "A Human Colonic Cell Line Sharing Similarities with Enterocytes as a Model to Examine Oral Absorption: Advantages and Limitations of the Caco-2 Model", *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*, 14(3), 221-286, (1997).
- Donovan A., Brownlie, A., Zhou, Y., Shepard, J., Pratt, S. J., Moynihan, J., Paw, B. H., Drejer, A., Barut, B., Zapata, A., Law, T. C., Brugnara, C., Lux, S. E., Pinkus, G. S., Pinkus, J. L., Kingsley, P. D., Palis, J., Fleming, M. D., Andrews, N. C., Zon, L. I., "Positional Cloning of Zebrafish Ferroportin1 Identifies a Conserved Vertebrate Iron Exporter", *Nature*, 403(6771), 776-781, (2000).
- Failla M. L., Huo, T., Thakkar, S. K., "In Vitro Screening of Relative Bioaccessibility of Carotenoids from Foods", *Asia Pac J Clin Nutr*, 17 Suppl 1, 200-203, (2008).



Fox P. L., "The Copper-Iron Chronicles: The Story of an Intimate Relationship", *Biometals*, 16(1), 9-40, (2003).

Fu D., Richardson, D. R., "Iron Chelation and Regulation of the Cell Cycle: 2 Mechanisms of Posttranscriptional Regulation of the Universal Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor P21cip1/Waf1 by Iron Depletion", *Blood*, 110(2), 752-761, (2007).

Ganz T., Nemeth, E., "Hepcidin and Iron Homeostasis", *Biochim Biophys Acta*, 1823(9), 1434-1443, (2012).

Glahn R. P., Lee, O. A., Miller, D. D., "In Vitro Digestion/Caco-2 Cell Culture Model to Determine Optimal Ascorbic Acid to Fe Ratio in Rice Cereal.", *Journal of Food Science*, 64: 925–928, 925-928, (1999).

Glahn R. P., Rassier, M., Goldman, M. I., Lee, O. A., Cha, J., "A Comparison of Iron Availability from Commercial Iron Preparations Using an in Vitro Digestion/Caco-2 Cell Culture Model", *J Nutr Biochem*, 11(2), 62-68, (2000).

Green R., Charlton, R., Seftel, H., Bothwell, T., Mayet, F., Adams, B., Finch, C., Layrisse, M., "Body Iron Excretion in Man: A Collaborative Study", *Am J Med*, 45(3), 336-353, (1968).

Guggenheim K. Y., "Chlorosis: The Rise and Disappearance of a Nutritional Disease", *J Nutr*, 125(7), 1822-1825, (1995).

Guilbert J. J., "The World Health Report 2002 - Reducing Risks, Promoting Healthy Life", *Educ Health (Abingdon)*, 16(2), 230, (2003).

Gulec S., Anderson, G. J., Collins, J. F., "Mechanistic and Regulatory Aspects of Intestinal Iron Absorption", *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 307(4), G397-409, (2014).

Gulec S., Collins, J. F., "Investigation of Iron Metabolism in Mice Expressing a Mutant Menke's Copper Transporting Atpase (Atp7a) Protein with Diminished Activity (Brindled; Mo (Br) (Y) )", *PLoS One*, 8(6), e66010, (2013).

Gulec S., Collins, J. F., "Molecular Mediators Governing Iron-Copper Interactions", *Annu Rev Nutr*, 34, 95-116, (2014).

Gulec S., Collins, J. F., "Silencing of the Menkes Copper-Transporting Atpase (Atp7a) Gene Increases Cyclin D1 Protein Expression and Impairs Proliferation of Rat Intestinal Epithelial (Iec-6) Cells", *J Trace Elem Med Biol*, 28(4), 459-464, (2014).

Gulec S., Collins, J. F., "Silencing the Menkes Copper-Transporting Atpase (Atp7a) Gene in Rat Intestinal Epithelial (Iec-6) Cells Increases Iron Flux Via Transcriptional Induction of Ferroportin 1 (Fpn1)", *J Nutr*, 144(1), 12-19, (2014).

Han O., Wessling-Resnick, M., "Copper Repletion Enhances Apical Iron Uptake and Transepithelial Iron Transport by Caco-2 Cells", *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 282(3), G527-533, (2002).

Harris Z. L., Takahashi, Y., Miyajima, H., Serizawa, M., MacGillivray, R. T., Gitlin, J. D., "Aceruloplasminemia: Molecular Characterization of This Disorder of Iron Metabolism", *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(7), 2539-2543, (1995).



Harrison P. M., Arosio, P., "The Ferritins: Molecular Properties, Iron Storage Function and Cellular Regulation", *Biochim Biophys Acta*, 1275(3), 161-203, (1996).

Hershko C., Link, G., Konijn, A. M., Ioav Cabantchik, Z., "Iron Overload and Chelation", *Hematology*, 10 Suppl 1, 171-173, (2005).

Hidalgo I. J., Raub, T. J., Borchardt, R. T., "Characterization of the Human Colon Carcinoma Cell Line (Caco-2) as a Model System for Intestinal Epithelial Permeability", *Gastroenterology*, 96(3), 736-749, (1989).

Hu Z., Gulec, S., Collins, J. F., "Cross-Species Comparison of Genomewide Gene Expression Profiles Reveals Induction of Hypoxia-Inducible Factor-Responsive Genes in Iron-Deprived Intestinal Epithelial Cells", *Am J Physiol Cell Physiol*, 299(5), C930-938, (2010).

Hurrell R. F., "Preventing Iron Deficiency through Food Fortification", *Nutr Rev*, 55(6), 210-222, (1997).

Jiang L., Ranganathan, P., Lu, Y., Kim, C., Collins, J. F., "Exploration of the Copper-Related Compensatory Response in the Belgrade Rat Model of Genetic Iron Deficiency", *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 301(5), G877-886, (2011).

Kim B. E., Nevitt, T., Thiele, D. J., "Mechanisms for Copper Acquisition, Distribution and Regulation", *Nat Chem Biol*, 4(3), 176-185, (2008).

Kim B. E., Petris, M. J., "Phenotypic Diversity of Menkes Disease in Mottled Mice Is Associated with Defects in Localisation and Trafficking of the Atp7a Protein", *J Med Genet*, 44(10), 641-646, (2007).

Klevay L. M., "Dietary Copper and Risk of Coronary Heart Disease", *Am J Clin Nutr*, 71(5), 1213-1214, (2000).

Knutson M., Wessling-Resnick, M., "Iron Metabolism in the Reticuloendothelial System", *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 38(1), 61-88, (2003).

Knutson M. D., "Iron-Sensing Proteins That Regulate Hepcidin and Enteric Iron Absorption", *Annu Rev Nutr*, 30, 149-171, (2010).

Liang E., Chessic, K., Yazdanian, M., "Evaluation of an Accelerated Caco-2 Cell Permeability Model", *J Pharm Sci*, 89(3), 336-345, (2000).

Linder M. C., Zerounian, N. R., Moriya, M., Malpe, R., "Iron and Copper Homeostasis and Intestinal Absorption Using the Caco2 Cell Model", *Biometals*, 16(1), 145-160, (2003).

Louvard D., Kedinger, M., Hauri, H. P., "The Differentiating Intestinal Epithelial Cell: Establishment and Maintenance of Functions through Interactions between Cellular Structures", *Annu Rev Cell Biol*, 8, 157-195, (1992).

Ma Y., Specian, R. D., Yeh, K. Y., Yeh, M., Rodriguez-Paris, J., Glass, J., "The Transcytosis of Divalent Metal Transporter 1 and Apo-Transferrin During Iron Uptake in Intestinal Epithelium", *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 283(4), G965-974, (2002).

Martin F., Linden, T., Katschinski, D. M., Oehme, F., Flamme, I., Mukhopadhyay, C. K., Eckhardt, K., Troger, J., Barth, S., Camenisch, G., Wenger, R. H., "Copper-Dependent



Activation of Hypoxia-Inducible Factor (Hif)-1: Implications for Ceruloplasmin Regulation", *Blood*, 105(12), 4613-4619, (2005).

McKie A. T., Barrow, D., Latunde-Dada, G. O., Rolfs, A., Sager, G., Mudaly, E., Mudaly, M., Richardson, C., Barlow, D., Bomford, A., Peters, T. J., Raja, K. B., Shirali, S., Hediger, M. A., Farzaneh, F., Simpson, R. J., "An Iron-Regulated Ferric Reductase Associated with the Absorption of Dietary Iron", *Science*, 291(5509), 1755-1759, (2001).

Meunier V., Bourrie, M., Berger, Y., Fabre, G., "The Human Intestinal Epithelial Cell Line Caco-2; Pharmacological and Pharmacokinetic Applications", *Cell Biol Toxicol*, 11(3-4), 187-194, (1995).

Muckenthaler M. U., Galy, B., Hentze, M. W., "Systemic Iron Homeostasis and the Iron-Responsive Element/Iron-Regulatory Protein (Ire/Irp) Regulatory Network", *Annu Rev Nutr*, 28, 197-213, (2008).

Nunez M. T., Alvarez, X., Smith, M., Tapia, V., Glass, J., "Role of Redox Systems on Fe<sup>3+</sup> Uptake by Transformed Human Intestinal Epithelial (Caco-2) Cells", *Am J Physiol*, 267(6 Pt 1), C1582-1588, (1994).

Pantopoulos K., "Iron Metabolism and the Ire/Irp Regulatory System: An Update", *Ann N Y Acad Sci*, 1012, 1-13, (2004).

Pourvali K., Matak, P., Latunde-Dada, G. O., Solomou, S., Mastrogiannaki, M., Peyssonnaud, C., Sharp, P. A., "Basal Expression of Copper Transporter 1 in Intestinal Epithelial Cells Is Regulated by Hypoxia-Inducible Factor 2alpha", *FEBS Lett*, 586(16), 2423-2427, (2012).

Prohaska J. R., "Role of Copper Transporters in Copper Homeostasis", *Am J Clin Nutr*, 88(3), 826S-829S, (2008).

Prohaska J. R., Gybina, A. A., "Intracellular Copper Transport in Mammals", *J Nutr*, 134(5), 1003-1006, (2004).

Ranganathan P. N., Lu, Y., Fuqua, B. K., Collins, J. F., "Immunoreactive Hephaestin and Ferroxidase Activity Are Present in the Cytosolic Fraction of Rat Enterocytes", *Biometals*, 25(4), 687-695, (2012).

Ranganathan P. N., Lu, Y., Jiang, L., Kim, C., Collins, J. F., "Serum Ceruloplasmin Protein Expression and Activity Increases in Iron-Deficient Rats and Is Further Enhanced by Higher Dietary Copper Intake", *Blood*, 118(11), 3146-3153, (2011).

Ravia J. J., Stephen, R. M., Ghishan, F. K., Collins, J. F., "Menkes Copper Atpase (Atp7a) Is a Novel Metal-Responsive Gene in Rat Duodenum, and Immunoreactive Protein Is Present on Brush-Border and Basolateral Membrane Domains", *J Biol Chem*, 280(43), 36221-36227, (2005).

Reeves P. G., DeMars, L. C., "Copper Deficiency Reduces Iron Absorption and Biological Half-Life in Male Rats", *J Nutr*, 134(8), 1953-1957, (2004).

Sambuy Y., De Angelis, I., Ranaldi, G., Scarino, M. L., Stamatii, A., Zucco, F., "The Caco-2 Cell Line as a Model of the Intestinal Barrier: Influence of Cell and Culture-Related Factors on Caco-2 Cell Functional Characteristics", *Cell Biol Toxicol*, 21(1), 1-26, (2005).



- Satake M., Enjoh, M., Nakamura, Y., Takano, T., Kawamura, Y., Arai, S., Shimizu, M., "Transepithelial Transport of the Bioactive Tripeptide, Val-Pro-Pro, in Human Intestinal Caco-2 Cell Monolayers", *Biosci Biotechnol Biochem*, 66(2), 378-384, (2002).
- Scheers N. M., Almgren, A. B., Sandberg, A. S., "Proposing a Caco-2/Hepg2 Cell Model for in Vitro Iron Absorption Studies", *J Nutr Biochem*, 25(7), 710-715, (2014).
- Scheiber I., Dringen, R., Mercer, J. F., "Copper: Effects of Deficiency and Overload", *Met Ions Life Sci*, 13, 359-387, (2013).
- Semenza G. L., "Regulation of Erythropoietin Production. New Insights into Molecular Mechanisms of Oxygen Homeostasis", *Hematol Oncol Clin North Am*, 8(5), 863-884, (1994).
- Shah Y. M., Matsubara, T., Ito, S., Yim, S. H., Gonzalez, F. J., "Intestinal Hypoxia-Inducible Transcription Factors Are Essential for Iron Absorption Following Iron Deficiency", *Cell Metab*, 9(2), 152-164, (2009).
- Sharp P., "The Molecular Basis of Copper and Iron Interactions", *Proc Nutr Soc*, 63(4), 563-569, (2004).
- Sharp P. A., "Ctr1 and Its Role in Body Copper Homeostasis", *Int J Biochem Cell Biol*, 35(3), 288-291, (2003).
- Shawki A., Anthony, S. R., Nose, Y., Engevik, M. A., Niespodzany, E. J., Barrientos, T., Ohrvik, H., Worrell, R. T., Thiele, D. J., Mackenzie, B., "Intestinal Dmt1 Is Critical for Iron Absorption in the Mouse but Is Not Required for the Absorption of Copper or Manganese", *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 309(8), G635-647, (2015).
- Sternlieb I., "Wilson's Disease", *Clin Liver Dis*, 4(1), 229-239, viii-ix, (2000).
- Stremmel W., Karner, M., Manzhali, E., Gilles, W., Herrmann, T., Merle, U., "Liver and Iron Metabolism--a Comprehensive Hypothesis for the Pathogenesis of Genetic Hemochromatosis", *Z Gastroenterol*, 45(1), 71-75, (2007).
- Tumer Z., Moller, L. B., "Menkes Disease", *Eur J Hum Genet*, 18(5), 511-518, (2010).
- Vulpe C. D., Kuo, Y. M., Murphy, T. L., Cowley, L., Askwith, C., Libina, N., Gitschier, J., Anderson, G. J., "Hephaestin, a Ceruloplasmin Homologue Implicated in Intestinal Iron Transport, Is Defective in the Sla Mouse", *Nat Genet*, 21(2), 195-199, (1999).
- Waterman M. R., Simpson, E. R., "Regulation of the Biosynthesis of Cytochromes P-450 Involved in Steroid Hormone Synthesis", *Mol Cell Endocrinol*, 39(2), 81-89, (1985).
- Wilson G., "Cell Culture Techniques for the Study of Drug Transport", *Eur J Drug Metab Pharmacokinet*, 15(2), 159-163, (1990).
- Wyman S., Simpson, R. J., McKie, A. T., Sharp, P. A., "Dcytb (Cybrd1) Functions as Both a Ferric and a Cupric Reductase in Vitro", *FEBS Lett*, 582(13), 1901-1906, (2008).
- Xie L., Collins, J. F., "Transcriptional Regulation of the Menkes Copper Atpase (Atp7a) Gene by Hypoxia-Inducible Factor (Hif2{Alpha}) in Intestinal Epithelial Cells", *Am J Physiol Cell Physiol*, 300(6), C1298-1305, (2011).



Yin L., Vijaygopal, P., MacGregor, G. G., Menon, R., Ranganathan, P., Prabhakaran, S., Zhang, L., Zhang, M., Binder, H. J., Okunieff, P., Vidyasagar, S., "Glucose Stimulates Calcium-Activated Chloride Secretion in Small Intestinal Cells", *Am J Physiol Cell Physiol*, 306(7), C687-696, (2014).

Yun S., Habicht, J. P., Miller, D. D., Glahn, R. P., "An in Vitro Digestion/Caco-2 Cell Culture System Accurately Predicts the Effects of Ascorbic Acid and Polyphenolic Compounds on Iron Bioavailability in Humans", *J Nutr*, 134(10), 2717-2721, (2004).

Zerounian N. R., Linder, M. C., "Effects of Copper and Ceruloplasmin on Iron Transport in the Caco 2 Cell Intestinal Model", *J Nutr Biochem*, 13(3), 138-148, (2002).

Zhu L., Glahn, R. P., Yeung, C. K., Miller, D. D., "Iron Uptake by Caco-2 Cells from Nafeedta and Feso4: Effects of Ascorbic Acid, Ph, and a Fe(li) Chelating Agent", *J Agric Food Chem*, 54(20), 7924-7928, (2006).

**TÜBİTAK**  
**PROJE ÖZET BİLGİ FORMU**

Proje Yürütücüsü:	Yrd. Doç. Dr. ŞÜKRÜ GÜLEÇ
Proje No:	215Z041
Proje Başlığı:	Bakır Mineralinin Anemi Durumundaki Dengeleyici ve Düzeltici Etkisinin Moleküler ve Genetik Düzeyde İnsan Enterosit Hücre Modelinde Araştırılması
Proje Türü:	1002 - Hızlı Destek
Proje Süresi:	12
Araştırmacılar:	
Danışmanlar:	
Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi:	İZMİR YÜKSEK TEKNOLOJİ ENS. MÜHENDİSLİK F. GIDA MÜHENDİSLİĞİ B.
Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri:	15/02/2016 - 15/08/2017
Onaylanan Bütçe:	30000.0
Harcanan Bütçe:	29499.63
Öz:	<p>Demir eksikliğine bağlı anemi, dünyadaki besin eksikliğinin neden olduğu hastalıklar arasında ilk sırada yer alan bir problemdir. Bu yüzden anemik durumu dengeleyici veya düzeltici faktörlerin bilinmesi demir metabolizmasının anlaşılması için önemlidir. Demir eksikliği anemisinde bağırsak enterosit hücrelerinde bakır seviyesinin arttığı gösterilmiştir ve bu da bakırın demir eksikliği anemisindeki durumu düzeltici etkisi olabileceğini düşündürmektedir. Bu bağlamda projede bakır mineralinin demir eksikliğine bağlı oluşturulan anemik durumdaki düzeltici etkisi moleküler ve genetik düzeyinde insan enterosit hücre modelinde (Caco-2) incelendi. Projenin ilk kısmında Caco-2 hücreleri 12 bölmeli steril hücre kaplarında 21 gün süre ile büyütüldü. İkinci kısımda, besinden gelen ve kandaki bakırın etkisinin in vitro olarak test edilebilmesi için insan bağırsak sistemi modellendi. Bunun için Caco-2 hücreleri özel membranlarda büyütülerek polarize olmaları sağlandı. Daha sonra hücrelere deferoksamin (DFO) verilerek demir eksikliğine bağlı anemi oluşturuldu. Hücreler bakır ve demir ile muamele edildi. Örneklerden RNA izolasyonu yapıp, cDNA dönüşümü gerçekleştirildi. Bunu takiben RT-qPCR metodu ile gruplar arasındaki belirli genlerin mRNA ekspresyon seviyelerine bakıldı. Dmt1 ve Ftn genlerine ait mRNA regülasyonlarının hücre kültürü kabında ve membran sisteminde büyüyen hücreler arasında farklı olduğu gözlemlendi. Membran sistemindeki sonuçlara göre, bakırın demir eksikliği anemisinde artan Fpn ve Dmt1 genlerinin mRNA seviyelerini düşürdüğü saptandı. Daha da önemlisi bu anlamlı azalma, bakırın polarize olmuş hücrelerin yalnızca bazolateral kısmına verilmesiyle gözlemlenmiştir. Bu da kandaki bakırın demir eksikliği anemisinde bağırsak demir homeostazının hücre içi moleküler mekanizmasını etkilediğini göstermektedir. Buna ilaveten, kontrol grubuyla kıyaslandığında bakırın anemik koşullar altında regüle olan Ankrd37 ve Egl3 genlerinin mRNA ekspresyonlarını etkilemediği bulunmuştur. Projede anemi durumunda demir mineralinin bakır metabolizmasındaki genlere etkisi de incelenmiştir. Anemi durumunda bazolateral kısma verilen demir bakır ile regüle olan genler içinde yalnızca Atp7a mRNA ekspresyonunu etkilemektedir. Elde edilen bulgular, kandaki bakırın diyetten gelen bakıra göre enterosit hücrelerinde demir eksikliği anemisini azaltmada daha etkili olabileceğini göstermektedir. Bakır, anemi durumunda demir mineraline bağlı regüle olan Fpn ve Dmt1 genlerinin mRNA ekspresyonlarını enterosit hücrelerinin basolateral kısımları üzerinden etkilemektedir. Anemide Fpn ve Dmt1 genlerini regüle etmek için kandaki bakır tarafından etkilenebilen moleküler mekanizmaların neler olduğunu ortaya çıkaran fonksiyonel çalışmalara ihtiyaç vardır.</p>
Anahtar Kelimeler:	Bakır, demir, anemi, enterosit, ferroportin (Fpn), divalent metal transporter 1 (Dmt1)
Fikri Ürün Bildirim Formu Sunuldu Mu?:	Hayır