

T.C.
NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KLOTHO GENİNİN METİLASYON DÜZEYİ İLE BESLENME
ALİŞKANLIĞI ARASINDAKİ İLİŞKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Esra KARATAŞ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Mehmet GÜRBİLEK

KONYA - 2019

T.C.
NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KLOTHO GENİNİN METİLASYON DÜZEYİ İLE BESLENME
ALİŞKANLIĞI ARASINDAKİ İLİŞKİNİN ARAŞTIRILMASI**

Esra KARATAŞ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Mehmet GÜRBİLEK

“Proje desteği varsa destekleyen kuruluş ve proje no
Bu araştırma Necmettin Erbakan Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından
181318008 proje numarası ile desteklenmiştir.

KONYA - 2019

TEZ ONAY SAYFASI

Necmettin Erbakan Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans Öğrencisi **Esra KARATAŞ**'ın "**Klotho Geninin Metilasyon Düzeyi İle Beslenme Alışkanlığı Arasındaki İlişkinin Araştırılması**" başlıklı tezi tarafımızdan incelenmiş; amaç, kapsam ve kalite yönünden Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Konya, Türkiye / 12.07.2019

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Mehmet GÜRBİLEK

N. E. Ü. Meram Tıp Fakültesi

Tıbbi Biyokimya AD

İmzası

Jüri Üyesi

Prof. Dr. Ali Muhtar TİFTİK

N. E. Ü. Meram Tıp Fakültesi

Tıbbi Biyokimya AD

İmzası

Jüri Üyesi

Prof. Dr. Tülün ÇORA

Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi

Tıbbi Genetik AD

İmzası

Yukarıdaki tez, Necmettin Erbakan Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunun **01/08/2019** tarih ve **16./19.** sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Kısmet Esra NURULLAHOĞLU ATALIK

Enstitü Müdürü

İmzası

APPROVAL

We certify that we have read this dissertation entitled “**A Study of the Relationship Between Metilation Level of Klotho Gene and Dietary Habits**” by “**ESRA KARATAŞ**” that in our opinion it is fully adequate, in scope and quality, as dissertation for the degree of Master of Science in the Department of “**Medical Biochemistry**”, Institute of Health Sciences, University of Necmettin Erbakan Konya ,Turkey / 12.07.2019

Principal Advisor

Prof. Dr. Mehmet GÜRBİLEK

N. E. Ü. Meram Tıp Fakültesi

Tıbbi Biyokimya AD

Signature

Examination Committee Member

Prof. Dr. Ali Muhtar TİFTİK

N. E. Ü. Meram Tıp Fakültesi

Tıbbi Biyokimya AD

Signature

Examination Committee Member

Prof. Dr. Tülün ÇORA

Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi

Tıbbi Genetik AD

Signature

This thesis has approved for the University of Necmettin Erbakan Institute of Health Sciences.

Prof. Dr. Kısmet Esra NURULLAHOĞLU ATALIK

Director of Institute of Health Sciences

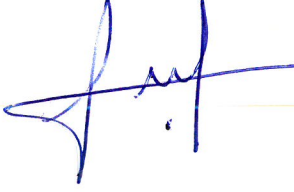
Date and Signature

BEYANAT

Bu tezin tamamının kendi çalışmam olduğunu, planlanmasından yazımına kadar hiçbir aşamasında etik dışı davranışımın olmadığını, tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları kaynaklar listesine aldığımı, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

12/07/2019

Esra KARATAŞ



[Ödevler](#)[Öğrenciler](#)[Not Defteri](#)[Kütüphaneler](#)[Takvim](#)[Tartışma](#)[Tercihler](#)

Bu sayfa hakkında

Bu sizin ödev kutunuzdur. Bir yazılı ödevi görüntülemek için yazılı ödevin başlığını seçin. Bir Benzerlik Raporunu görüntülemek için yazılı ödevin benzerlik sütunundaki Benzerlik Raporu ikonunu seçin. Tıklanabilir durumda olmayan bir ikon Benzerlik Raporunun henüz oluşturulmadığını gösterir.

KLOTHO GENİNİN METİLASYON DÜZEYİ İLE BESLENME ALIŞ...

Gelen Kutusu | Görüntüleniyor: yeni ödevler ▼

Dosyayı Gönder Çevrimiçi Derecelendirme Raporu | Ödev ayarlarını düzenle | E-posta bildirmeyenler

[Sil](#) [İndir](#) [Şuraya taşı...](#)

<input type="checkbox"/>	Yazar	Başlık	Benzerlik	web	yayın	student papers	Puanla	cevap	Dosya	Ödev Numarası	Tarih
<input type="checkbox"/>	Esra Karataş	Tez	%24 <input type="text" value="%24"/>	22%	11%	7%	--	--	ödev indir	1145515941	20-Haz-2019

M. G. Gülbilge
prof. Dr. Mehmet Gürbilge

TEŞEKKÜR

Sonuna gelmiş olduğum yüksek lisans eğitimim boyunca, çalışmamın seçiminde, hazırlanmasında ve araştırmaların yürütülmesinde yardımını esirgemeyen daima bana yol gösteren kıymetli Hocam Prof. Dr. Mehmet GÜRBİLEK'e sonsuz saygı ve şükranlarımı sunarım.

Anabilim dalı başkanı Prof. Dr. Mehmet AKÖZ'e Tez proje değerlendirmesindeki katkıları, vakaların seçiminde katkılarından dolayı Dr. Öğr. Üyesi Elif YILDIRIM'a İstatistik verilerinin analizi çalışmalarındaki katkıları için Doç. Dr. Mehmet UYAR'a ve numunelerin toplanması sürecindeki katkılarından dolayı Öğretim Görevlisi Cemile TOPCU'ya sonsuz saygı ve şükranlarımı sunarım.

Hayatım boyunca maddi ve manevi himayelerini benden hiçbir zaman esirgemeyen sevgili Babacığım Ramazan KARATAŞ'a ve Anneciğim Ayşe KARATAŞ'a minnettar olduğumu belirtir en derin saygı ve şükranlarımı saygılarımla sunarım.

Esra KARATAŞ

2019

İÇİNDEKİLER

<i>İç Kapak</i>	<i>ii</i>
<i>Tez Onay Sayfası</i>	<i>iii</i>
<i>Teşekkür</i>	<i>vii</i>
<i>İçindekiler</i>	<i>viii</i>
<i>Özet</i>	<i>xi</i>
<i>Abstract</i>	<i>xii</i>
<i>Simgeler ve Kısaltmalar</i>	<i>xiii</i>
<i>Şekiller Listesi</i>	<i>xvi</i>
<i>Tablolar Listesi</i>	<i>xix</i>
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Yaşlanma Üzerine Etkili Olan Faktörler	3
2.1.1. Yaşlanma Üzerine Etkili Olan Genetik Faktörler	3
2.1.1.1. Deneysel Modellerde Belirlenen Genler	3
2.1.1.1.1. Memeli Sirtuinleri	6
2.1.1.1.2. Telomer-Telomerez Aktivitesi	6
2.1.1.1.3. Somatik Mutasyon Teorisi	8
2.1.1.1.4. Apolipoprotein E Alleli	8
2.1.1.1.5. Erken Yaşlanma Sendromları	8
2.1.1.1.6. Epigenetik Mekanizmalar	10
2.1.2. Yaşlanma Üzerine Etkili Olan Diğer Faktörler	19
2.1.2.1. Çevresel Faktörler ve Kalori Kısıtlaması	19
2.1.2.2. Oksidatif Stres (Serbest Radikal) Teorileri	20
2.2. DNA Metilasyonu	22
2.2.1. Yaşlanma Sürecinde DNA Metilasyon Dinamikleri	26

2.2.2. Epigenetik Saate Karşı Epigenetik Drift: DNA Metilasyonu ve Yaşlanma Arasındaki İlişkinin Altında Yatan İki Olgu.....	27
2.2.3. DNA Metilasyonu ve Yaşlanma	28
2.3. Histon Modifikasyonu	30
2.3.1. Histon Asetilasyonu/Deasetilasyon.....	30
2.3.2. Histon Metilasyonu/Demetilasyon	33
2.4. Mikro (mi) RNA'ların Ekspresyonu	36
2.5. Klotho Geni ve Bu Gen Üzerinden Kodlanan Proteinler.....	38
2.5.1. Enerji Metabolizmasında Klotho'nun Rolü.....	42
2.5.2. Adipogenez Regülasyonu.....	43
2.5.3. Obezite Regülasyonu.....	45
2.5.4. Glukoz Metabolizması.....	47
2.5.5. Fosfat Metabolizması.....	49
3. GEREÇ ve YÖNTEM.....	51
3.1 Gereç.....	51
3.1.1. Örneklem Grubunun Oluşturulması.....	51
3.1.2. Materyallerin Toplanması.....	52
3.1.3. Kullanılan Kimyasallar	52
3.1.4. Kullanılan Cihazlar.....	52
3.2. Yöntem.....	56
3.2.1. DNA İzolasyonu	56
3.2.2. Real Time PCR Protokolü	57
3.2.3. Bisülfid Modifikasyonu.....	60
3.3. Antropometrik Analizler.....	73
3.4. İstatistik Analiz	73
4. BULGULAR.....	73
4.1. Analiz Sonuçları ve İstatiksel Değerlendirme	73

5. TARTIŞMA	82
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	90
7. KAYNAKLAR	91
8. EKLER	114
<i>Ek A. Etik Kurul Kararı</i>	<i>114</i>
<i>Ek B. Gönüllü Onam Formu</i>	<i>115</i>
<i>Ek C. Besin Tüketim Sıklığı Saptama Formu</i>	<i>116</i>
9. ÖZGEÇMİŞ	119

ÖZET

T.C.

NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Klotho Geninin Metilasyon Düzeyi ile Beslenme Alışkanlığı Arasındaki İlişkinin Araştırılması
Esra KARATAŞ

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KONYA - 2019

Bu çalışmada, besin tüketim sıklığı ile karbonhidrat beslenen bireylerde ve protein beslenen bireylerde, Klotho geninin metilasyon düzeyi ile beslenme alışkanlığı arasındaki ilişkinin yaşlanmaya etkisi araştırıldı.

Başlangıçta kan değerleri normal ve sağlıklı bireyler ile iletişim sağlandı. Çalışmanın kapsamı, amacı, iletişim sağlanan bireylere anlatılarak, kabul eden ve onamları alınan bireyler çalışmaya dahil edildi. Yirmi kişiden oluşan örneklem grubumuzda on kişi karbonhidrat beslenen ve on kişi protein beslenenler şeklinde iki grup oluşturuldu. Bireylerin kan numunelerinde Klotho geninin metilasyon düzeyi; DNA izolasyonu, RT-PCR, Bisülfid Modifikasyonu yöntemi ile araştırıldı.

Çalışmamızın karbonhidrat diyet grubunda; yağ yüzdesi ile metilasyon yüzdesi arasında çok kuvvetli anlamlı ve ters bir korelasyon saptandı ($r = -0.765$, $p = 0.05$). Karbonhidrat yüzdesi ile metilasyon yüzdesi arasında çok kuvvetli aynı yönlü korelasyon saptandı ($r = 0.778$, $p = 0.004$). BMI ile metilasyon yüzdesi arasında kuvvetli aynı yönlü anlamlı bir korelasyon saptandı ($r = 0.712$, $p = 0.01$). Kolesterol yüzdesi ile metilasyon yüzdesi arasında kuvvetli ters yönlü anlamlı bir korelasyon saptandı ($r = -0.556$, $p = 0.04$). Protein diyet grubunda ise BMI ile metilasyon arasında kuvvetli anlamlı ters korelasyon saptandı ($r = -0.635$, $p = 0.024$). Klotho gen ekspresyon seviyeleri açısından her iki grupta da anlamlı korelasyon saptanmadı ($p > 0.05$).

Çalışmamızın analiz sonucunda, karbonhidrat beslenen bireylerin Klotho geni metilasyon yüzdesi protein beslenen bireylerin Klotho geni metilasyon yüzdesinden daha yüksek bulundu. Elde ettiğimiz bu veri karbonhidrat tüketimi arttıkça Klotho geni metilasyon düzeyinin arttığı sonucuna ulaştırdı. Beslenme alışkanlığı Klotho geni metilasyon seviyesini etkilemiş ancak Klotho geninin metilasyon düzeyi ile beslenme alışkanlığı arasındaki ilişkinin yaşlanmaya etkisinin daha net anlaşılması için daha ileri çalışmaların yapılması gerekmektedir.

Anahtar Sözcükler: Diyet; Klotho; Karbonhidrat; Metilasyon; Protein

ABSTRACT

REPUBLIC of TURKEY
NECMETTİN ERBAKAN UNIVERSITY
HEALTH SCIENCES INSTITUTE

A Study of the Relationship Between Metilation Level of Klotho Gene and Dietary Habits

Esra KARATAŞ

Department of Medical Biochemistry

MASTER THESIS

KONYA - 2019

In this study, the effect of the relationship between methylation level and nutritional habits of Klotho gene on aging and carbohydrate-fed individuals and protein-fed individuals was investigated.

Initially, communication with normal and healthy individuals was achieved. The scope and purpose of the study were explained to the individuals who were communicated, and the individuals who accepted and gave their consent were included in the study. In our sample group consisting of 20 people, two groups were formed as ten people fed carbohydrates and ten people fed protein. Methylation level of Klotho gene in blood samples of individuals; DNA isolation, RT-PCR and Bisulfite Modification were investigated.

In the carbohydrate diet group; There was a very strong and inverse correlation between fat percentage and methylation percentage ($r = -0.765$, $p = 0.05$). There was a strong correlation between carbohydrate percentage and methylation percentage ($r = 0.778$, $p = 0.004$). A strong correlation was found between BMI and methylation percentage ($r = 0.712$, $p = 0.01$). There was a strong inverse correlation between cholesterol percentage and methylation percentage ($r = -0.556$, $p = 0.04$). In the protein diet group, there was a strong inverse correlation between BMI and methylation ($r = -0.635$, $p = 0.024$). There was no significant correlation between klotho gene expression levels in both groups ($p > 0.05$).

As a result of the analysis of our study, the percentage of methylation of Klotho gene methylation in carbohydrate fed individuals was higher than the percentage of methylation of Klotho gene in protein fed individuals. Our data showed that as the carbohydrate consumption increases, the methylation level of Klotho gene increases. Nutritional habits influenced the methylation level of Klotho gene, but further studies are needed to understand the effect of Klotho gene methylation level and nutritional habits on aging.

Keywords: Diet; Methylation; Protein; Carbohydrate; Klotho

SİMGELER VE KISALTMALAR

ADAM 10	: A Disintegrin And Metalloproteinase 10
AMPK	: Adenozin Monofosfata Bağımlı Protein Kinaz
APOE	: Apolipoprotein E
Arg	: Arjinin
ART	: mono-ADP-ribosil transferaz
BaF3 Hücreleri	: IL-3'e yanıt veren ölümsüzleştirilmiş murin kemik iliği yetersizliği olan pro-B hücre dizisi
Bmi1	: B hücresine özgü moloney fare lösemi virüsü entegrasyonu bölgesi
DAC	: NAD ⁺ bağımlı deasetilaz
Daf 2	: Dauerformation 2
Daf	: Dauerformation
DNMT	: DNA Metil transferaz
ER	: Östrojen Reseptör
ERCs	: ekstrakromozomal rDNA halkaları
EZH2	: Enhancer of zeste Homolog 2
FABP4	: Fatty Acid Binding Protein 4
FGF	: Fibroblast growth factor
FGF-21	: Fibroblast growth factor reseptor 21
FGF-23	: Fibroblast growth factor reseptor 23
FGFR	: Fibroblast growth factor reseptor
FGFR1c	: Fibroblast growth factor reseptor 1c isoform
FGS2α	: Fibroblast Growth Factor Reseptor Substrate 2 α
FOXO	: Forkhead box transcription factors of the class O
GLUT1	: Glucose Transporter Type1
H3K36me3	: Lizin 36 üzerinde tri metile olan H3
H3K4	: Histon 3 Lizin 4
H4K20me	: Lizin 20 üzerinde metile olan H4
HAT	: Histon asetil transferaz
HDAC	: Histon deasetilaz
HDL	: Yüksek Dansiteli Lipoprotein
HGPS	: Hutchinson Gilford Progeri Sendromu
HIF1	: Hipoksi İndüklenebilir Faktör 1
HMT	: histon metil transferaz

HP1	: Heterokromatin Proteini-1
IGF	: İnsülin benzeri büyüme faktörü
IGF1	: İnsülin benzeri büyüme faktörü 1
İnk4a/ARF	: İnhibitor of cyclin-dependent kinase 4a / alternative reading frame
Kbç	: kilobaz çift
Kd	: Kilo dalton
KL	: Klotho
LDL	: Düşük Dansiteli Lipoprotein
Line1	: Long Interspersed Element1
LTP	: Hippocampal Long-Term Potentiation
Lys	: Lizin
MAPK	: Mitogen Activated Protein Kinase
MAPK1	: Mitogen Activated Protein Kinase1
MAPK2	: Mitogen Activated Protein Kinase2
MAPK3	: Mitogen Activated Protein Kinase3
MECP2	: Methyl-CpG-Binding Protein-2
miRNA	: Mikro RNA
ncRNA	: Kodlanmayan (noncoding) RNA
OLEFT	: Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
Phex	: Phosphate regulating gene with homologies to endopeptidases on the X-chromosome
PK	: Protein Kinazlar
PP	: Protein Fosfatazlar
PPAR	: Proksizom Proliferatör-Aktive Reseptör
pRb, p107 ve p130	: Retinoblastoma Aile Proteinleri
PRC	: Polcmb Repressive Complex
PRC1	: Polcmb Repressive Complex 1
PRC2	: Polcmb Repressive Complex 2
RB	: Retinoblastoma Proteini
ROÜ	: Reaktif oksijen ürünleri
RT-PCR	: Real-Time Polymerase Chain Reaction
SAH	: S-adenosil homosistein
SAM	: S-Adenozil Metiyonin
SAMP8	: Senesens-Hızlandırılmış Pron Fare 8

shRNA	: Small hairpin RNA
SIRT	: Sirtuin
Sir-2	: Silent Information Regulator-2
siRNA	: Small interfering RNA
SUMO	: Small ubiquitin-like modifier
Suv4-20h1	: Suppressor of variegation 4-20 homolog1
Suv4-20h2	: Suppressor of variegation 4-20 homolog2
T2DM	: Tip 2 Diyabetes Mellitus
TET	: Ten Eleven Translocation
TOR	: Target of rapamycin
Ub	: Ubiquitin
Ucp1	: Uncoupling Protein 1
VDREs	: D Vitaminine Cevap Veren Aday Elementler
Δ	: Delta

ŞEKİLLER LİSTESİ

- Şekil 2.1.** Sirtuinler (<https://commons.wikimedia.org/wiki/File:1SZD.png>)..... 4
- Şekil 2.2.** Hutchinson-Gilford Progeri Sendromunu (HGPS) (<http://progeriafamilycircle.blogspot.com.tr/p/symptoms.html>)..... 9
- Şekil 2.3.** Werner Sendromu (<http://humanandscience1.blogspot.com.tr/2015/05/yaslanma-engellenebilir-mi.html>).....10
- Şekil 2.4.** DNA ile çevrelenmiş histonlar oktomeri ile oluşturulmuş bir nükleozom diyagramıdır (Gonzalo 2010).12
- Şekil 2.5.** Kromatin organizasyonunda gen ekspresyonunu etkileyen tersine döndürülebilir değişimler (Orcan 2006).....12
- Şekil 2.6.** 4 Histon kuyruğu, onlara karşılık gelen spesifik kalıntılardaki posttranslasyonel modifikasyonlar ile birlikte gösterilmektedir (Gonzalo 2010).....13
- Şekil 2.7.** DNA Metilasyonu: DNA metil transferazlar, DNA'daki sitozin bazının 5. karbon atomuna SAM'den metil grubunun transferini kataliz eder, 5-metil sitozin ve SAH oluşur (Çağlayan ve Turan 2014).16
- Şekil 2.8.** Ökromatin ve heterokromatin bölgelerindeki farklılıklar (Gonzalo 2010).18
- Şekil 2.9.** Bazı reaktif oksijen ürünleri (Martin 1997).....21
- Şekil 2.10.** Reaktif oksijen ürünlerin oluşumu (Martin 1997).21
- Şekil 2.11.** DNMT'ler tarafından sitozin metilasyonunu (5mC) ve TET'ler tarafından 5mC'nin demetilasyonunu içeren DNA Sitozin (C) modifikasyon yolu, nöronal gen ekspresyonunu regüle etmekte ve böylece bilişsel fonksiyonları da regüle etmektedir (Wilson ve ark. 1987; Singhal ve ark. 1987; Wilson ve Jones 1983).....23
- Şekil 2.12.** Epigenetik drift ve epigenetik saatin şekil gösterimi (Jones ve ark. 2015)..... 28
- Şekil 2.13.** Epigenetik yaş ile kronolojik yaş arasında uyum ya da uyumsuzluk, gelecekteki sağlık durumunun bir göstergesi olabilir (Meaghan ve ark. 2015).30
- Şekil 2.14.** İnsan KL geni (A) ve bu gen üzerinden, alternatif işlenme sonucu kodlanan membran bağlı KL proteini (B) ve salgılanan KL proteini (C) yapısı. Klotho geninin lokasyonu 'LocusID-NCBI'a göre verilmiştir (Çağlayan ve Turan 2014)....40
- Şekil 2.15.** Transmembran KL proteinin ekstrasellüler bölgesinin ADAM metalloproteaz enzimleri tarafından kesilmesi sonucu çözünür formda KL proteininin oluşması (A). FGF23 hormonu için KL proteinin kofaktör olarak işlev görmesi (B) (Çağlayan ve Turan 2014).....41
- Şekil 2.16.** Klotho'nun adiposit gelişimine potansiyel etkisidir. Adipositler MSC'lerden iki olgunlaşma aşamasıyla oluşurlar. WNT ve δ FosB, MSC'lerin adipoblastlara farklılaşmasında yer alırlarken; PPAR- γ , preadipositlerin adipositlere farklılaşmasını yönetmektedir. Klotho potansiyel olarak hem MSC'lerin adipojenik soy bağlılığını hem de adipositik olgunlaşmayı etkileyebilmektedir. Fakat bu roller deneysel olarak onaylanmayı beklemektedir (MSC: Mezenkimal Kök Hücre) (Razzaque 2012).44

Şekil 2.17. Klotho inaktivasyonunun fizyolojik etkileridir. a) KL-nakavt fareleri (KL ^{-/-}) boyut ve ağırlık olarak doğal tip farelere göre daha küçüktür, bu durum kısmi olarak adipoz doku akümüasyonu eksikliğinden kaynaklanmaktadır. b) KL-nakavt fareleri (KL ^{-/-}) hipoglisemiktir. Daha düşük insülin konsantrasyonuna sahip olmalarına rağmen P<0.001. aynı zamanda, doğal tiplerden ‡P<0.05 ve bu yüksek insülin hassasiyetine sahip olduklarını göstermektedir (100 mg/dl glucose=5.55 mmol/l; 100 pg/ml insulin=0.02 pmol/l) (Razzaque 2012).....	47
Şekil 2.18. Klotho'nun karaciğer yapısına etkileridir. ciğer kesitleri hematoksinin ve eozin ile boyanmıştır (×40 büyütülmüştür). a) Doğal tip fareler. b) KL ^{-/-} fareleri. c) Leptin eksikliği olan Lep ^{ob/ob} obez fareler. d) KL ^{-/-} Lep ^{ob/ob} çift-nakavt fareleri. KL eksikliği olan fare gruplarının ciğer kesitlerinin hiç birinde steatoz görülmemiştir (Ohnishi ve ark. 2011; Haluzik ve ark. 2004).....	49
Şekil 3.1. Elektroforez Tankı ve Güç Kaynağı (Life Technologies Model:4001P)...	53
Şekil 3.2. Transillumination Cihazı (GeneDireX).....	54
Şekil 3.3. PCR cihazı (Applied Biosystems ProFlex).....	54
Şekil 3.4. Real-Time PCR Cihazı (Applied Biosystems ve Step One Plus).....	55
Şekil 3.5. Örneklerin Plate üzerindeki yerleşimi.....	59
Şekil 3.6. DNA izolasyonu için numunelerin hazırlanması.....	62
Şekil 3.7. DNA izolasyon çalışılması.....	63
Şekil 3.8. Numunelerde DNA izolasyon çalışılma süreci.....	63
Şekil 3.9. RNA izolasyonu için numunelerin hazırlanması.....	64
Şekil 3.10. Numunelerin vortekslenmesi.....	65
Şekil 3.11. Numunelerin ısı bloğunda bekletilmesi.....	66
Şekil 3.12. Numunelerin santrifüj cihazına yerleştirilmesi.....	66
Şekil 3.13. RT-PCR çalışması için numunelerin hazırlanması.....	67
Şekil 3.14. Numunelerin RT-PCR dizaynına göre plate'e aktarılması.....	68
Şekil 3.15. RT-PCR çalışması için numuneler plate aktarıldıktan sonra plate'te hava boşluklarının giderilmesi.....	69
Şekil 3.16. Numunelerin RT-PCR'de çalışılması.....	70
Şekil 3.17. Bisülfid modifikasyon çalışması için numunelerin hazırlanması.....	71
Şekil 3.18. PCR çalışması için numunelerin hazırlanması.....	71
Şekil 3.19. PCR cihazında numunelerin çalışılması.....	72
Şekil 4.1. Üst kısımda metile alt kısımda unmetile primerleriyle çalışılan örnekler yer almaktadır. Örnek sırası alt sıra içinde geçerlidir.....	74
Şekil 4.2. MC-15-16 numaralı örnekler metile primer ile UC-WC-15-16 numaralı örnekler unmetile primer ile UC-WC-MC kontrol DNA kontrol primer setleri ile son 3 sırada yer alan MC-UC-WC bisülfid DNA'lar kontrol primer setleri ile çalışıldı...75	75
Şekil 4.3. İlk grup metile diğer grup unmetile primerleri ile çalışıldı.....	76
Şekil 4.4. Unmetile kontrol DNA ve 12 numaralı örnekler Klotho M ve U primerlerine ait jel görüntüsü.....	77

Şekil 4.5. Karbonhidrat beslenenlerde vakalardaki % metilasyon dağılımı.	78
Şekil 4.6. Protein beslenenlerde vakalardaki % metilasyon dağılımı.....	79
Şekil 4.7. Karbonhidrat beslenenlerde Klotho ΔC_T dağılımı.....	79
Şekil 4.8. Protein beslenenlerde Klotho ΔC_T dağılımı.	80
Şekil 4.9. Karbonhidrat ve Protein grubunun metilasyon % değerleri grafiği. Gruplar arasında fark $P=0.004$ bulundu.....	80
Şekil 4.10. Karbonhidrat ve Protein grubunun Klotho ΔC_T değerleri grafiği. Gruplar arasında fark $P>0.05$ bulundu.....	81

TABLolar LİSTESİ

Tablo 2.1: Epigenetik Mekanizmalar ve Kanser Tedavisinde Epigenetik Yaklaşımlar Derlemesinden Tablolaştırılmıştır (İzmirli 2013).....	11
Tablo 2.2. Kalori kısıtlaması sonucunda gözlenen değişikliklerden bazıları (Karan ve Tufan 2010).	20
Tablo 2.3. Yaşlanma ve kanserde histon modifiye edici aktiviteler. Histon modifiye edici aktivitelerin ana bölümleri listesi, onların spesifik aktivitelerini ve hücrel fonksiyonlarını göstermektedir (Gonzalo 2010).....	35
Tablo 2.4. Yaşlanma ve kanserde noncoding RNA'lar [micro-RNA'lar (miRNA'lar)] (Gonzalo 2010).....	37
Tablo 4.1. Diyet yağ %, diyet karbonhidrat %, BMI ve kolesterol ile metilasyon % arasındaki korelasyon değerleri.	78
Tablo 4.2. BMI ile metilasyon % arasındaki korelasyon değerleri.....	78

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Dünya Sağlık Örgütüne (WHO) göre yaşlılık; çevresel faktörlere uyum sağlayabilme yeteneğinin azalmasıdır. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) yaşlılık dönemini 65 yaş ve üzeri grubun alınmasını tavsiye etmektedir. Ancak 65 yaş ve üzeri dönemin kendi içinde bir takım farklılıklar bulunması nedeniyle 65-74 yaş (genç yaşlı), 75-84 yaş (yaşlı) ve 85 ve üzeri dönem (ileri yaşlı) olarak ayrılmaktadır (Güler ve Akın 2006; Erbaş ve Akın 2008; Yahyaoğlu 2013).

Yaşlanma; kronolojik, biyolojik, fizyolojik, sosyal ve psikolojik boyutları olan, doğumdan başlayıp ölüme kadar süren, kaçınılmaz olan bir büyüme ve gelişme sürecidir. Organizmanın molekül, hücre, doku, organ ve sistem düzeyinde, zamanın ilerlemesi ile meydana gelen, geri dönüşü olmayan, yapısal ve işlevsel değişikliklerin tümü olarak tanımlanmaktadır (Saygılı 2011). Bu sürecin ilerleyiş hızı canlının çevre ile olan etkileşimi ve kendi kalıtsal özelliklerine bağlı olarak değişir. Bu nedenle; yaşlanma olayı ortalama belirli bir süreç içerisinde ilerler kimi bireyler daha hızlı, kimi bireyler ise daha geç yaşlanır (Herskind ve ark. 1996).

Ancak insanlar için yaşlanma sürecini etkileyen çevresel faktörlerin başında beslenme alışkanlığı ve kalitesi, içki ve sigara alışkanlığı, yaşanılan ortamın kalitesi (hava ve su gibi) gelmektedir (Herskind ve ark. 1996). Genetik faktörler oldukça karmaşıktır. Farklı metabolik yollarla ilgili birçok gen bu süreci pozitif veya negatif yönde etkilemektedir (Herskind ve ark. 1996). Bireylerin yetersiz ve dengesiz beslenmesi sonucunda bir takım mutasyonlar ve modifikasyonlar meydana gelerek gen ifadesi değişebilmektedir. Proteinden fakir, karbonhidratça zengin yada kalori oranı düşük beslenme yada aşırı kalorili beslenme tipleri gen anlatımındaki değişikliğe sebebiyet verebilmektedir. Genlerde gelişen bu değişimlerin sonucunda bir takım metabolik değişiklikler gelişmektedir, gelişen bu değişimler sonucunda metabolik hastalıklar (şeker hastalığı, obezite, kalp hastalıkları vb.) görülmektedir (Sırıken ve ark. 2018).

Klotho proteini, adiposit gelişimi ve sistemik glukoz metabolizmasında görev alabilmektedir. Klotho proteini in vitro ortamda adiposit farklılaşmasını artırmaktadır ve Klotho gen ürünü aktivitesi eksikliği olan fareler, azalan beyaz adipoz doku akümülyasyonundan dolayı zayıftır. Buna ek olarak, Klotho gen ürünü eksikliği olan

fareler yüksek yağlı diyetten kaynaklanan obeziteye dayanıklıdır. Enerji metabolizması da aynı zamanda Klotho gen ürününden etkilenebilmektedir (Razzaque 2012).

Bu çalışmada, besin tüketim sıklığı ile karbonhidrat beslenen bireylerde ve protein beslenen bireylerde, Klotho geninin metilasyon düzeyi ile beslenme alışkanlığı arasındaki ilişkisinin yaşlanmaya etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

İnsanoğlu yüzyıllardan beri neden yaşıyoruz? sorusunu kendisine sormuş ve bu soruya yanıtlar bulmaya çalışmıştır. Günümüzde yaşlanma nedenleri ile ilgili çalışılmalar hızla artmakta ve yaşlanmanın sebepleriyle ilgili pekçok yeni teori ortaya atılmaktadır (Guarente ve Kenyon 2000).

Yaşlanma, strese uyum cevabında azalmaya sebep olan ve yaşla ilişkili hastalık riskinin arttığı fonksiyonlarda ilerleyici ve yaygın bir bozukluktur. Yaşlanan bireylerde dışarıdan gelen uyarılara karşı, homeostasiyi koruması gittikçe güçleşmektedir (Karan ve Tufan 2010). Yaş ilerledikçe, nörodejeneratif bozukluklar gibi pekçok hastalığın görülme sıklığı artmaktadır. İmmün sistemdeki değişikliklerle, otoimmün hastalıklara ve infeksiyonlara yatkınlık ve kanser görülme sıklığında belirgin artış görülmektedir. Bu durum toplumda, ölüm ihtimalinin artması ve yaşa özgü ölüm oranlarının yükselmesi ile neticelenir (Kirkwood ve ark. 2003).

Yaşlanma olayı, ortalama belirli bir süreç içerisinde ilerlemekle beraber farklı bireylerde değişik hızlarda olabilmektedir. Çünkü genetik özellikler, yaşam tarzı, besin tüketim sıklığı, hastalıklar ve bireylerin stres ile başa çıkma yolları farklılıklar göstermektedir.

2.1. Yaşlanma Üzerine Etkili Olan Faktörler

Yaşlanma üzerine etkili olan faktörler ikiye ayrılır yaşlanma üzerine etkili olan genetik faktörler ve yaşlanma üzerine etkili olan diğer faktörlerdir.

2.1.1. Yaşlanma Üzerine Etkili Olan Genetik Faktörler

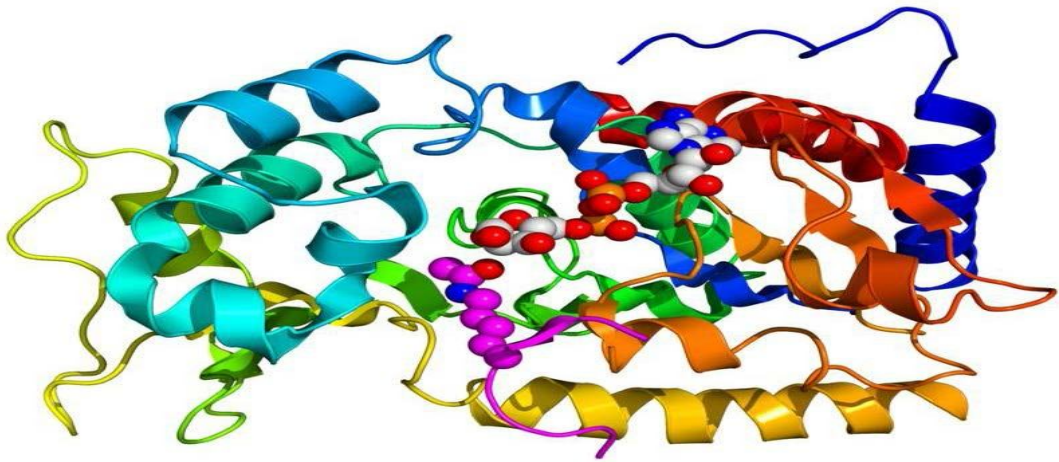
2.1.1.1. Deneysel Modellerde Belirlenen Genler

Yaşlanmada, genetik faktörlerin etkili olduğuyla ilgili pekçok kanıt mevcuttur: “Saccharomyces cerevisiae (ekmek mayası), Caenorhabditis elegans (nematod) ve Drosophila melanogaster (meyve sineği)”, yaşlanma genetiği araştırmalarında en sık kullanılan organizmalar olup, bu organizmalar üzerinde yapılan çalışmalarda yaşam süresinin genetik kontrolü hakkında pekçok genetik mekanizma tespit edilmiştir (Bishop ve Guarente 2007). Yaşlanmayla ilgili genetik mekanizmaların pekçoğunun taksonom boyunca memeliler dahil olmak üzere

korunmuş olduğu gör÷lmektedir. “Target of rapamycin (TOR)” sinyalinin yaşlanmayı hızlandırdığı; adozin monofosfata bağımlı protein kinaz (AMPK) aktivasyonunun yaşlanmayı yavaşlattığı ve sirtuin genlerinin yaşam süresini uzattığı; “maya, kurtçuk ve meyve sineği”nde verilmişken memelilerde bu konularla ilgili yeterli veri mevcut değildir (Bishop ve Guarente 2007).

İnsan gen araştırmalarıyla ilgili ilk bilgiler, maya ile yapılan molek÷ler biyoloji çalışmalarına dayanır. Leonard Guarente adlı araştırmacı yaşlanma mekanizmalarıyla ilgili yaptığı deneylerde, kolay ve ucuz olması sebebiyle ilk olarak ekmek mayalarıyla çalışmasını gerçekleştirmiştir. 2 haftalık yaşam süresi olan ekmek mayası, bu süre zarfında yaklaşık 20 defa hücre bölünmesi gerçekleşir. Fakat bazen insanlarda olduğu gibi, bazı mayalar ortalamadan daha uzun süre yaşar ve 25 veya 30 kez bölünmesi gerçekleşir. Guarente ve arkadaşları, ortalamadan daha çok bölünen bu maya hücrelerini incelemeye başladılar. Bu hücrelerin bölünmeye devam etme nedenini bulurlarsa, uzun ömürlülüğün mekanizmasını çözmeye ilk adım atılmış olacaktı (Aslan ve Can 2014).

Guarente ve ekibi, ancak sekiz yıl sonra uzun süre yaşayan maya hücrelerini yalıtıtlar ve bu maya hücrelerinin uzun süre yaşamasını sağlayan “sirtuinler” adı verilen bir grup geni tespit ettiler. Bu ailenin bir üyesi olan SIR-2 (Silent Information Regulator-2) geni özellikle yaşlanmayı engelleme fonksiyonuna sahiptir. Normal maya hücresini alarak SIR-2 genini bozdukları zaman, mayanın ömrünün % 50 daha uzun olduğunu gördüler (Guarente ve Kenyon 2000).



Şekil 2.1. Sirtuinler (<https://commons.wikimedia.org/wiki/File:1SZD.png>).

Fareler üzerindeki yapılan araştırmalarda Sirtuinlerin, stres ortamlarında organizmayı korumak için devreye giren genler olduğu belirlendi (Aslan ve Can 2014). Yiyeceğin az olduğu zamanlarda; sirtuinler devreye girerek organizmanın metabolizmasını yavaşlatıp, organizmayı DNA'sını tamir etmeye yönelttiği bilgisine ulaşıldı. Bu genleri aktifleştiren, en etkili faktörün kalori kısıtlaması olduğu anlaşıldı. Daha sonra yapılan çalışmalarda, benzer fonksiyonlara sahip yedi farklı sirtuin geni olduğu bilgisine ulaşıldı (Guarente ve Kenyon 2000).

Kaliforniya Üniversitesi profesörlerinden Cynthia Kenyon, genetik araştırmaları için çok iyi organizma olan mikroskobik nematod "Caenorhabditis elegans" ile ömür uzatıcı genler konusunda önemli araştırmalar gerçekleştirmiştir. Cynthia Kenyon'un bu yuvarlak solucanı çalışmasında tercih etme nedeni Őeffaf olmasıdır, dışarıdan bakıldığında iç organlarının görölmesidir (Aslan ve Can 2014). Ayrıca bu mikroskobik organizmanın, insanlara çok benzeyen organ sistemleri ve hücreleri mevcuttur. İnsanlar gibi; sindirim sistemleri, dolaşım sistemleri ve sinir sistemleri (302 sinir hücresinden oluşan en basit sinir sistemi) bulunmaktadır (Aslan ve Can 2014).

Kenyon ve arkadaşları; yaptıkları araştırmada bu organizmanın DAF-2 genini yok ederek C. elegans'ın yaşam süresini iki katına yükseldiği sonucuna ulaştılar. DAF-2, sayıları takribi 100 kadar olan ve yaşam süresinin belirlenmesinde görev alan diğer genleri kontrol etmektedir. DAF-2 tarafından, kontrol edilen bir grup gen, hücrenin DNA'sına zarar veren serbest radikallerin ortaya çıkmasını engellemektedir. Kenyon ve arkadaşları; DAF-2 geninin C. elegans'ın hücrelerinde, insan vücudundaki insülin hormonuna benzer bir hormonla etkileşim sağladığını gördüler (Guarente ve Kenyon 2000). Farelerde ve insanlarda, DAF-2'ye benzer genlerin bulunması ve bu genlerin insan insülini ve İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü (IGF I) hormonlarıyla hücreler arası iletişim sağlaması ilgi çekmektedir (Alcedo ve Kenyon 2004). Kenyon ve arkadaşları, 2004 yılında, ortalama yaşam süresi 2-3 hafta olan C. elegans'ın ömrünün 125 güne kadar uzamasını sağladılar (Alcedo ve Kenyon 2004).

İnsülin/IGF yolu, FOXO transkripsiyon faktörlerinin (i.e. DAF-16) nükleusa taşınmasını durduran fosforilasyon reaksiyonlarının bir aşaması olarak ve oksitativ stres veya DNA hasar genleri gibi yaşlanma karşıtı genlerin nihai olarak

durdurulması şeklinde görev yapmaktadır. *C.elegans*lardaki insülin/IGF yolunun çeşitli bileşenleri, ekspresyon seviyeleri, UTX-1'in histon demetilaz aktivitesi ile düzenlendiği belirtilmiştir (Jin ve ark. 2011; Maures ve ark. 2011). UTX-1'in genetik engellenmesi (durdurulması); DAF-2 downregülasyonuna yol açan ancak DAF-16'nın birikimini yükselten DAF-2 geninin H3K27 trimetilasyonunu arttırmaktadır ve sonuç olarak ta yaşlanma karşıtı genlerin aktif hale gelmesine sebep olmaktadır (Jin ve ark. 2011).

2.1.1.1.1. Memeli Sirtuinleri

Sirtuinler, nikotinamid adenin dinükleotit (NAD⁺) bağımlı protein deasetilaz ailesinin bir üyesidir (Pucci ve ark. 2013). Bu ailede 1'den 7'ye kadar yedi adet varyant bulunmaktadır (Bagul ve Banerjee 2013; Chen ve ark. 2013). SIRT-1, SIRT6, SIRT7 çoğunlukla çekirdekte; SIRT2 sitoplazmada; SIRT3, SIRT4, SIRT-5 daha çok mitokondride bulunmaktadır. SIRT-1, en dayanıklı deasetilaz faaliyeti gösterirken SIRT-5 ise zayıf deasetilaz etkisi gösterir. SIRT-2, SIRT-3, SIRT-4, SIRT-6 ise mono-ADP ribozil transferaz etkisiyle deasetilaz faaliyeti göstermektedir (North ve ark. 2003; Shi ve ark. 2005; Haigis ve ark. 2006). Sirtuinler; hücre büyümesi, apoptozis, enerji metabolizması ve strese yanıt gibi sayısız biyolojik işlevlere katılırlar (Bagul ve Banerjee 2013; Chen ve ark. 2013).

2.1.1.2. Telomer-Telomeraz Aktivitesi

Telomerler, ökaryotik kromozomların uçlarında yer alan ve çok sayıda "TTAGGG" dizi tekrarı içeren heterokromatik yapılardır ve ilk defa 1938'de Muller tarafından tanımlanmıştır. Eksonükleazlara ve ligazlara dirençli olan telomerlerin kromozom stabilitesinde, nükleer yapılaşmada, gen ekspresyonunda, kromozomal replikasyonda, tümör oluşumunda, yaşlanmada ve hücre bölünmesinde fonksiyon gösterdiği bilinmektedir (Holt ve ark. 1997; Sun ve ark. 1999; Mayerson 2000). Telomerik DNA; türler arasında farklılık göstermekte olup, tekrarlanan dizi Tetrahymena'da "GGGGTT" iken insanlarda ve diğer memelilerde "TTAGGG"dir (Blackburn 1992; Rhyu 1995; Lundblad 1996; Greider 1996; Wellinger ve Sen 1997). Telomerleri kromozomun geri kalan kısımlarından ayıran özelliği; telomerik DNA'nın hücre siklusuna bağlı olarak kaybı ve yeniden kazanılmasıdır ki bu işlem 'telomer dinamiği' olarak adlandırılmaktadır. İnsan somatik hücrelerinde telomer

dinamiği negatif olup her hücre siklusunda eksilen telomerik DNA miktarı, yeniden sentezlenen telomerik DNA miktarından çöktür (Slijepcevic 1998).

Telomerler kromozomların bütünlüğünü ve stabilitesini sağlar. Telomerler kromozomların son kısımlarını, olası yıkım ve füzyon gibi olaylardan korur. Ayrıca, kromozomların çekirdek membranına tutunarak, belirli bir pozisyonu korumasını sağlar. Yine, replikasyonda lineer kromozomal DNA'nın son kısmının tamamlanmasında işlevi bulunmaktadır (Atlı ve Bozcuk 2002).

Telomeraz (telomer terminal transferaz, telomer deoksiniükleotidil transferaz) kromozomal uçlardaki "TTAGGG" tekrarlarının sentezinde görevli olan ribonükleoprotein yapıda özel bir DNA polimerazdır, telomer boyunun kontrolünden sorumlu olan enzimdir (Zheng ve ark. 1997; Meyerson 1998). İlk kez Tetrahymena'da Greider ve Blackburn tarafından tanımlanan telomeraz enzimi, daha sonra insanlarda Morin tarafından HeLa hücrelerinde gösterilmiştir. Embriyonik hücreler ve erişkin kök hücrelerinde aktif olan bu enzim, normal somatik hücrelerde saptanmamakta ve immortal kanser hücrelerinde ise tekrardan aktive olmaktadır (Gorham ve ark. 1997; Yoshida ve ark. 1997).

Her hücre bölünmesinin ardından telomerler kısalır ve kritik kısalığa ulaştığında yaşlanma ile ilgili mekanizmalar aktifleşmektedir. Normal hücreler, belirli sayıda bölündükten sonra çoğalmaları durur bu durum "Hayflick sınırı" olarak adlandırılmaktadır. Yaşa ve hücre tipine göre değişen telomerin uzunlukları yaklaşık olarak 6-12 kilobaz uzunluğundadır. Her replikasyonda telomer bölgeleri 50-100 kadar baz çiftini kaybetmektedir. Telomerlerin kısaltmalarını, 1961 yılında yaptığı doku kültürü çalışmasıyla ilk kez "Hayflick" bulmuştur. Hayflick, insan fibroblastlarıyla yaptığı araştırmasında, hücrelerin belirli bir bölünme sayısından sonra artık bölünmediğini, ancak metabolik aktivitelerini sürdürdükleri sonucuna ulaşmıştır (Aslan ve Can 2014). Cawthon ve çalışma arkadaşlarının yaptığı çalışmada, 143 kişinin DNA örnekleri incelenerek telomer boyu ölçülmüştür. Bu incelemede, telomeri daha kısa olanların kalp hastalıklarından ölme oranının 3 kat fazla olduğu görülmüştür. Yine aynı çalışmada, daha kısa telomeri olanların enfeksiyon hastalıklarından ölme oranlarının 8 kat daha fazla olduğu sonucuna ulaşılmıştır (Cawthon ve ark. 2003).

2.1.1.3. Somatik Mutasyon Teorisi

Somatik mutasyon teorisinde; DNA hasarına hücresel cevap kapasitesinin, yaşlanma olayında önemli bir belirleyici olduğu belirtilmiştir. DNA hasarına cevap; DNA’da meydana gelen hasarların tespiti, tamiri ve apoptoz ile hücre siklusunun kontrolü kademelerinden gerçekleşmektedir (Slijepcevic 2008).

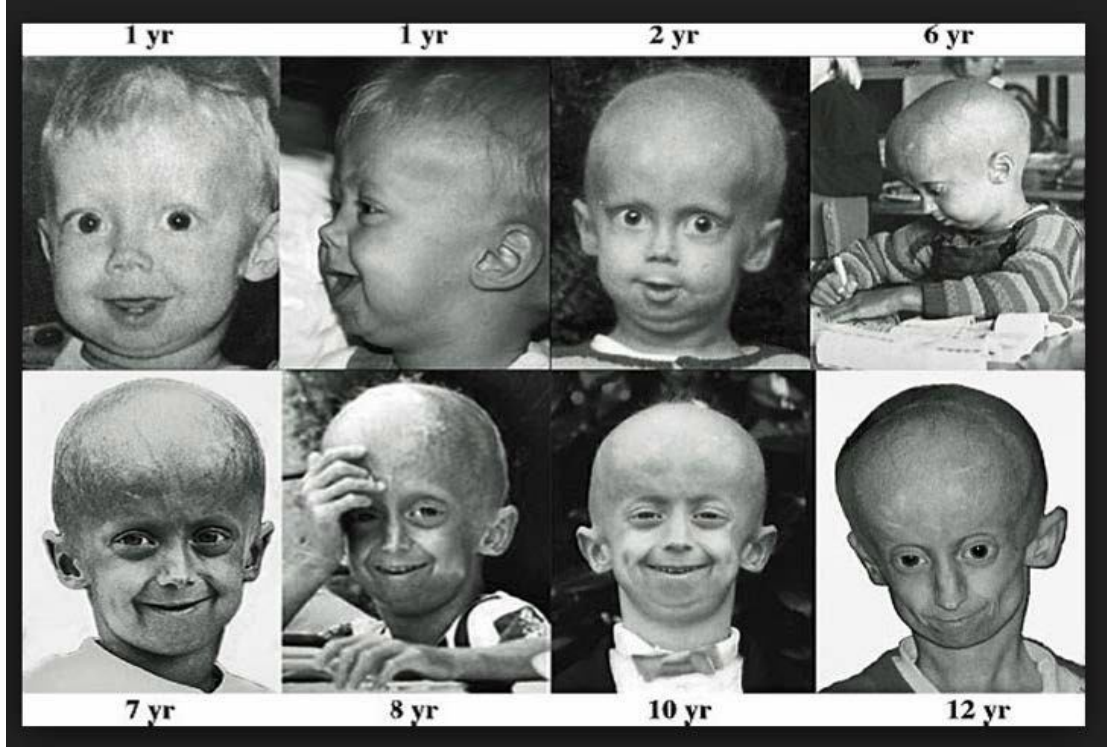
2.1.1.4. Apolipoprotein E Alleli

Epidemiyolojik araştırmalarda; yüz yıldan fazla yaşayan kişilerin çocuklarında “kalp damar hastalıkları, yüksek tansiyon, şeker hastalığı ve metabolik sendrom” gibi kalp damar rahatsızlıklarının daha seyrek görüldüğü, bunların genel popülasyona göre daha geç ortaya çıktığı ve hem kalp damar hastalıkları hem de tüm sebeplere bağlı mortalitenin daha az olduğu belirtilmiştir (Adams ve ark. 2008).

Yüz yaşını aşanlarda, yapılan diğer epidemiyolojik araştırmalarda bu popülasyonda; Apolipoprotein E $\epsilon 2$ allelinin daha sık olduğu, hem ateroskleroz hem de Alzheimer hastalığı ile ilgili olan apolipoprotein E $\epsilon 4$ allelinin seyrek olduğu ve daha büyük HDL ve LDL kolesterol parçacıklarının bulunduğu keşfedilmiştir (Peris 2006). Yüz yaşını aşanlarda yapılan genetik çalışmalarda 4. kromozom üzerindeki mikrozomal transfer protein geni, HDL ve LDL kolesterol parçacık büyüklüğü ile ilgili olan kolesterol ester transfer protein geni gibi bazı genlerdeki polimorfizmin uzun ömürle ilgili olabileceği belirtilmiştir (Peris 2006).

2.1.1.5. Erken Yaşlanma Sendromları

Hutchinson-Gilford Progeria Sendromu ilk olarak 1886 senesinde Jonathan Hutchinson tespit etmiştir (Maloney 2009). 1904 yılında Hastings Gilford benzer klinik özelliklere sahip ikinci bir vaka bildirilmiş ve ‘progeria’ olarak tanımlanmıştır (Brown 1992). Daha sonra bu tip vakalar her iki araştırmacının isimlerini taşıyan Hutchinson Gilford Progeria Sendromu (HGPS) olarak adlandırılmıştır (Hennekam 2006). LMNA geni mutasyonu neticesinde oluşan, lamin A üretiminde bozuklukla karakterize olan Hutchinson-Gilford progeri sendromunda (HGPS) alopesi ve erken ateroskleroz görülür ve olgular genellikle 13 yaş civarında koroner ve serebrovasküler ateroskleroz sebebiyle kaybedilir (Ramirez ve ark. 2007).

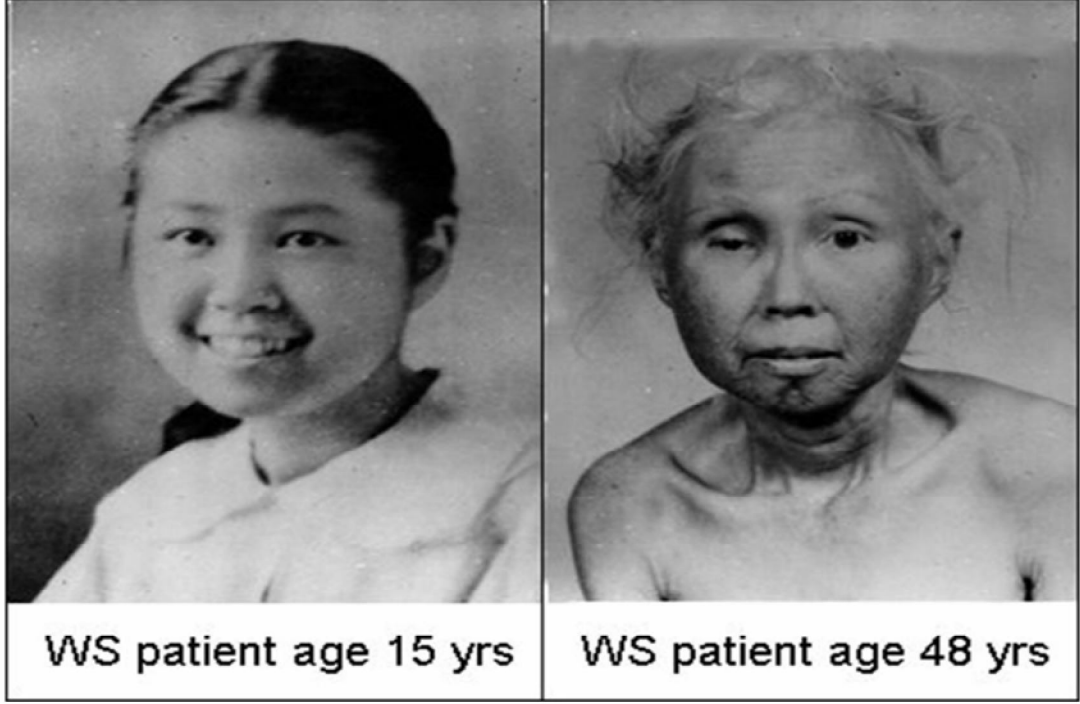


Şekil 2.2. Hutchinson-Gilford Progeri Sendromunu (HGPS) (<http://progeriafamilycircle.blogspot.com.tr/p/symptoms.html>).

Werner sendromu (WS), ilk kez 1904 senesinde Alman oftalmolog Otto Werner tarafından juvenil katarakt, ekstremitelerde pakidermi benzeri değişiklikler, boy kısalığı, erken yaşlanma bulguları olan dört kardeşte tanımlanmıştır. Daha sonra 1934 senesinde Oppenheimer ve Kugel bu bulgulara kemik erimesi ve yüksek seyreden diabet gibi endokrin anomalilerin de görüldüğü bilgisine ulaşmışlardır (Yamamoto ve ark. 2003).

WRN genindeki mutasyon sonucunda DNA helikaz ve DNA tamir mekanizmalarında bozuklukla karakterize olan ve otozomal resesif kalıtım gösteren Werner sendromunda: genç yaşta ateroskleroz, osteoporoz, katarakt, saçlarda beyazlaşma ve saç kaybı gibi yaşlanma belirtileri görülmekte ve genç yaşta çeşitli kanserler görülmektedir (Ramirez ve ark. 2007). Bu sendromda tipik olarak otuzlu yaşlarda katarakta bağlı görme problemleri oluşur. Otuzlu yaşların ortalarında deri atrofisine bağlı kronik bacak ülserleri, şeker hastalığı ve osteoporoz belirgin hale gelir ve öngörülen ortalama ömür uzunluğu 50 yıl kadardır. Bununla beraber, bu hızlanmış yaşlılık sürecine beyinle ilgili değişiklikler eşlik etmemektedir ve normal yaşlanmada osteoporoz; vertebralarda görülürken, Werner sendromunda uzun

kemiklerde görülmektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda WRN geninin tümör baskılayıcı bir gen olduğu, inaktivasyonu sonucunda kromozomal instabilite geliştiği ve ayrıca 630 insan kanser örneği incelendiğinde bu genin epitelyal ve mezenkimal tümör oluşumunda önemli olduğu görülmüştür (Agrelo ve ark. 2006).



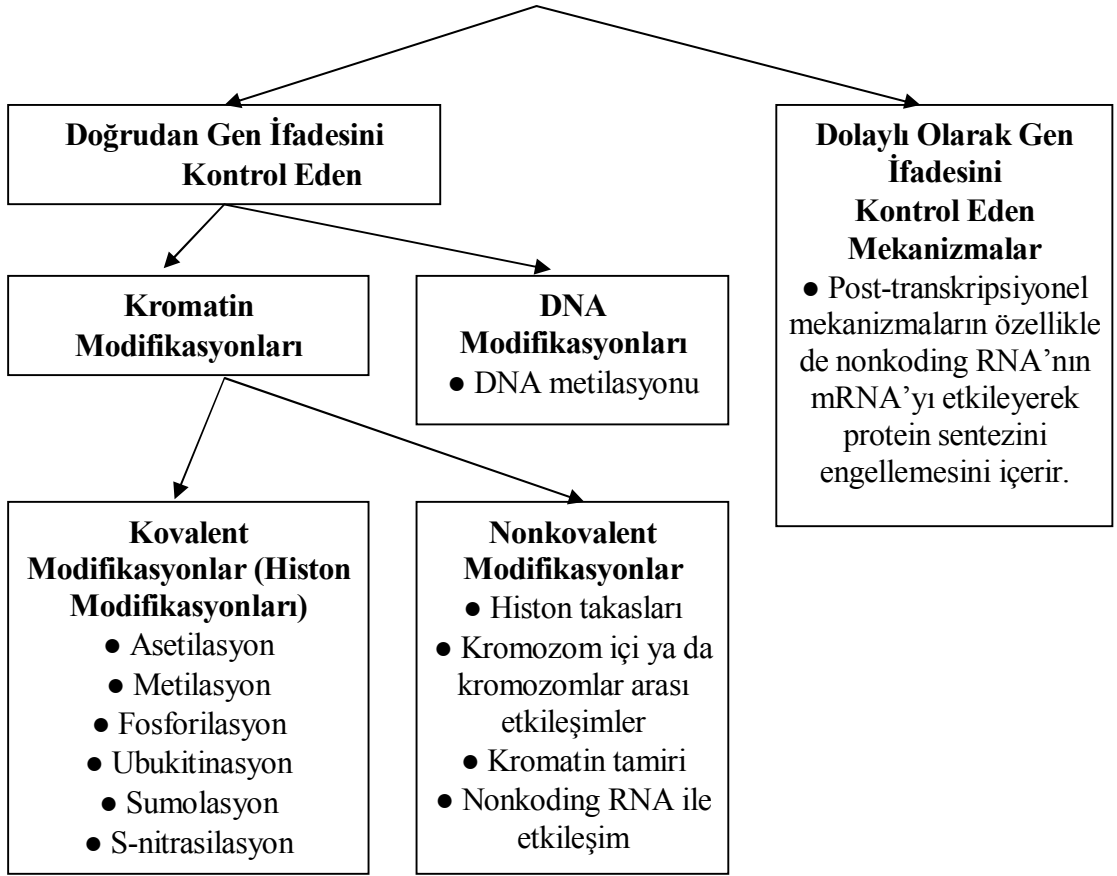
Şekil 2.3. Werner Sendromu (<http://humanandscience1.blogspot.com.tr/2015/05/yaslanma-engellenebilir-mi.html>).

2.1.1.6. Epigenetik Mekanizmalar

Epigenetik terimi ilk kez 1942 yılında Waddington tarafından genetik olarak özdeş bireylerdeki fenotipik farklılaşmayı açıklamak için, genetiğin üzerinde veya genetiğe ek olarak işlev gören mekanizmaları tarif etmek için kullanılmıştır (Robertson 2005; Khatib 2012).

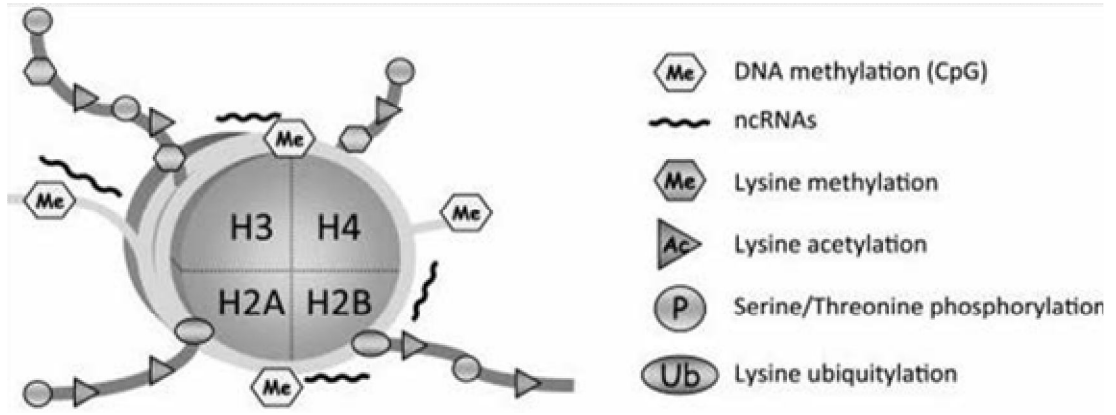
Tablo 2.1: Epigenetik Mekanizmalar ve Kanser Tedavisinde Epigenetik Yaklaşımlar Derlemesinden Tablolaştırılmıştır (İzmirli 2013).

EPİGENETİK MEKANİZMALAR



Kromatinin temel birimi olan nükleozom; histon oktomerisi çevresine sarılı DNA'dan meydana gelmektedir (Luger ve ark. 1997).

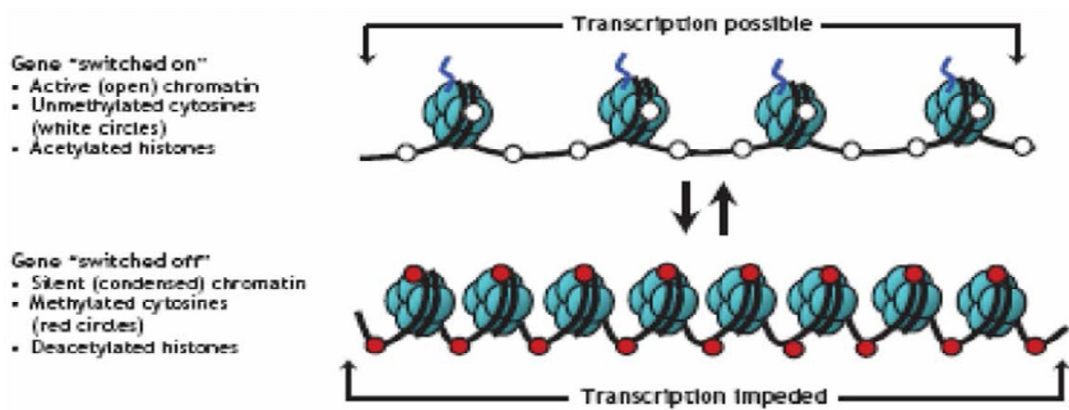
Pek çok farklı hücrel faaliyetler ya spesifik genomik lokuslarda ya da büyük kromozomal domainlerde kromatin yapısının düzenlenmesi için nükleozomları hedeflerler (Sims ve ark. 2003). Histon kuyukları nükleozomun merkezinden dışa doğru bir çıkıntı oluşturur ve farklı posttranslasyonel modifikasyonlara maruz kalırlar (Jenuwein ve Allis 2001).



Nükleozom çekirdeğinden çıkan histon kuyrukları, çeşitli posttranslasyonel modifikasyonlar ile gösterilmiştir. DNA metilasyonu ve kodlanmayan RNA'ların bağlanması gösterilmektedir.

Şekil 2.4. DNA ile çevrelenmiş histonlar oktomeri ile oluşturulmuş bir nükleozom diyagramıdır (Gonzalo 2010).

Kromatin yapısındaki değişiklikler gen ifadesini kontrol eder; kromatin yapı sıkılaşır yoğunlaştığında (sessiz) genler inaktive olur, kromatin yapı gevşeyerek açıldığında (aktif) genler aktive olarak tanımlanır. Kromatin yapısındaki bu dinamik durum ise reversibl olan ve DNA metilasyonu veya histon modifikasyonları ile sağlanan epigenetik paternler ile gerçekleştirilir. Bu işlemlerde görevli alan enzimler arasında; DNA metiltransferazlar (DNMT), Histon deasetilazlar (HDAC), Histon asetil transferazlar (HAT), Histon metil transferazlar (HMT) ve Methyl-CpG-binding protein 2 (MECP2) verilebilir (Orcan 2006).



Kromatin açık (aktif) olduğunda, genler ekspres edilmektedir (açılmaktadır); ve kromatin yoğun (sessiz) olduğunda, genler inaktif (kapalı) durumdadırlar. Beyaz daireler: unmetile sitozinler; Kırmızı daireler: metile olan sitozinler.

Şekil 2.5. Kromatin organizasyonunda gen ekspresyonunu etkileyen tersine döndürülebilir değişimler (Orcan 2006).

Dolaylı Yoldan Gen İfadesini Kontrol Eden Mekanizmalar

Posttranskripsiyonel mekanizmaları, özellikle nonkoding RNA'nın (siRNA, miRNA vb.) mRNA'yı etkileyerek protein sentezini engellemesini içerir (Holliday 2006).

Doğrudan Gen İfadesini Kontrol Eden Mekanizmalar

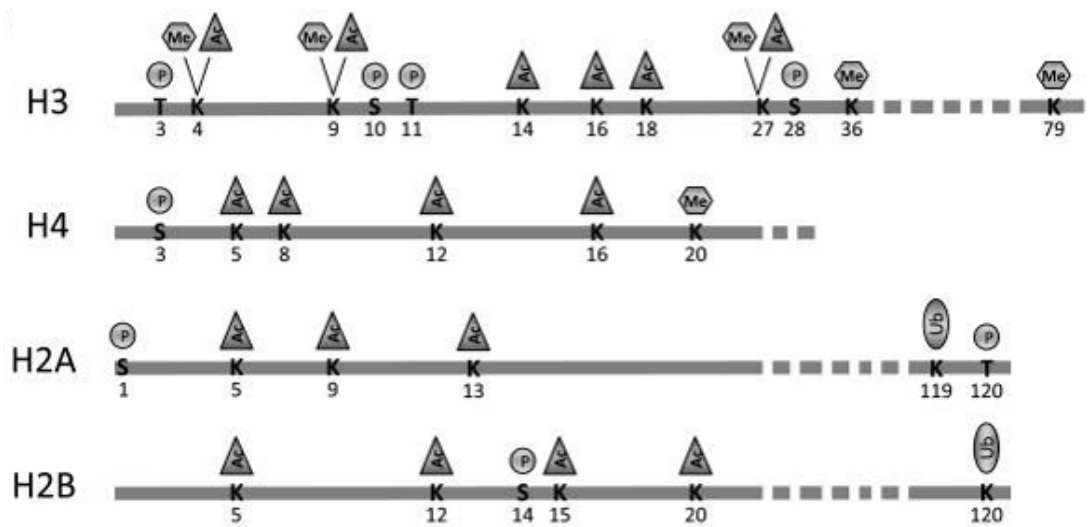
Bu mekanizmalar, kromatin ve DNA düzeyindeki modifikasyonlar olarak iki gruba ayrılır (İzmirli 2013).

Kromatin Modifikasyonları

Kromatin düzeyindeki modifikasyonları da kovalent ve nonkovalent olmak üzere iki gruba ayrılır (Segre ve Chiocca 2011). Genlerin sessizleşmesine sebep olurlar, bu da geni inaktive edici bir mutasyon ya da delesyon gibi genetik bir mekanizma ile aynıdır (İzmirli 2013).

Histon Modifikasyonları (Kovalent Modifikasyonlar)

Histon modifikasyonları; kromatinle ilgili proteinlerle etkileşerek, genin transkripsiyon aşamasının düzenlenmesini sağlayan faktörlerdir (Segre ve Chiocca 2011). Asetilasyon, metilasyon, fosforilasyon, s-nitrosilasyon, ubiquitinasyon ve sumolasyon kovalent histon modifikasyonları grubunda yer alan mekanizmalardır (İzmirli 2013).



Şekil 2.6. 4 Histon kuyruğu, onlara karşılık gelen spesifik kalıntılardaki posttranslasyonel modifikasyonlar ile birlikte gösterilmektedir (Gonzalo 2010).

Asetilasyon: Histon deasetilaz bir proteininin lizin rezidüsüne asetil gruplarının bağlanması olarak adlandırılır (Segre ve Chiocca 2011). Asetilasyonu taklit edebilecek mutasyonların oluşması, posttranslasyonel modifikasyonları ve deasetilaz aktiviteyi etkilemektedir (Bond ve Finnegan 2007).

Metilasyon: Histon metiltransferaz enzimleri tarafından histon proteinlerinde bulunan amino asitlere 1, 2 veya 3 tane metil grubu (tri metilasyon) bağlanmasıdır. Bir genin ifade edilip edilmeyeceğini, o geni açık veya kapalı konuma (switch on-switch off) getiren durum, bu ve benzeri modifikasyonlardır. Açık/Kapalı gen setleri, bulunduğu hücre tipine göre farklılık belirtir. Histon 3 kuyruğundaki metilasyonun epigenetik düzenlemede önemli bir fonksiyonu mevcuttur. Histon 3 lizin 4 (H3K4) tri-metilasyonu ökaryotlarda promotör bölgelerini tespit eder (Martin ve Zhang 2007).

Fosforilasyon: Histon deasetilazlara geri dönüşümlü olarak fosfat gruplarının eklenmesi olayıdır. Fosfatlar, histon deasetilazlara; serin, treonin ve tirozin rezidülerinden eklenir. Fosforilasyon; protein kinazlar (PK) ve protein fosfatazlar (PP) tarafından gerçekleştirilen reaksiyondur (Ford ve ark. 2007).

S-nitrasilasyon: Histon deasetilazlara sistein rezidüsünden nitrosil (NO) grubunun bağlanmasıdır, bu olay katalitik aktiviteyi etkiler ve bunun sonucunda kromatinden korepresörlerin ayrılmasına sebep olur (Nott ve ark. 2008).

Ubukitinasyon: Ubukitin (Ub), lizin rezidüsüyle bağlanabilen küçük bir proteindir. Üç aşamalı bir enzimatik reaksiyonun oluşmasına sebep olur. Bu reaksiyonlar, E1, E2, E3 enzimleri tarafından gerçekleştirilir ve sonuçta, proteinler proteosom yolağına girerek degrade olur (Hershko ve Ciechanover 1998).

Sumolasyon: SUMO (small ubiquitin-like modifier) 1, 2, 3 proteinlerinin ubukitinle birleşmesi durumudur. Ubukitine benzer protein olan SUMO proteinleri lizin rezidülerinden proteinlere bağlanır ve bu durum sonucunda protein degradasyonu engeller (Yang ve ark. 2007).

Nonkovalent Histon Modifikasyonları

Kromozom içi veya kromozomlar arası etkileşimler; histon takasları, kromatin tamiri, nonkoding RNA (siRNA, miRNA) ile etkileşim nonkovalent histon modifikasyonlarıdır (Bond ve Finnegan 2007).

Noncoding RNA'lar (ncRNA)

Histon modifikasyonları ve DNA metilasyonu kanonik epigenetik modifikasyonlar olarak kabul edilirken, Kodlamayan RNA'lar (ncRNA'lar), öncelikli olarak heterokromatin oluşumunu ve transkripsiyonel ya da posttranskripsiyonel gen susturumunu kapsayan kromatinin yeniden biçimlendirilmesinde aktif rol oynayanlar olarak, son zamanlarda kabul görmüştür (Mello ve Conte 2004).

- a. *Uzun Kodlamayan RNA'lar(long non coding RNA; lncRNA)*; LncRNA'lar protein kodlamayan, 200 nükleotidden uzun RNA molekülleridir (Mercer 2009). Bazı lncRNA'lar hücrelerin genel veya difereansiyon-spesifik biyolojik süreçlerinde rol oynarlar (Walter 1982).
- b. *Küçük Nükleer/Spliseozomal RNA'lar*; Küçük nükleer RNA'lar(small nuclear RNA; snRNA) nükleusta ribonükleoprotein komplekslerinde yer alırlar ve RNA uç birleştirmesinde merkezi role sahiptirler (Butcher 2005).
- c. *Küçük Nükleolar RNA'lar*; Küçük nükleolar RNA'lar(small nucleolar RNA; snoRNA) birçok organizmanın nükleolusunda Ago ile bağlı şekilde bulunmakta olup mRNA stabilizasyonu ve translasyon aşamalarında gen ekspresyonunu interfere edebilmektedir (Matera ve ark. 2007).
- d. *Küçük interferans RNA'ları (siRNA'lar)*; gen susturumunda ve heterokromatik bölgeler birleşmesinde rol almaya ve kromatine odaklı olan çift sarmallı RNA'lardan elde edilen 21-25 nükleotit molekülleridir (Mello ve Conte 2004).
- e. *Hairpin yapılarını oluşturan bireysel RNA moleküllerinden elde edilen micro-RNA'lar (miRNA'lar)*; translasyonu engelleyerek posttranskripsiyonel susturumu başlatmaktadır (He ve Hannon 2004).

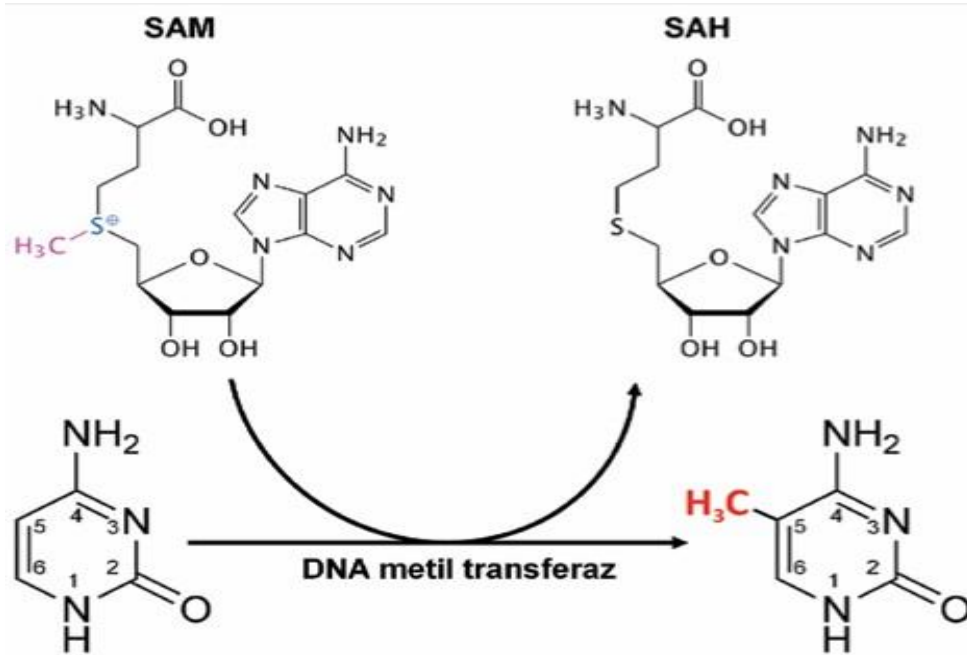
- f. *Piwi etkileşimli RNA'lar*; transpozonların hareketliliğini engellemede rol oynayan 28-33 nükleotit molekülleridir (Aravin ve ark. 2007). Genom fonksiyonu ve bütünlüğü içerisindeki ncRNAs'ların görevi yeni anlaşılmaktadır (Gonzalo 2010).

DNA Modifikasyonları

DNA düzeyindeki modifikasyonların en tanınan ve en işlevsel olanı DNA metilasyonudur (Waterland ve Michels 2007).

DNA Metilasyonu

Omurgalılarda, tipik olarak CpG bölgelerine DNA metiltransferaz enzimi ile metil grubunun eklenmesi sonucunda meydana gelir. Metil grubu, DNA'nın sitozin bazının pirimidin halkasının 5' numaralı karbonuna bağlanır. Metil vericisi olarak, S- Adenosil Metiyonin (SAM) fonksiyonu vardır (Bond ve Finnegan 2007; Waterland ve Michels 2007).



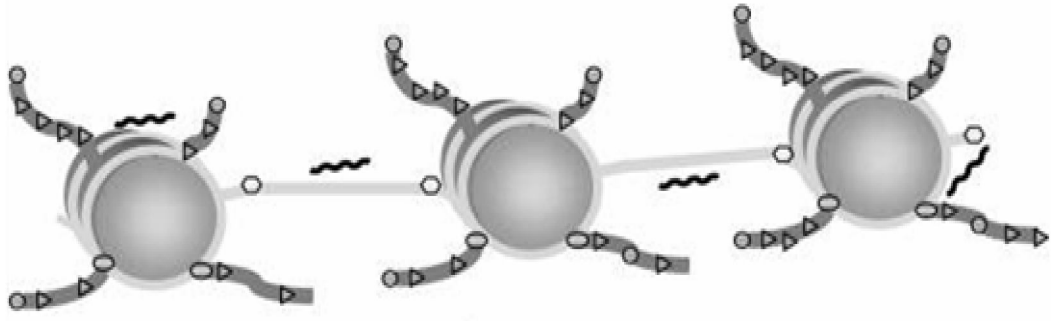
SAM: S-adenosilmetiyonin, SAH: S-adenosilhomosistein.

Şekil 2.7. DNA Metilasyonu: DNA metil transferazlar, DNA'daki sitozin bazının 5. karbon atomuna SAM'den metil grubunun transferini kataliz eder, 5-metil sitozin ve SAH oluşur (Çağlayan ve Turan 2014).

Erişkin somatik dokularda, DNA metilasyonu tipik olarak CG dinükleotit dizilerinde gerçekleşir. CpG dışı metilasyon, embriyonik kök hücrelerde hâkimdir (Bond ve Finnegan 2007; Waterland ve Michels 2007). Metilasyon, DNA'nın inaktive olmasına sebep olarak protein ekspresyonunu engelleyen bir sistemdir (Cummings ve Klug 2002).

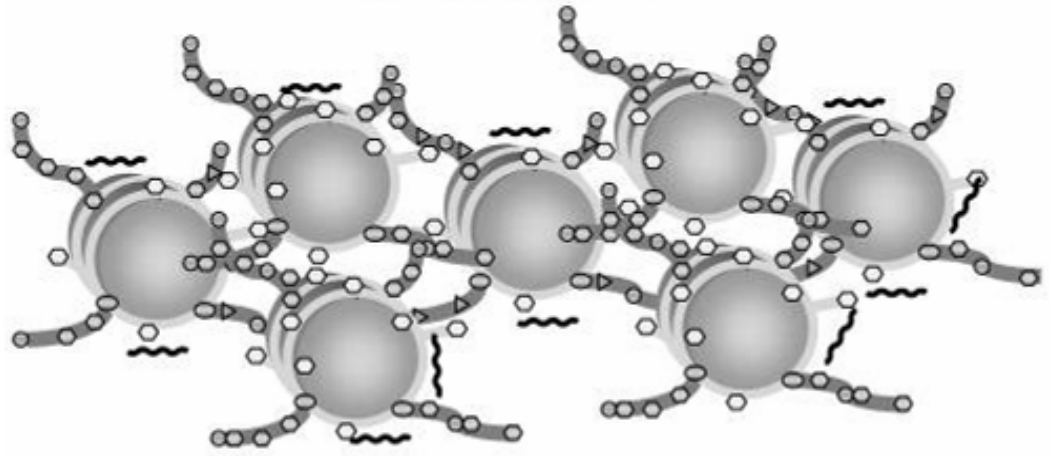
CpGler genomda az sıklıkla bulunurlar, fakat CpG adacıkları olarak bilinen spesifik gen promoterlerinde toplanmaktadırlar (Bird 2002; Kloze ve Bird 2006). DNA metilasyonunun bol miktarı; transpozonlar, perisentrik ve subtelomerik kromatin gibi tekrarlayıcı dizilerde vardır. Tekrarlayıcı dizilerin metilasyonu tüm genomda; rekombinasyon veya translokasyona engel olur (Callinan ve Feinberg 2006).

Histonların posttranslasyonel modifikasyon türleri ve DNA metilasyonu derecesi spesifik bir kromatin yapısı ortaya çıkarmaktadır (Workman ve Kingston 1998; Lachner ve ark. 2003). Ökaryotlarda, ökromatin ve heterokromatin olmak üzere morfolojik olarak iki farklı kromatin türü vardır (Dillon ve Festenstein 2002; Gilbert ve ark. 2004).



Ökromatin:

Gen bakımından zengin, Transkripsiyonel olarak aktif Dağınık görümlü,
Özgün DNA dizimleri



Heterokromatin:

Gen bakımından fakir, Transkripsiyonel olarak daha az aktif Yoğun görümlü,
Tekrarlayan DNA dizimleri

Ökromatin, histonların hiperasetilasyonu ile, ve histon ve DNA'nın hipometilasyonu ile karakterize edilmektedir. Buna karşılık, heterokromatin, histonların hipoasetilasyonunu, ve histonlar ve DNA'nın hipermetilasyonunu göstermektedir.

Şekil 2.8. Ökromatin ve heterokromatin bölgelerindeki farklılıklar (Gonzalo 2010).

Ökromatin; histonların hiperasetilasyonu ve hem histonların hem de DNA'nın hipometilasyonu ile biyokimyasal şekilde karakterize edilen, gen bakımından zengin ve transkripsiyonel olarak aktif olan dağınık görünüm bölgeleriyle, ilişkilidir. Aksine, oldukça yoğunlaşmış heterokromatin; sentromerler ve telomerler gibi gen bakımından zayıf ve transkripsiyonel olarak aktif olmayan bölgelerle ilişkilidir. Biyokimyasal olarak, heterokromatin; DNA'nın ve histonların hipermetilasyonu ve histonların hipoasetilasyonu ile karakterizedir (Maison ve ark. 2002; Grewal ve Jia 2007). Bununla birlikte, bu iki morfolojik olarak farklı kromatin alanları ortak özellikleri bulunabilir. Örneğin, ökromatik promoterler; transkripsiyonu susturmak için, promoter etrafında lokal bir kromatin yoğunlaşmayı başlatmaya yeterli olacak

bir dizi kromatin-modifiye eden aktiviteler gerçekleştirmektedirler. Promoter çevresindeki bu kapalı kromatin durumu, global heterokromatik sessizleşme mekanizmasıyla pek çok benzerlik görülmektedir (Gonzalo ve Blasco 2005).

2.1.2. Yaşlanma Üzerine Etkili Olan Diğer Faktörler

2.1.2.1. Çevresel Faktörler ve Kalori Kısıtlaması

Diyet ve ortam sıcaklığının yaşlanma konusunda önemli yeri olduğuna dair pekçok veri mevcuttur. 1929 yılında *Drosophila* türünde, yaşam süresinin ortam sıcaklığıyla ters orantılı olduğu belirtilmiştir (Alpatov ve Pearl 1929). Bununla birlikte; ortam sıcaklığının azaltılması, homeoterm organizmalarda vücut sıcaklığının sabit tutulabilmesi için ısı üretiminin artmasına ve böylelikle yaşam süresinin artması yerine azalmasına neden olabilmektedir (Alpatov ve Pearl 1929; Holloszy ve Smith 1986). Vücut sıcaklığı azaltıldığında; metabolizma yavaşlamakta ve enerji tüketimi azalmaktadır. Metabolizma yavaşladığında, yaşlanmada önemli fonksiyonu olduğu düşünülen reaktif oksijen ürünleri (ROÜ) üretimi de azalır (Conti 2008).

Malnütrisyonu sebep olmayacak seviyedeki kalori sınırlamasının yaşam süresini uzattığı; “maya, kurtçuk, meyve sineği ve kemirgenlerde” yapılmış pekçok araştırmada belirtilmiştir (Bishop ve Guarente 2007).

Kalori sınırlaması neticesinde; metabolizmada, hücresel düzeyde, genetik yapıda ve nöroendokrin sistemde pekçok değişiklik görülmüştür (Bishop ve Guarente 2007; Morgan ve ark. 2007; Conti 2008). Bu değişikliklerden bazıları Tablo 2.2.’de belirtilmiştir (Karan ve Tufan 2010).

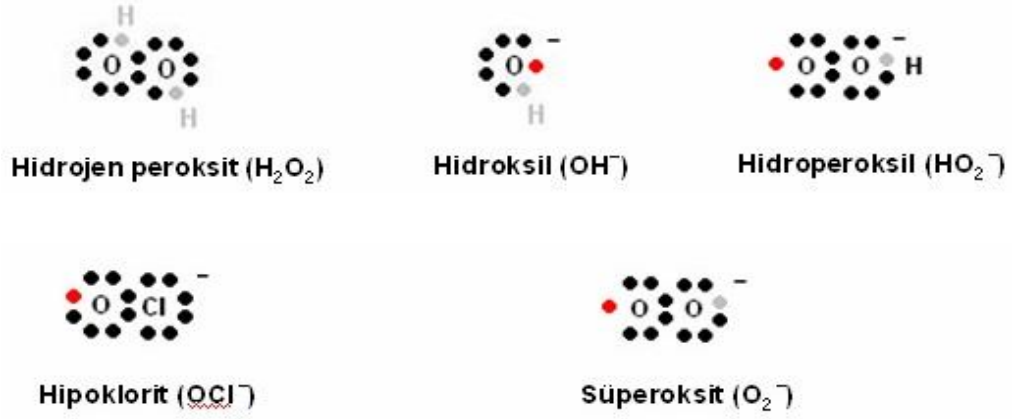
Tablo 2.2. Kalori kısıtlaması sonucunda gözlenen değişikliklerden bazıları (Karan ve Tufan 2010).

Glikoliz	↓
Mitokondriyal solunum hızı	↑
Oksidatif stres	↓
Inflamasyon	↓
DNA hasarı	↓
Kolesterol, yağ asidi ve trigliserit sentezi	↓
Glukoneojenez	↑
Glikojenoliz	↑
Protein ve yağ asidi katabolizması	↑
İnsülin sinyali	↓
İnsülin duyarlılığı	↑
Tiroid hormonu	↓
Adrenal kortikosteroid salınımı	↑

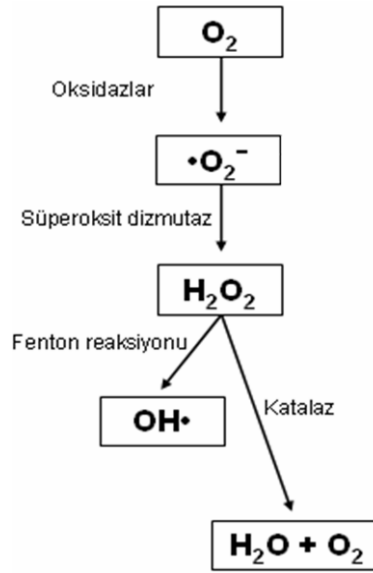
Kalori kısıtlaması halinde vücut sıcaklığı düşmektedir (Weindruch ve ark. 1979; Heilbronn ve Ravussin 2003). Böylece kalori kısıtlamasıyla vücut sıcaklığı arasında yakın bir ilişki olduğundan, etkilerinin ayrı ayrı incelenmesi güçtür (Conti 2008). Bununla birlikte, transgenik bir fare modelinde; kalori sınırlaması uygulanmadığı halde, hipotalamik “merkezi termostat” düşürülerek vücut sıcaklığı uzun süreli olarak ortalama 0,5°C - 0,6°C düşürülmüş ve bu şekilde ortalama yaşam süresinde % 20 uzama olduğu belirlenmiştir (Liu ve Walford 1972).

2.1.2.2. Oksidatif Stres (Serbest Radikal) Teorileri

İlk olarak Harman yaşlılığa bağlı değişikliklerin büyük çoğunluğunun elektron yükü bulunan molekül ve atomlardan kaynaklan ve yüksek oranda reaktif olan serbest radikallere bağlı olduğu teorisini sundu (Harman 1956). Bu teoride aslında hem dış etkenler hem de gelişimsel ve kalıtsal özellikler geçerlidir, aerobik metabolizma sonucunda süperoksid radikaller ($O^{\bullet -}$) meydana gelir. Bu radikaller, süperoksid dismutaz enzim tarafından hidrojen peroksit (H_2O_2) ve oksijene dönüştürülür (Fleming ve ark. 1982; Linnane ve ark. 1992; Wallace 1992).



Şekil 2.9. Bazı reaktif oksijen ürünleri (Martin 1997).



Şekil 2.10. Reaktif oksijen ürünlerin oluşumu (Martin 1997).

İlk zamanlar hidrojen peroksit geliştikten sonra, serbest oksijen radikallerinin doku hasarının son bulunduğu bilinmekteydi. Fakat bugün için bu moleküllerin daha reaktif olan hidroksil radikallere (OH^\bullet) dönüşebildiğini ve serbest radikallerin doku hasarı etkisinin daha da arttığı bilinmektedir. Örneğin; süperoksit dizmutaz enziminin hayvanlarda aşırı üretimi onların yaşam sürelerini uzatmaz iken, süperoksit dizmutaz enzimine ek olarak ortamdan H_2O_2 'de uzaklaştırıldığında yaşam süresi artmıştır. Buna karşın antioksidan uygulamalarına ait çalışmaların hiç birinde yaşam sürelerinde anlamlı bir uzama tespit edilememiştir. Reaktif oksijen radikalleri; gen ekspresyonunun düzenlenmesinde, hücre çoğalmasında ve apoptotik hücre ölümünde görev alır (Fleming ve ark. 1982; Linnane ve ark. 1992; Wallace 1992).

Serbest oksijen radikallerine ait metabolizma mitokondriyal olarak yürütülür. Yaşla birlikte; çizgili kas, kalp kası, diyafram ve beyinde de mitokondriyal DNA'da progresif serbest oksijen radikali hasarı (mitokondriyal stres teorisi) gerçekleşir. Meydana gelen bu hasarın kalp kasında 129 yaştan daha fazla yaşla bağdaşmayacağı tespit edilmiştir. Bu tip mitokondriyal solunum hasarları sadece normal dokularda değil; Parkinson, Alzheimer, Huntington Chorea ve diğer yaşla artan hareket bozukluklarında da artmaktadır (Nalbant 2006).

Serbest oksijen radikallerine bağlı yaşlanmayla ilgili teoriler bilimsel olarak kanıtlanamasa dahi ticari olarak oldukça ilgi görmüş, oldukça çok çalışma gerçekleştirilmiştir. Yaşlanmayı yavaşlattığına dair en güçlü veriler aşağıdaki mekanizmalara aittir (Wallace 1992; Ozawa 1997; Zainal ve ark. 2000; Larsen ve Clarke 2002).

- Koenzim Q10
- Tokoferol
- Nikotinamid
- Askorbik asid
- Kalori kısıtlaması
- Diyetel antioksidanlar

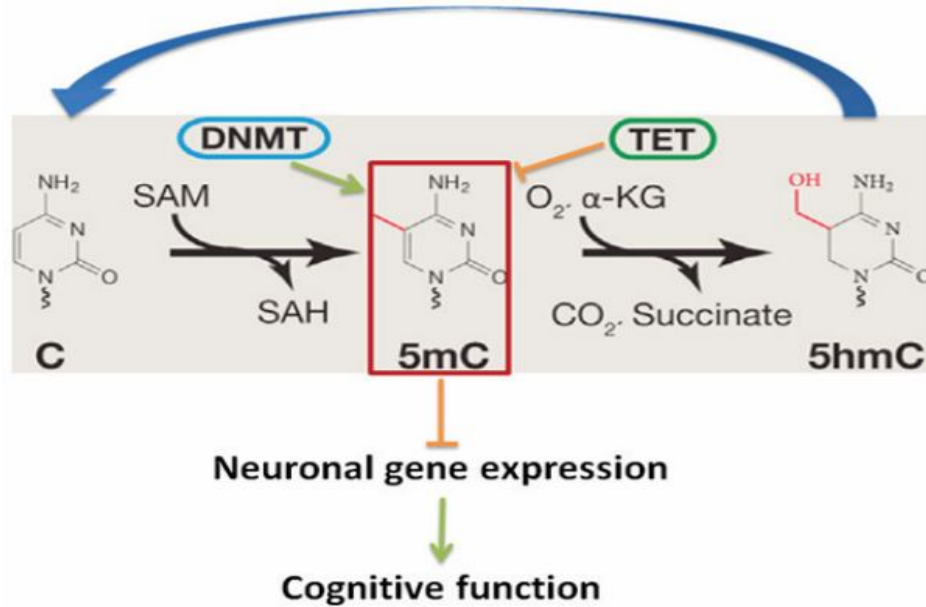
2.2. DNA Metilasyonu

Sitozin pirimidin halkasının 5' pozisyonuna bir metil grubunun eklenmesini ya da ondan çıkarılmasını içeren DNA sitozin metilasyonu, bitkiler, kemirgenler, insanlar gibi yüksek ökaryotlardaki ana epigenetik mekanizmalardan biridir ve genom stabilitesini sürdürmekte ve gen ekspresyonunu regüle etmekte büyük görevi vardır (Feng ve ark. 2010; Wu ve Zhang 2010; He ve ark. 2011; Qian ve Xu 2014).

DNA metilasyonu, represif kromatin modifiye edici aktiviteler sergileyen protein kompleksleri yardımıyla sağlayarak kapalı kromatin durumu endüksiyonuyla ilişkilendirilmektedir. Bu aktiviteler MBD (metil-CpG- bağlayıcı alan) proteinleri ve histon deasetilaz (HDAC) içeren kompleksleri de kapsamaktadır (Ballestar ve Esteller 2005; Klose ve Bird 2006). Ökromatik

promoterlerdeki sitozin metilasyonu, eş genlerin kapatılmasında görev almaktadır. Heterokromatik bölgelerde sitozin metilasyonu, bu bölgelerin yüksek ölçüde sıkıştırılmış kromatin gruplarının birlikteliğine katılmaktadır (Lengauer ve ark. 1997; Chen ve ark. 1998).

Anahtar DNA demetilasyonu enzimleri, TET1, TET2 ve TET3 gibi ten-eleven translokasyon (TET) familya enzimleridir (Şekil 2.11). DNA metilasyonunun tamamında görülen azalma, beyin de dahil olmak üzere hücre ve doku yaşlanması ile bağlantılıdır (Wilson ve Jones 1983; Singhal ve ark. 1987; Wilson ve ark. 1987). Yetişkin beynindeki DNMT1 ve DNMT3a kaybı, farelerde bilişsel bozukluklara neden olur (Dong ve ark. 2010; Feng ve ark. 2010; Klein ve ark. 2011) ve mutant TET1 hayvanı, anormal hipokampal uzun süreli depresyon ve hafıza kaybı sergilemektedir (Kaas ve ark. 2013). İnsanlarda DNMT1'deki mutasyonlar bir tür nörodejeneratif hastalık ile ilişkilendirilmektedir (Klein ve ark. 2011). Bu çalışmalar, DNA metilasyonundaki bozukluğun fare öğrenme hafızasını ve bilişi regüle etmede temel bir mekanizma olduğunu ve önemli fonksiyonu olduğu görülmektedir (Xu 2015).



SAM: S-adenozilmetiyonin; SAH: S-adenozilhomosistein.

Şekil 2.11. DNMT'ler tarafından sitozin metilasyonunu (5mC) ve TET'ler tarafından 5mC'nin demetilasyonunu içeren DNA Sitozin (C) modifikasyon yolu, nöronal gen ekspresyonunu regüle etmekte ve böylece bilişsel fonksiyonları da regüle etmektedir (Wilson ve ark. 1987; Singhal ve ark. 1987; Wilson ve Jones 1983).

Genetiğin tersine, epigenetik yalnızca kalıtsal değil aynı zamanda tersine çevrilebilir. Bu sebeple, yaşla ilgili epigenetik değişimleri tersine çevirmeyi amaçlayan stratejiler, yaşlanmayı geciktirmek ya da yaşla ilişkili ciddi hastalıkların semptomlarını hafifletmek için yeni bir terapötik müdahale geliştirilmesini sağlamaktadır. Yakın zamanlardaki bir çalışma, bir DNMT3a izoformu olan DNMT3a2'nin, fare hipokampusunda geçici olarak daha çok ekspresyonunun yaşla ilişkili bilişsel bozuklukları restore edebileceğini ve hipokampal DNMT3a2 ekspresyonunun shRNAi tarafından engellenmesinin genç farelerin bilişsel davranışlarında zarara neden olacağı belirtilmiştir (Oliveira ve ark. 2012; Su ve Tsai 2012). Bu, DNA metilasyonunun normal hipokampal fonksiyonu sürdürmek için önemli bir rol oynamakta olduğunu ve öğrenme hafızası ile biliş için epigenetik bir mekanizma olduğunu göstermektedir. Tüm genom DNA metil dizilimi ve fare beynindeki DNMT3a2'nin genetik manipülasyonu da içeren ileri çalışmaların, DNA metilasyonunun sinaptik plastisite genlerinin ekspresyonunu nasıl etkilediğini ve böylece öğrenme hafızası ve bilişi nasıl etkilediğini bir an önce belirtilmesi gerekmektedir (Xu 2015).

İlk çalışmalar, DNA metilasyonunun global seviyelerinin yaşamın ilk bir kaç yılı içerisinde arttığını ve daha sonra erken yetişkinlikten başlayarak azaldığı görülmüştür. Son dönemlerde, microarray ve next-generation dizileme teknolojilerinin başlamasıyla, yaşla birlikte DNA metilasyonunun değişebilirliğindeki artışlar görülmüştür ve bir dizi siteye spesifik yapılar bulunmuştur. Belirli CpG bölgelerinin büyük ölçüde yaşla ilgili olduğu ortaya çıkarılmıştır ve bu bölgelerden az sayıda kullanan tahmin modellerinin donörün kronolojik yaşını doğru olarak tahmin edebilmesi bu kanıyı desteklemiştir. Bu gözlemler, hep birlikte, yaşla ilgili DNA metilasyon değişikliklerine katkıda bulunan iki olayın varlığına işaret etmektedir: epigenetik drift ve epigenetik saat (Meaghan ve ark. 2015).

Yaşla ilişkilendirilen fenomenlerden biri epigenetik modifikasyon yapılarında meydana gelen bir değişimdir. Epigenetik; DNA diziliminde değişiklikleri içermeyen ve potansiyel olarak yavru hücrelere aktarılabilen DNA modifikasyonları ve DNA paketlenmesi olarak açıklanmaktadır (Bird 2007). Dinamik yapısı göz önüne alındığında epigenetik, çevre ve genom arasındaki ara yüz olarak tanımlanmıştır (Feil

ve Fraga 2012). DNA metilasyonunun en yaygın formu; CpGs'ler olarak açıklanan C-G dinükleotidlerinin 5' sitozinine yönelik bir metil grubunun eklenmesini kapsamaktadır. Bu nükleotit çiftleri genom içinde nispeten seyrek ve nispeten yüksek CpG yoğunluğu olan bölgeler CpG adacıkları olarak açıklanmıştır. Bu adacıklar, %50 G+C içeriği ve 0.6 gözlemlenen/beklenen CpGs oranı ile birlikte 200 bp'den daha büyük alanlar olarak tespit edilmiştir (Saxonov ve ark. 2006; Illingworth ve Bird 2009). Bu adacıklar, adacık olmayan CpGs' lere oranla daha az metile durumdadırlar ve sıklıkla gen promotörleriyle ilişkilidirler. CpG adacıklarını çevreleyen bölgeler ise 'kıyılar' ve ardından 'raflar' olarak adlandırılır. Genlerin yaklaşık %60-%70'i promotörleriyle bağlantılı CpG adacıklarına sahiptirler ve promotörler sahip oldukları CpG yoğunluklarına göre gruplandırılabilir (Saxonov ve ark. 2006; Weber ve ark. 2007).

Promotör-bağlantılı bir CpG adasında görülen DNA metilasyon seviyeleri genellikle negatif olarak gen ekspresyonuyla bağlantılıdır, fakat bazı belirli genler tam tersi etkiyi göstermektedir (Weber ve ark. 2007; Lam ve ark. 2012; Gutierrez Arcelus ve ark. 2013). İlginç olarak, bu negatif korelasyon, bireylerdeki spesifik bir gen için ekspresyon ve DNA metilasyonunu kıyaslarken görünmemektedir (van Eijk ve ark. 2012; Lam ve ark. 2012; Gutierrez Arcelus ve ark. 2013; Wagner ve ark. 2014). Aksine, gen gövdesindeki DNA metilasyonu genellikle gen ekspresyonu seviyeleri ile pozitif ilişkilidir (Lister ve ark. 2009; Gutierrez Arcelus ve ark. 2013). DNA metilasyonu, aynı zamanda, insan genomunda genellikle yüksek oranda metile edilmiş olan Alu ve LINE-1 gibi tekrar eden elementleri baskılama işlevi görmektedir (Kochanek ve ark. 1993; Alves ve ark. 1996). Gen ekspresyonu yapılarının dokularda farklılaştığı gibi, DNA metilasyonu yapıları da aynı şekilde farklıdır (Byun ve ark. 2009; Ziller ve ark. 2013). Aslında, ana doku, aynı ya da farklı bireylerden elde edilip edilmediklerine bakılmaksızın farklı örneklerden alınan DNA metilasyonu profillerinde asıl farklılık gösteren unsurdur (Davies ve ark. 2012; Ziller ve ark. 2013; Jiang ve ark. 2015).

DNA metilasyonu, transkripsiyon faktörü bağlayıcı alanları, insülatör elementleri ve kromatin konformasyonunu etkileyebilmektedir ve bu, ekspresyon kontrolünün çoklu seviyelerine sebep olmaktadır (Jones 2012). Normal DNA metilasyonuna ek olarak, CpG dinükleotitlerdeki metil belirtinin varyasyonları ve

değişiklikleri de bildirilmiştir. Bu varyasyonlar hidrosimetil, formil ve karboksil gruplarının yanı sıra CpG olmayan bölgelerde oluşan metil belirtilerini de içermektedir. Bu varyantlar çok nadirdir ve DNA metilasyonunu değerlendirmek için yaygın olarak kullanılan teknolojilerin çoğu bunlar arasında bir ayırım yapmamaktadır. Bu incelemenin amaçları doğrultusunda, bu şekilde DNA'ya olan tüm modifikasyonlar 'DNA metilasyonu' olarak ifade edilecektir (Meaghan ve ark. 2015).

2.2.1. Yaşlanma Sürecinde DNA Metilasyon Dinamikleri

DNA metilasyonundaki değişiklikler yaşam boyu meydana gelmektedir. DNA metilasyon seviyelerini hem global olarak hem de belirli bölgelerde değerlendiren erken çalışmalar, yaşla ilişkili farklılıklar görülmüştür (Wilson ve ark. 1987; Drinkwater ve ark. 1989; Fuke ve ark. 2004; Kwabi-Addo ve ark. 2007). Yaşamın ilk yılları boyunca, ortalama DNA metilasyon seviyelerinde kanda bir artış gözlemlenmiştir (Martino ve ark. 2011; Herbstman ve ark. 2013). Bu değişimler öncelikle CpG adacık kıyılarında ve raflarında ve CpG adacıklarından yoksun arttırıcılarda ve promotörlerde meydana gelmektedir (McClay ve ark. 2014).

Hayatın erken evrelerindeki DNA metilasyonu kazanımına ve ileri hayattaki genom genelindeki sıra gelen kayıba rağmen, bu değişimler simetrik değildir. İki ana yönde farklılık göstermektedirler: (i) değişim oranı hayatın erken evrelerinde, ileri evrelere göre, daha yüksektir ve (ii) değişimlerin genomik lokasyonları oldukça farklıdır. Hayatın erken evrelerinde, DNA metilasyonu, daha çok adacık kıyılarında ve intergenik bölgelerde olmak üzere, global olarak kazanılırken, ileri hayatta DNA metilasyonu global bir kayıba uğrar, fakat yine de adacıklarda ve kıyılarda kazanılmaktadır (Alisch ve ark. 2012; Gentilini ve ark. 2013; McClay ve ark. 2014).

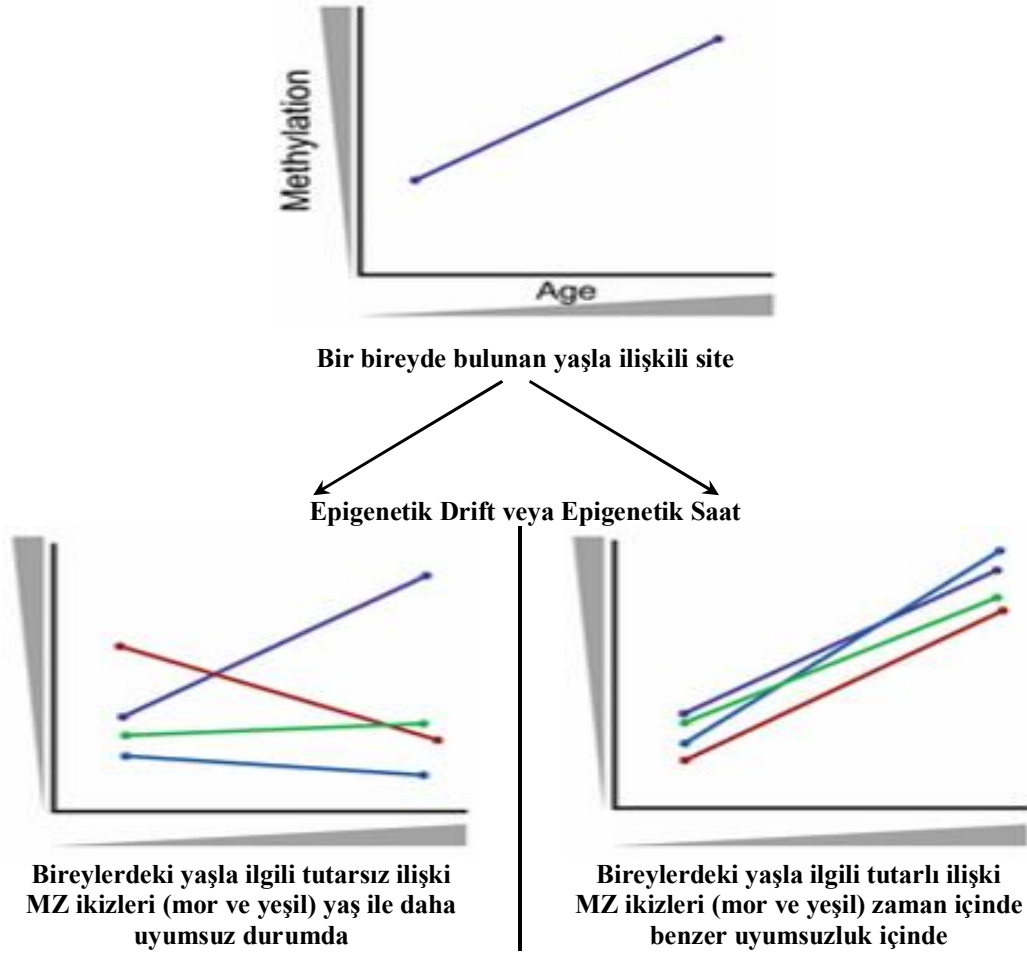
Yaşla birlikte DNA metilasyon değişimlerindeki genel yapılar ek olarak, genomda belirli bölgelerdeki DNA metilasyon seviyelerinin yaşla yüksek seviyede bağlantılı olduğu ve bazı durumlarda da kronolojik yaşı doğru olarak tahmin etmek için kullanıldıkları gösterilmiştir (Bocklandt ve ark. 2011; Horvath ve ark. 2012; Hannum ve ark. 2013; Florath ve ark. 2014; Weidner ve ark. 2014). Epigenetik saat bölgeleri, hem belirli bir dokuda hem de dokular genelinde bulunmuştur. Aynı zamanda, bu bölgelerin, yaşla birlikte dokular arasındaki gen ekspresyon

değişikliklerine kıyasla, dokular arasında daha çok uyumlu olduğu ortaya atılmıştır (Horvath ve ark. 2012; Hannum ve ark. 2013; Horvath 2013; Florath ve ark. 2014; Weidner ve ark. 2014).

2.2.2. Epigenetik Saate Karşı Epigenetik Drift: DNA Metilasyonu ve Yaşlanma Arasındaki İlişkinin Altında Yatan İki Olgu

Epigenetik drift ve epigenetik saat, yaşla bağlantılı DNA metilasyon değişikliklerine temel olarak farklı şekillerde katkıda bulunur. Her ikisi de yaşla ilgili olmakla birlikte, epigenetik drift; epigenomlar arasındaki uyumsuzluk zamanla artma eğilimi gösterir. Tersine epigenetik saat; bireylerde yaşla tutarlı şekilde ilişkili olan spesifik siteleri açıklamaktadır. Bazı çalışmalarda, epigenetik drift ve epigenetik saat terimleri birbirlerinin yerine kullanılmasına rağmen, aralarında ayırım yapma gerekliliği tespit edilmiştir (Teschendorff ve ark. 2013). Burada, Epigenetik drifti, bireyin yaşıyla ilgili olan fakat tüm bireyler arasında yaygın olmayan DNA metilasyon değişikliklerin toplamı olarak tanımlanmakta. Öte yandan, Epigenetik saat, bireylerdeki yaşla ilgili olan siteleri temsil etmektedir ve bu yüzden bazı durumlarda kronolojik yaşı tespit etmek için kullanılabilir (Şekil 2. 12) (Fraga ve ark. 2005; Fraga ve Esteller 2007; Kaminsky ve ark. 2009; Hannum ve ark. 2013; Teschendorff ve ark. 2013).

Epigenetik driftin ilk belirtileri, tek hücre hattı klonlarının multipil pasajlar üzerine epigenetik olarak farklılaştığı gözlemlendikten sonra hücre kültür çalışmalarında görülmüştür (Humpherys ve ark. 2001). Ardından bu kavram, monozigotik ikizlerin yaşı ilerledikçe onlar arasındaki DNA metilasyonu uyumsuzluğundaki artışı tanımlamak için kullanılmıştır (Fraga ve ark. 2005; Fraga ve Esteller 2007; Poulsen ve ark. 2007). O zamandan bu yana, bir kişide DNA metilasyonunda stokastik değişim geçiren bir bölgenin başka bir bireyde yaşla birlikte aynı ilişkiyi göstermesi muhtemel olmadığı için, epigenetik driftin bireyler arasındaki spesifik CpGs'lerde her daim gerçekleşmediği ortaya çıkmıştır (Şekil 2. 12)(Heyn ve ark. 2012; Talens ve ark. 2012).



Eğer spesifik bir CpG bölgesi bir bireyde yaşla ilişkiliyse (üstteki şekil), ya epigenetik driftte (soldaki) ya da epigenetik saat sitesine (sağdaki) maruz kalmaktadır. Her iki durum da, bir popülasyonda ya da ikiz grubunda incelendiğinde, farklı karakteristiklere sahiptir.

Şekil 2.12. Epigenetik drift ve epigenetik saatin şekil gösterimi (Jones ve ark. 2015).

Hücre bölünme hızındaki farklılıklar; solunum hızı, enerji tüketimi ve çevresel faktörler gibi pek çok doku ve hücre türü faktörü, bu doku ve hücrelerin görünen epigenetik yaşlanma oranını etkileyebilir. İlginç olarak, indüklenmiş pluripotent kök hücreleri analizi, onların tahmin edilen epigenetik yaşlarının büyük ölçüde düşük ve kaynak somatik dokularına kıyasla sifra çok yakın olduğunu ortaya koymaktadır (Horvath 2013).

2.2.3. DNA Metilasyonu ve Yaşlanma

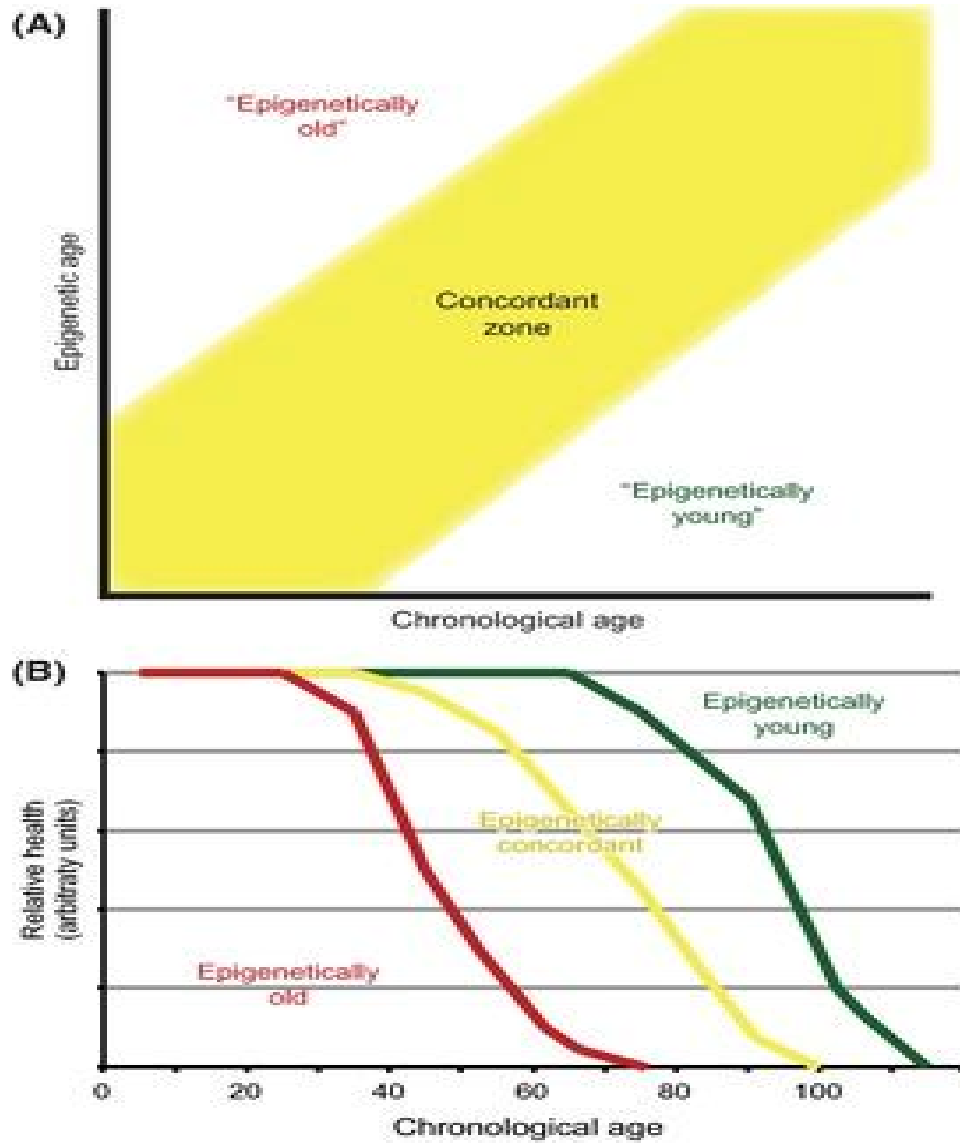
Epigenetik drift ve epigenetik saat, yaşla birlikte DNA metilasyonunda gerçekleşen değişiklikleri tanımlamaktadır ve her ikisi de sık sık yaşla ilgili fenotiplerle ilişkilendirilmektedir (Horvath 2013).

Epigenetik drift, DNA metilasyonunun stabilitesinde ve presizyonunda yaşlanmayla birlikte gelen global düşüşü yansıtmaktadır. Fakat, bu, tutarlı bölgeleri olmayan (epi)genom geneli bir fenomen olduğu için, sağlık sonuçlarını belirleme açısından kullanışlılığı sınırlı olabilmektedir çünkü aynı bireyden alınan boylamsal (longitudinal) numuneler bu süreci takip edebilmek için gerekli olacaktır. Epigenetik saat, öteki yandan, yaşlanmanın biyobelirteci olarak bir potansiyele sahiptir, çünkü bireyler arasında yaygın olan yaşla ilgili fonksiyonel epigenetik değişimleri yansıtmaktadır. Aslında, epigenetik saat, doku örneklerinin epigenetik yaşını tahmin edebilmek için hali hazırda kullanılıyor durumdadır (Horvath 2013).

Epigenetik yaşın biyobelirteç olarak her uygulamasında, tahmin edilen epigenetik yaş, birçok bireydeki kronolojik yaşla kıyaslandığında, genellikle lineer bir ilişki göstermektedir (Şekil 2. 13A). Fakat yüksek ihtimalle bazı bireyler, kendi kronolojik yaşlarından epigenetik olarak daha yüksek (epigenetik olarak yaşlı) ya da daha düşük olan (epigenetik olarak genç) bir epigenetik yaş sonucu ile bu kıyaslamının ters köşesinde kalacaklardır. Bu çalışmalardan bir tanesi, 100 yaşını aşanların olağan dışı genç bir epigenetik yaşa sahip olduğunu ortaya çıkarmıştır (Gentilini ve ark. 2013).

Epigenetik olarak yaşlı ya da epigenetik olarak genç gruptakilerin, uyumlu epigenetik ve kronolojik yaşlar sergileyenlere kıyasla, sağlık sonuçlarını tahmin etmek ilgi çekici bir olasılıktır. Bu durum, artan ölüm oranı ile hızlanmış epigenetik yaşı ilişkilendiren yakın zamanda ortaya çıkan bir çalışma tarafından desteklenmiştir (Marioni ve ark. 2015) (Şekil 2. 13B). Bu şekilde, epigenetik yaş, gelecek zamandaki sağlık düşüşü için, kronolojik yaşa kıyasla daha güçlü bir prediktör olabilmektedir (Teschendorff ve ark. 2012).

Sigara içme ve obezite gibi spesifik faktörlerin, bireylerde epigenetik yaşı arttırdığı görülmüştür ve bu faktörlerin, aynı zamanda, popülasyonlardaki gerçek yaşam süresini azalttığı saptanmıştır (Elliott ve ark. 2014; Weidner ve ark. 2014). Son zamanlarda, yüksek vücut kitle indeksi, karaciğer dokusunda hızlanan epigenetik yaşla ilişkilendirilmiştir, kısacası karaciğer dokusunun tahmin edilen yaşını donörün yaşına kıyasla beklenenden çok daha fazla yaşlı bulunmuştur (Horvath ve ark. 2014).



(A) Bir popülasyonda, insanlar, epigenetik yaşları kronolojik yaşlarından daha yüksek olduğu zaman, epigenetik açıdan yaşlı olarak nitelendirilebilirler. Epigenetik olarak genç buldukları zamanda da bu durumun tam tersi geçerlidir, ya da uyumlularsa bunların hiç biri geçerli değildir. (B) Bu grupların yaşlandıkça uyumsuz sağlık gidişatı gösterip göstermeyecekleri üzerinde spekülasyonda bulunmak ilgi çekicidir.

Şekil 2.13. Epigenetik yaş ile kronolojik yaş arasında uyum ya da uyumsuzluk, gelecekteki sağlık durumunun bir göstergesi olabilir (Meaghan ve ark. 2015).

2.3. Histon Modifikasyonu

2.3.1. Histon Asetilasyonu/Deasetilasyon

Histon asetiltransferaz (HAT) ve Histon deasetilaz (HDAC) transkripsiyonu düzenleme aracı olarak histonlar üzerindeki asetil gruplarının eklenmesi veya çıkarılmasını modüle eder (Berger 2007) (Tablo 2. 2).

Asetil lizin kalıntıları, bazı transkripsiyon faktörlerinde ve aynı zamanda kromatin-remodelleme kompleksleri subünitlerinde bulunan bromodomain protein modülünü barındıran proteinler için bağlayıcı platformlar olarak görev sürmektedirler (Dhalluin ve ark. 1999; Jacobson ve ark. 2000; Hassan ve ark. 2002). Histon asetil transferaz (HAT) aktiviteleri genellikle multisubünit komplekslerde bulunmaktadır. Genel olarak, histonlar üzerindeki lizin kalıntıları; asetilasyon, transkripsiyonel aktivasyon ve DNA tamiri ile bağlantılıdır (Grunstein 1997; Kuo ve Allis 1998). Kromatin yapısının, histon proteinlerinin posttranslasyonel modifikasyonu yoluyla düzenlenmesinin, sinaptik plastisite indüklenmesi ve uzun süreli hafızanın oluşması için önemli olduğu ortaya konulmuştur (Akbarian ve ark. 2013). Örneğin; histon asetilasyonu vasıtasıyla kromatinin yeniden şekillenmesi (remodeling), yaşlanma ve yaşla ilişkili nörodejenerasyondaki sinaptik ve kognitif fonksiyonu regüle etmede önemli bir rol oynamaktadır (Fischer ve ark. 2010; Haggarty ve Tsai 96:41-52).

Aksine, histon deasetilasyonu kapalı kromatin durumunun elde edilmesini sağlar. Histon deasetilaz (HDAC) enzimleri, 4 histonu deasetile eder ve nonhiston substratlar üzerinde de etkili olabilmektedir. Genel olarak, histon deasetilasyonu; kromatin rekondenzasyonu, transkripsiyonel represyon ve heterokromatin birleşmesi ile ilişkilidir (Gonzalo ve ark. 2010).

Histon deasetilaz (HDAC) inhibisyonu ile oluşan histon asetilasyon artışı; gen transkripsiyonunu geliştirmekte ve ayrıca öğrenme ve hafızanın altında yatan hücrel bir mekanizma olan hipokampal LTP'yi geliştirmektedir (Fischer ve ark. 2010; Haggarty ve Tsai 96: 41-52). Transkripsiyon için aktif bir işaret olan Lizin 4 (H3K4)'deki histon H3'ün trimetilasyonu, durumsal korku iyileştirmesinin ardından hipokampüste upregüle edilir (Gupta ve ark. 2010).

Brian Kennedy ve çalışma arkadaşları tarafından yapılan öncü çalışmalar, Sir kompleksi Sir2/Sir3/Sir4 proteinlerinin ekspresyonu ile mayadaki uzun ömürlülük arasında belirgin bir korelasyon olduğunu göstermiştir (Kennedy ve ark. 1995). Sir4 silinmesi, maya ile eşleşen lokusların ve telomerlerin susturumunu ortadan kaldırmış ve yaşam süresinde bir azalmaya sebep olmuştur. Aksine, Sir4'teki fonksiyon kazandırıcı mutasyon; Sir kompleksinin konumunun birleşen lokuslardan ve telomerlerden nükleusa olan yer değişimine sebep olmuştur ve ömrü %30'a kadar

uzatmıştır (Kennedy ve ark. 1997). İlginç olanı, Sir2'nin en yakın ortologu olan SIRT1, aynı zamanda yaşlanmayla ilişkilendirilmiştir. SIRT1, lizin 16 pozisyonundaki histon H4'ü ve lizin 9 pozisyonundaki histon H3'ü deasetile eder (Pruitt ve ark. 2006; Vaquero ve ark. 2004), ve aynı zamanda aktivitesini azaltarak p53'ü de deasetile eder. SIRT1 protein seviyelerinde oluşan bir düşüş, fareler ve insan hücrelerinde mitotik aktivite düşüşüyle eş oranda ilerlemektedir. Bu azalmalar, özellikle yaşlanma sürecinde ya da prematüre yaşlanan farelerde görülmüştür (Tablo 2. 2). Bunun aksine SIRT1, hücreler in vitro bölünmek için uyarıldıkları zaman artış göstermektedir ve SIRT1'in upregülasyonu bütün insan tümörleri spektrumunun belirtisidir. Buna uygun olarak, H4K16 asetilasyon kaybının insan kanserinde yaygın bir durum olduğu saptanmıştır (Fraga ve ark. 2005). Bu veriler, SIRT1'in yaşlanma sürecindeki downregülasyonunun, p53'ü hücre yaşama kısıtlanması pahasına stabilize eden bir tümör supresör mekanizmasını temsil edebiliyor olduğunu, göstermektedir. SIRT1, gen ekspresyonunu (Picard ve ark. 2004; Pruitt ve ark. 2006; Oberdoerffer ve Sinclair 2007) fakültatif ve konstitüif heterokromatin formasyonunu (Vaquero ve ark. 2004; Vaquero ve ark. 2007) ve DNA hasar yanıt yolu sinyallemesini (Luo ve ark. 2001; Vaziri ve ark. 2001) ve DNA metilasyon modellerini (O'Hagan ve ark. 2008) regüle edebilmektedir. Bu sebeple, yaşlanma esnasında SIRT1 seviyelerindeki büyük düşüşün genomik instabiliteyi artırabileceği fikrini düşünmek oldukça mümkündür. Bu, hücre viabilitesinde düşüşe ama aynı zamanda kanser yatkınlığında bir artışa sebep olabilmektedir. Normal hücrelerin malignan türlere dönüşümü sırasındaki SIRT1 upregülasyonu, dönüşen hücrelerin ömrünü uzatabilir. Artan SIRT1 ekspresyonunun genomik stabilite fare modelinde (Oberdoerffer ve ark. 2008) hayatta kalmayı yükselttiği gerçeği bu modeli desteklemektedir.

Sirtuin ailesinin bir diğer üyesi olan SIRT6'nın DNA tamiri ve genomik bütünlük için gerekli olduğu öne sürülmüştür. Bu sebeple, SIRT6 eksikliği, farelerde gelişme retardasyonu, lenfopeni, subkutan yağ kaybı, lordoz kifoz, ciddi metabolik bozukluklar ve 4 haftalıkken ölümler gibi dejeneratif yaşlanma benzeri fenotiplere yol açmaktadır (Mostoslavsky ve ark. 2006). Aslında, son çalışmalar, sirtuin inhibitörlerinin kansere özgü güçlü proapoptotik etkiler gösterdiğini ortaya koymuştur (Lara ve ark. 2009).

Kanser ve yaşlanmadaki sirtuin fonksiyonuyla ilgili öğrendiğimiz her şeye rağmen, çoğu Histon asetiltransferaz (HATs) ve Histon deasetilaz (HDACs)'ların bu süreçlerde oynadığı rolün hala bilinmezliği gerçeğini göz önünde bulundurmakta yarar vardır (Gonzalo 2010).

2.3.2. Histon Metilasyonu/Demetilasyon

Histon metilasyonu, transkripsiyonel regülasyonda ve fakültatif ve konstitüif heterokromatin birleşmesinde önemli bir rol oynamaktadır (Lachner ve Jenuwein 2002; Sastos-Rosa ve ark. 2002; Sims ve ark. 2003; Martin ve Zhang 2005; Shilatifard 2006).

Histon metiltransferazları (HMTs), metil grupların H3 ve H4 histonları üstünde lizin ya da arjinin kalıntılarına olan transferinden sorumlu olan enzimlerdir (Tablo 2.2). H4 üzerindeki lizin 20 ve H3 üzerindeki lizin 4, 9, 27, 36 ve 79 sıklıkla metillenir. Lizin kalıntılarının metilasyonu; metilasyona uğrayan belirli lizine bağlı olarak, kromatin üzerinde transkripsiyonel baskıcı ya da aktive edici etkiler bırakabilir. Bu sebeple, H3K9, H3K27 ve H4K20'nin metilasyonu genellikle transkripsiyonel represyonla ilişkilendirilmekte iken, H3K4 (H3K4me3), H3K36 (H3K36me3), ve H3K79 metilasyonu aktif kromatinle ilişkilendirilmektedir (Kouzarides 2002). Stem, progenitör ya da farklılaştırılmış hücrelerin genom geneli kromatin durum haritaları, H3K4me3 ve H3K27me3'nin transkripsiyonel aktivasyon ya da represyon için hazır bekleyen genleri sırasıyla ayırttığını göstermektedir. H3K36me3, kodlama transkripsiyonu alanları işaretlerken; ncRNAs, H3K9me3, ve H4K20me3, perisentrik ve telomerik kromatin gibi heterokromatik alanları işaretlemektedir (Mikkelsen ve ark. 2007).

Histon kodundaki bir diğer karmaşık durum şudur ki; lizin kalıntılarının her biri, spesifik kromatin kompaksiyonu derecesi ve farklı bağlanma platformu sağlamak üzere, tekli, ikili ya da üçlü metilasyona (trimetilasyon) uğrayabilirler (Zhang ve Reinberg 2001). Lizin asetilasyonu söz konusu olduğunda, histonlardaki lizin kalıntıları metilasyonu kromodomain içeren proteinler için bağlanma bölgeleri oluşturmaktadır. HP1 (heterokromatin proteini 1) için bağlanma bölgesi olan H3K9 metilasyonu ve polycomb proteinleri için bağlanma bölgesi olan H3K27 metilasyonu bu duruma örnektir (Zhang ve Reinberg 2001). Heterokromatin proteini 1 (HP1)'in

işe dahil olması, heterokromatin bölgelerinin korunması için önemlidir ve gen promotörlerinin polycomb kompleksler tarafından kullanılması, transkripsiyonel represyon için uygun alan sağlamaktadır. Histon demetilasyonu da incelenmiştir ve bunun lizin metilasyonunun çeşitli biyolojik süreçlerdeki fonksiyonunu antagonize etmekte olduğuna inanılmaktadır (Shi ve ark. 2004; Klose ve Bird 2006; Tsukada ve ark. 2006; Yamane ve ark. 2006 Whetstine ve ark. 2006).

Histon metilasyon şekillerindeki değişiklikler yaşlanma esnasında gözlenmiştir (Tablo 2.2). Ratlar üzerine yapılan erken çalışmalar, H3 ve H4 histonlarının metilasyonunun artan yaşla adım adım azaldığı görülmüştür (Thakur ve Kanungo 1981). Senesens-hızlandırılmış pron fare 8 (SAMP8) modelinin beynindeki histonların posttranslasyonel modifikasyonları üzerine yapılan sistematik bir araştırma yaşlanma esnasında görülen pek çok değişim tespit etmiştir (Wang ve ark. 2010). Yaşlı farelerin; H3 ve H4 histonlarında 7 tane metilasyon bölgesi bulunmuştur. Bunlar içinde H4K20me (lizin 20 üzerinde metile olan H4) ve H3K36me3 (Lizin 36 üzerinde trimetile olan H3), 3 aylık farelere kıyasla 12 aylık SAMP8 farelerinin beyinde büyük ölçüde düşüş göstermiştir. Aksine, H3K27me3, H3K79me ve H3K79me2 bolluğu, ileri yaşlı fare beyinlerinde artış görülmüştür. Yaşlanmış ratların böbrekleri ve karaciğerinde yapılan bir diğer çalışmada ise, mono ve dimetile H4K20 seviyeleri yaşla birlikte büyük bir değişime uğramamıştır. Bunun tersine, H4K20me3 bu dokularda yaşlanma esnasında oldukça artmıştır (Sarg ve ark. 2002). Benzer şekilde, H4K20me3 seviyeleri yaşlanan hücrelerde artış göstermektedir (Fraga ve Esteller 2007). Bu histon işareti, Suv4 –20h1 ve Suv4 –20h2 Histon metiltransferaz (HMTs)'ların ve retinoblastoma aile proteinlerinin (pRb, p107, and p130) koordine hareketi ile stabilize edilmiştir (Gonzalo ve ark. 2005; Benetti ve ark. 2007). Bu yüzden, yaşlanma esnasında bu proteinlerin ekspresyonunda ya da aktivitelerinde oluşan değişimler H4K20me3 değişimlerinin oluşumuna sebep olabilmektedir (Gonzalo 2010).

Tablo 2.3. Yaşlanma ve kanserde histon modifiye edici aktiviteler. Histon modifiye edici aktivitelerin ana bölümleri listesi, onların spesifik aktivitelerini ve hücrel fonksiyonlarını göstermektedir (Gonzalo 2010).

Histon modifiye edici aktiviteler	Aktivite	Fonksiyon
HDACs	Lizin kalıntılarının deasetilasyonu	Kromatin kompaksiyonu, transkripsiyonel represyon, heterokromatin oluşumu, DNA onarımı
HATs	Lizin kalıntılarının asetilasyonu	Kromatin açılması, transkripsiyonel aktivasyon, DNA onarımı, bromodomain içeren proteinlerin alımı
HMTs	Lizin kalıntılarının metilasyonu	Transkripsiyonel aktivasyon (H3K4, H3K36, H3K79), Transkripsiyonel represyon (H3K9, H3K27, H4K20), Heterokromatin birleşmesi (H3K9, H4K20), DNA onarımı (H3K79, H4K20), Kromodomain içeren proteinlerin alımı.
Yaşlanmadaki Histon Modifikasyonları		Kanserdeki Histon Modifikasyonları
↓ SIRT1 ekspresyonu, H3K9, H4K16 ve p53 deasetilazları ↓ H3 ve H4'ün azalan global metilasyonu ↑ H4K20me3 ↓ H3K36me3, H3K9me3, H4K20me ↑ H3K27me3, H3K79me/me2		↑ SIRT1 ekspresyonu ve H4K16 underasetilasyonu ↓ H4K20me3; ve Suv4-20h2 HMT'nin downregülasyonu

Histon deasetilazları HDACs'lar; histon asetiltransferazları HATs'lar; histon metiltransferazları HMTs'lerdir. HMTs'ler durumunda, metile olan spesifik lizin kalıntıları ve onların fonksiyonları belirtilmiştir. Yaşlanma ve kanser sırasında histon modifikasyonlarında gözlemlenen değişikliklerin özeti de sunulmuştur. Yaşlanma ve kanser esnasında, SIRT1 ekspresyonunda ve H4K20me3 seviyelerinde görülen değişikliklerin zıt yönde ilerlemekte olduğu not edilmelidir.

Yaşlanma esnasında, spesifik genom lokuslarındaki histon modifikasyonlarında meydana gelen değişimler de gözlenmiştir. Örneğin; polikomb proteinleri ve ilgili represif epigenetik işaretler, ink4a/ARF lokusunun replikasyon zamanlamasını ve susturumunu regüle etmektedir (Agherbi ve ark. 2009). Genç

hücrelerde, PRC2 (Polycomb Repressive Complex 2) üyesi EZH2 (Enhancer of Zeste Homolog 2) ve PRC1 (Polycomb Repressive Complex 1) kompleks üyeleri Bmi1 (B hücrelerine özgü Moloney fare lösemi virüsü entegrasyonu bölgesi 1) ve M33, ink4a/ARF lokusunda yüksek oranda ekspres edilmiştir. Bu durum, geç S evresi sırasında, lokus susturumu ve yinelenmesi ile neticelenmektedir. Yaşlanma evresine girildiği zaman PRC1 (Polycomb Repressive Complex 1) ve PRC2 (Polycomb Repressive Complex 2) kompleksleri bu lokusta kaybolurlar ve bu H3K27me3 seviyelerinde düşüşe neden olmaktadır. Eş zamanlı olarak, gen 3'ü ve karışık soy lösemi geni 1 proteininin, lokusa karışmasını içeren histon demetilaz jumonji bölgesinin upregülasyonu, ink4a/ARF genleri ekspresyonu ve erken S evresi sürecinde lokus yinelenmesi ile neticelenmektedir. Bu çalışmalar, spesifik lokusların epigenetik durumundaki değişimlerin yaşlanma esnasında önemli bir rol oynadığını belirtmektedir (Gonzalo 2010).

Genel olarak, yaşlanma sırasında histon kalıntılarının metilasyon durumundaki değişimler rapor edilmektedir. Fakat bu bulguların yaşlanma patofizyolojisi için önemi henüz açıklanamamıştır. Histon metilasyonu/demetilasyonunun transkripsiyonel aktivasyon ya da represyonu regüle ettiği gerçeği göz önünde tutulduğunda, bu işaretle meydana gelen değişimlerin yaşlanma ya da kanser gibi yaşlanmayla ilgili hastalıkları toplu olarak destekleyen genleri açabileceğini/kapatabileceğini tahmin edilmektedir(Gonzalo 2010).

2.4. Mikro (mi) RNA'ların Ekspresyonu

ncRNA türlerinin genom fonksiyonu ve bütünlüğündeki rolleri her geçen gün çözülmektedir. En iyi tanımlanan ncRNA'lar miRNA'lardır. Hücre döngüsü regülasyonu, farklılaşması, apoptoz ve tümör baskılanması gibi pek çok farklı fonksiyon miRNA'lara atfedilmiştir (Grillari ve Grillari-Voglauer 2010) (Tablo 2.3).

Tablo 2.4. Yaşlanma ve kanserde noncoding RNA'lar [micro-RNA'lar (miRNA'lar)] (Gonzalo 2010).

Non-coding RNAs	Aktivite	Fonksiyon
miRNA'lar	Hedef mRNA'ların bozulması ya da translasyonlarının engellenmesi	Hücre döngüsü regülasyonu, farklılaşma, apoptoz, tümör supresyonu
↑ Yaşla birlikte miRNA'ların global upregülasyonu		↓ Kansere sürecinde miRNA'ların global downregülasyonu
Spesifik miRNA'ların değişimleri Hücrel strese karşılık upregülasyon Kansere sürecinde tümör supresör miRNA'ların downregülasyonu Kanserde onkogen olarak işlev gören miRNA'ların upregülasyonu		

miRNA'ların bildirilen bazı fonksiyonlarıyla ilgili ve ayrıca, kanser ve yaşlanma fenotiplerine etki edebilecek değişimlerle ilgili özet bilgi sunulmuştur.

Tek bir miRNA'nın yüzlerce hedefi olabileceği tahmin edilmekte ve bu durum genom fonksiyonu için miRNA transkripsiyonunun karmaşıklığını ortaya çıkarmaktadır. Bu miRNA'lar; mRNA'ları bozarak ya da translasyonu engelleyerek, gen ekspresyonunu negatif olarak düzenlerler (He ve Hannon 2004; Liang ve ark. 2009).

İnsan genlerinin yaklaşık %60'ının, sürekli artan sayıdaki bir grup miRNA'lar tarafından kontrol edildiği ortaya atılmıştır (Bartel 2009; Friedman ve ark. 2009). Son zamanlardaki genom geneli analizler, insan genomunun %95'inin transkrip edildiğini göstermekte ve transkriplerin büyük çoğunluğunun kodlanmamış olduğunu göstermektedir (Venter ve ark. 2001; Birney ve ark. 2007). İlginç bir şekilde, epigenetik mekanizmalar; miRNA ekspresyonunu modüle edebilirler (Saito ve Jones 2006) ve miRNA'lar, DNA metiltransferaz (DNMTs)'lar ve histon metiltransferaz (HMTs)'lar gibi kromatin modifiye eden aktiviteler üzerinde etki gösterebilirler (Fabbri ve ark. 2007; Friedman ve ark. 2009). miRNA regüle eden yaşam süresiyle ilgili ilk kanıtlar *C. Elegans*'ları üzerine olan çalışmalardan gelmektedir (Lee ve ark. 1993). miRNA, lin-4'ün; gelişimsel zamanlamayı ve ömrü kontrol eden pek çok sinyal yolunu etkileyen önemli bir transkripsiyon faktörü olan lin-14 proteinini regüle ettiği gösterilmiştir (Boehm ve Slack 2005; Hristova ve ark.

2005). Lin-4'ün upregülasyonunun uzun ömürlülükteki artışın, insülin/IGF sinyal yolağı tarafından ortaya çıktığı görülmektedir. O zamandan beri, hücrelerde bu yol üzerindeki farklı oyuncuları modüle eden pek çok miRNA olduğu tespit edilmiştir (Grillari ve Grillari-Voglauer 2010). Gelecek çalışmaların bu miRNA'ların organizmal yaşlanmada bir rolü olup olmadığını tespit edilmesi gerekmektedir. Bir kaç rapor miRNA ekspresyonundaki değişikliklerle yaşlanma arasında bir korelasyon olduğunu belirtmiştir (Liang ve ark. 2009). Örneğin; karaciğerde global miRNA ekspresyonunun dizilim profillemesi, yaşlanma sırasında miRNA'ların upregülasyonunu göstermiştir (Maes ve ark. 2008).

Genomik instabilitenin akümüasyonu, yaşlanma esnasında oldukça önemli bir faktör olarak görülmektedir. İlginç olarak, hücrel strese karşılık olarak pek çok miRNA indüklenmiştir ve bu durum DNA tamirinde yer alan proteinlerin seviyelerinde düşüşe neden olmaktadır (Crosby ve ark. 2009). Özellikle, hipoksi indüklenebilir faktör-1 (HIF-1) miRNA'ları aktive etmektedir (Pulkkinen ve ark. 2008; Taguchi ve ark. 2008). Daha önemlisi, hipoxia indüklü miRNA'lar, bazı insan tümörlerinde fazla ekspres edilmektedirler ve bu durum, ncRNA'ların, yaşlanma sırasında kansere yatkınlık durumundaki artış ile bağlantılı olduğunu düşündürmektedir (Kulshreshtha ve ark. 2007). Dahası, p53, bazı genomik hasarlara karşılık olarak upregüle olmaktadır. Ayrıca ilginç bir şekilde, p53 miRNA'ların ekspresyonunu regüle etmekte ve bir yandan da miRNA aksiyonunun indirekt bir hedefi olmaktadır (He ve ark. 2007; Park ve ark. 2009). p53'ün miRNA'lar tarafından regülasyonu, bu ncRNA'ları genomik stabilite kontrolünde önemli bir pozisyona taşımaktadır (Gonzalo 2010).

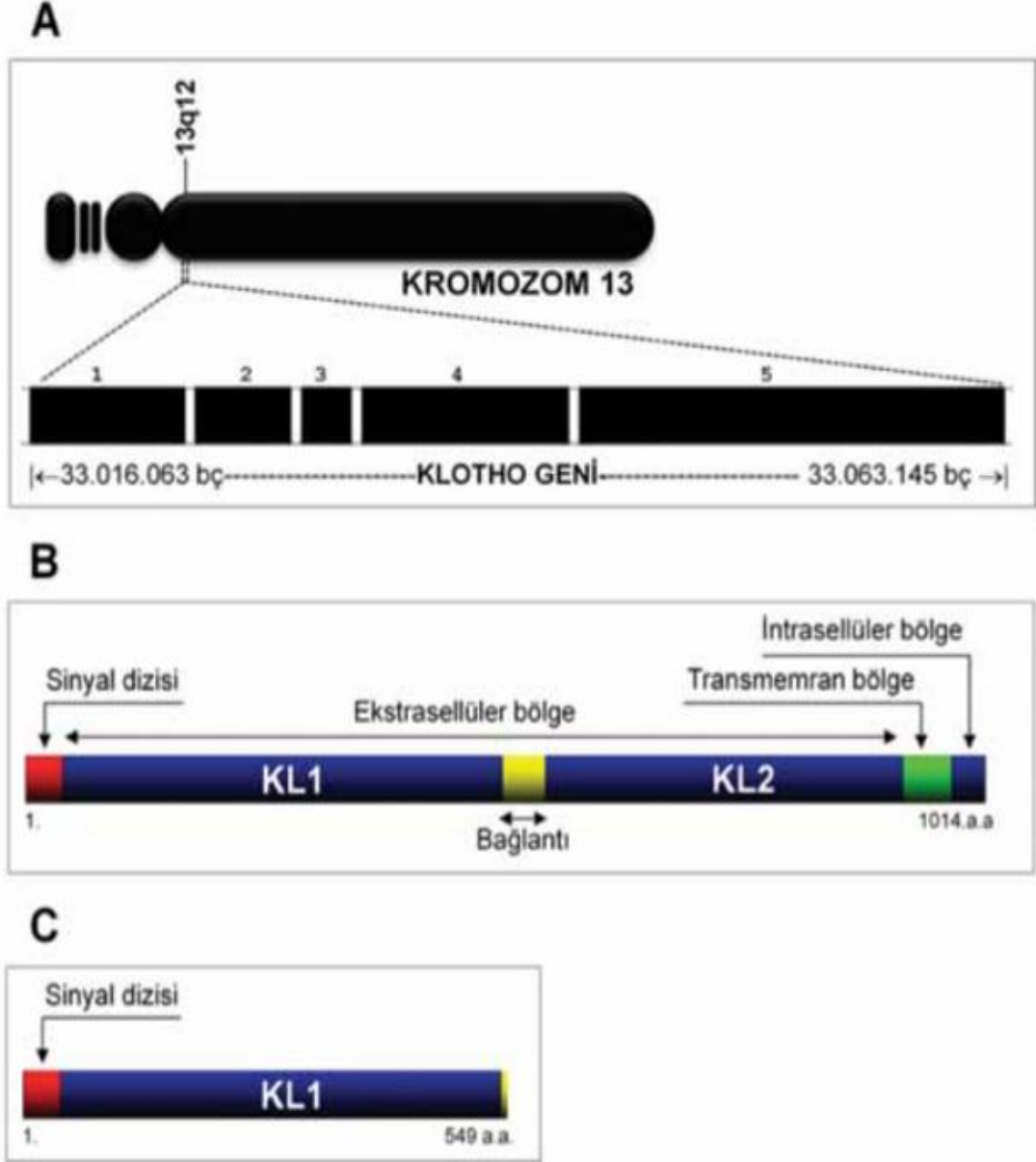
2.5. Klotho Geni ve Bu Gen Üzerinden Kodlanan Proteinler

Klotho geni ilk defa 1997 yılında Kuro-o ve çalışma arkadaşları (Kuro-o ve ark. 1997), tarafından farelerde keşfedilmiştir. Bu gen bakımından kusurlu ve Klotho olarak adlandırılan bu fareler, 3 haftaya kadar normal gelişme göstermekte ve akabinde gelişmeleri yavaşlamakta ve yaşlanma belirtilerindeki artışla birlikte 8-9 hafta içinde ölmektedir. Klotho fareler, tipik yaşlanma fenotipleri olan ateroskleroz, ektopik kalsifikasyon, pulmoner amfizem, deride atrofi ve osteoporoz gibi özellikler göstermektedir (Kuro-o ve ark. 1997). Moleküler düzeyde yapılan çalışmalarda, farelerde bu fenotipik özelliklerin ortaya çıkmasında 5. kromozom üzerinde lokalize

olan genin (KL geni) normal işlevini yapamadığı görülmüştür (Kuro-o ve ark. 1997). Bu gen, Yunan mitolojisine göre üç kader tanrıçasından biri olan ve hayat ipliğini eğiren Klotho'dan esinlenerek Klotho geni olarak adlandırılmıştır (Kuro-o ve ark. 1997).

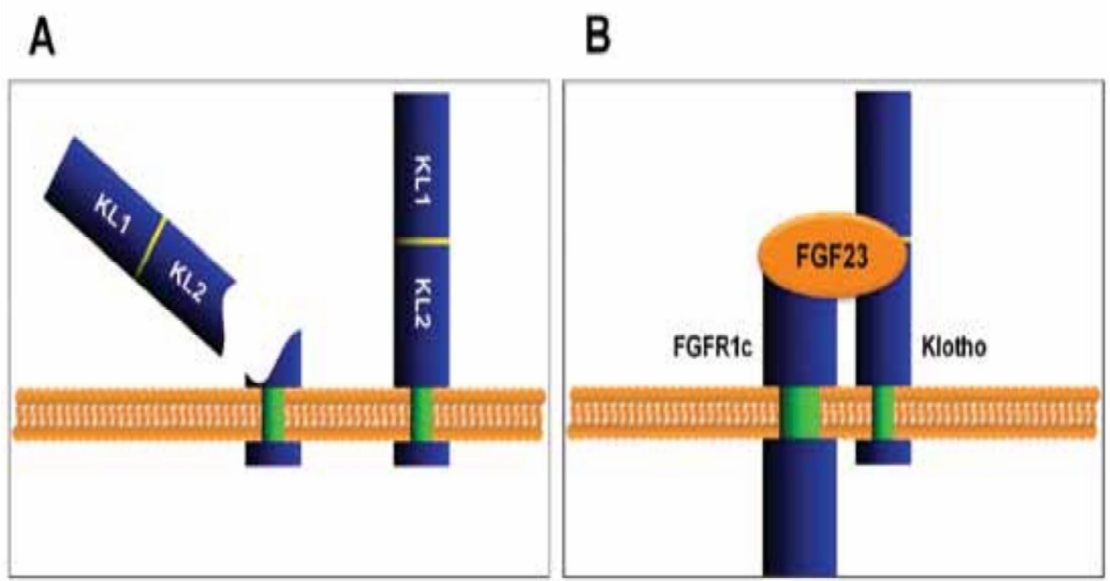
İnsanda; fare KL geni ile homoloji gösteren genin, genomda 13. kromozomun q kolunda bulunduğu tespit edilmiştir (Matsumura ve ark. 1998). Bu gen tarafından kodlanan insan KL proteini fare proteini ile % 86 oranında aynı amino asitlerden meydana gelmektedir (Matsumura ve ark. 1998). Günümüze kadar bu bölgeyle bağlantılı olarak, herhangi bir erken yaşlanma sendromu tespit edilmemiştir. Bununla birlikte, insan yaşam uzunluğu ve koroner arter hastalığını da kapsayan yaş ile ilgili hastalıkların KL geni polimorfizmi ile bağlantı gösterdiği raporlanmıştır (Arking ve ark. 2002; Arking ve ark. 2003).

İnsan KL geni, 5 ekzon ve 4 introndan oluşmakta ve 13. kromozom üzerinde yaklaşık 50 kilobaz çift'lik bir bölgede bulunmaktadır (Matsumura ve ark. 1998) (Şekil 2. 14A). KL geni üzerinden sentez edilen mRNA'ların alternatif işlenmesi sonucunda membrana bağlı ve salgılanan formda iki ayrı KL proteini sentezlenir. Bunlardan, membrana bağlı KL proteini 130 kD ağırlığında 1012 amino asitten oluşan tek-geçişli bir membran proteinidir. Diğeri ise, hücrelerden ekstrasellüler bölgeye salınan çözümlü formda KL proteindir (Matsumura ve ark. 1998; Ohya ve ark. 1998; Shiraki-lida ve ark. 1998) (Şekil 2. 14B ve Şekil 2. 14C). Çözümlü formda KL proteini 549 amino asitten meydana gelir ve yaklaşık 70 kD ağırlığındadır. Membran KL proteini, aminoterminalinde kısa bir sinyal dizisi, karboksi terminalinde ise transmembran bölgesi taşır. Bu proteininin, yaklaşık 980 amino asitlik bir kısmı ekstrasellüler bölgeyi meydana getirir. Hücre içerisinde kalan intrasellüler bölge ise sadece 21 amino asitlik kısımdır (Kuro-o ve ark. 1997). KL proteinin ekstrasellüler kısmı, KL-1 ve KL-2 olarak adlandırılan iki internal tekrar bölgesinden meydana gelir. KL-1 ve KL-2 bölgeleri bakteri ve bitkilere ait β -glukuronidaz enzimlerine homolog dizileri mevcuttur (Tohyama ve ark. 2004). KL-1 ve KL-2 tekrarları arasında kalan bölgede dört bazik amino asitlerden oluşan (Lys-Lys-Arg-Lys), proteolitik kesim için potansiyel hedef dizi yer alır (Wang ve Sun 2009).



Şekil 2.14. İnsan KL geni (A) ve bu gen üzerinden, alternatif işlenme sonucu kodlanan membran bağlı KL proteini (B) ve salgılanan KL proteini (C) yapısı. Klotho geninin lokasyonu 'LocusID-NCBI' a göre verilmiştir (Çağlayan ve Turan 2014).

KL proteinin salgılanan formu; ekstrasellüler KL2 tekrarı, transmembran bölge ve intrasellüler bölgeyi taşımaz. Yapılan son araştırmalarda kan ve serebrosipinal sıvılarda alternatif işlenme sonucu oluşan çözünür formdaki KL proteinine göre daha büyük bir KL proteini tespit edilmiştir (Chen ve ark. 2007). Bunun membran KL proteininin ekstrasellüler bölgesinin ADAM10 ve ADAM17 metalloproteaz enzimleri tarafından kesilmesi sonucu oluştuğu kaydedilmiştir (Wang ve Sun 2009) (Şekil 2. 15A).



Şekil 2.15. Transmembran KL proteinin ekstrasellüler bölgesinin ADAM metalloproteaz enzimleri tarafından kesilmesi sonucu çözünür formda KL proteininin oluşması (A). FGF23 hormonu için KL proteinin kofaktör olarak işlev görmesi (B) (Çağlayan ve Turan 2014).

Çeşitli immünolojik testlerle, KL proteinlerinin farklı organ ve doku hücrelerindeki ekspresyonları ve vücut sıvılarındaki varlıkları çalışılmıştır. Farelerde yapılan araştırmalar sonucunda, KL proteininin baskın olarak, böbrek hücrelerinde ve beyinde koroid pleksus epitel hücrelerinde sentez edildiği, bununla birlikte hipofiz bezi, iskelet kası, idrar kesesi, pankreas ve kolon hücrelerinde de düşük düzeyde eksprese edildiği tespit edilmiştir (Kuro-o ve ark. 1997; Kamemori ve ark. 2002; Li ve ark. 2004). İnsan KL proteininin de böbrek dokularında bol miktarda sentez edildiğini, diğer taraftan ince bağırsak dokularında da KL gen ekspresyonunun gerçekleştiği bulunmuştur (Wang ve Sun 2009). KL proteinin alternatif işlenme ya da ADAM metalloproteaz enzimleriyle kesim sonucu meydana gelen salgı formu; serebrospinal sıvıda, kanda ve ürede bulunmuştur (Imura ve ark. 2004).

Klotho proteinin sentezini başlatan faktörlerin tamamı tespit edilmemiştir ama D vitamini bu alanda önemli bir regülatör olarak görünmektedir. Proksimal renal, distal ve toplayıcı kanal eksikliği bulunan hücrelerde Klotho ekspresyonu, (hem membrana bağlı hem de salgılanan splay değişkenleri) 1,25-dihidroksi vitamin D tarafından regüle edilmektedir (Tsujikawa ve ark. 2003; Forster ve ark 2011). Reporter gen analizlerine göre, D Vitaminine cevap veren aday elementler (VDREs)

fare ve insan Klotho genleri bölgelerinde tespit edilmektedir ve transkripsiyonel olarak aktif bölgeler olarak görülmektedir (Forster ve ark 2011).

β -Klotho, Klotho ile %41 amino asit sekans benzerliği göstermektedir ve öncelikli olarak karaciğer, pankreas ve adipoz dokuda mevcuttur (Ito ve ark. 2000). β -Klotho, safra asidi üretimini regüle etmektedir ve bu enzim aktivitesi eksikliği bulunan fareler yüksek derecede artmış sentez ve safra asitleri ekskresyonuna sahiptirler (Ito ve ark. 2005).

β -Klotho aynı zamanda FGF-21 sinyallemede bulunmaktadır (Ogawa ve ark. 2007; Kharitonov ve Shanafelt 2008; Suzuki ve ark. 2008). Örneğin, BaF3 hücreleri (IL-3'e yanıt veren murin kemik iliği yetersizliği olan pro-B- hücre dizisi) FGF-21 ekspozürüne yanıt vermemektedir. Fakat β -Klotho ve FGFR1c'nin FGF-21 ile tedavi edilen BaF3 hücrelerindeki ortak ekspresyonu, downstream sinyalleme aktivasyonuna neden olmaktadır ve bu durum FGFR substrat 2α 'nın (FGS2 α), MAPK 2 ve MAPK 3'ün fosforilasyonu ile neticelenmektedir (Suzuki ve ark. 2008).

FGF-21, adipositlerdeki insülin bağımsız glukoz transportunu regüle etmektedir (Kharitonov 2009). Aslında, farklılaştırılan fare 3T3-L1 adipositleri FGF-21 ile tedavi edildiğinde, artış gösteren GLUT1 ekspresyonu ile birlikte glukoz alımı stimüle edilmiştir (Kharitonov ve ark. 2005). Buna ek olarak, FGF-21'in diyabetik hayvanlara sistemik verilmesi, kan glukozunda ve trigliserid seviyelerinde önemli ölçüde bir düşüşe neden olmuştur, ayrıca FGF-21'i fazla ekspres eden FGF21-transgenik fareleri yüksek yağlı diyetten kaynaklanan obeziteye dayanıklı olarak tespit edilmiştir (Inagaki ve ark. 2005; Badman ve ark. 2007).

2.5.1. Enerji Metabolizmasında Klotho'nun Rolü

Fazla adipozite, insülin direncinin ve Tip 2 diyabetes mellitus (T2DM), dyslipidaemia, hipertansiyon ve koroner kalp hastalığı gibi müteakip metabolik bozuklukların gelişmesiyle ilişkilidir (Kissebah ve ark. 1989; Hall ve ark. 2003; Sarafidis 2008; Yoon ve ark. 2009; Lee ve ark. 2011; Lin ve ark. 2011; Pan ve ark. 2011). Önemli olarak, hipertansiyon ve Tip 2 diyabetes mellitus (T2DM) gibi obeziteyle ilişkili bozukluklar vücuttaki adipoz dokuların azaltılmasıyla kısmen iyileştirilebilir. Ancak lipodistrofi hastalarında görünenler gibi yetersiz miktarlardaki adipoz dokuları, obezite hastalarında görünen insülin direnci, Tip 2 diyabetes

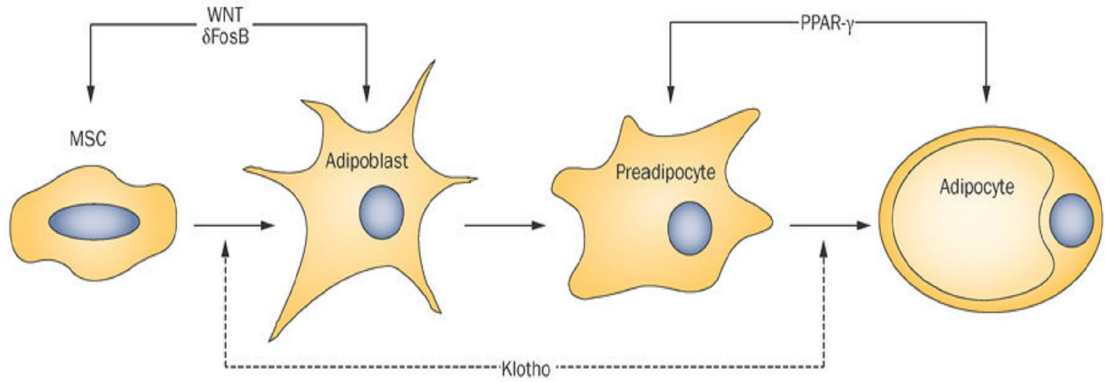
mellitus (T2DM), dyslipidaemia ve hepatik steatoz gibi benzer metabolik komplikasyonlara neden olabilmektedir (Garg 2004). Bu nedenle vücutta yeterli ama aşırı olmayan miktarda adipoz dokusu, fizyolojik enerji dengesini sağlamak için gerekli bir ön şarttır (Razzaque 2012).

Adipojenez ve glukoz metabolizmasında farklı evreler ve olayların saptanmasına rağmen (Mokdad ve ark. 2004; Berger ve Moller 2002), enerji metabolizmasının regülasyonunda yer alan faktörler henüz tamamıyla tespit edilememiştir. Obeziteyi azaltmak ve onunla alakalı komplikasyonları en aza indirmek için etkili bir tedavi geliştirmenin önündeki en büyük engel, enerji metabolizmasında yer alan önemli faktörlerin henüz belirlenmemiş olması ya da *in vivo* bir sistemde yeterince tanımlanmamış olmasıdır. Enerji metabolizmasının altında yatan mekanizmaların aydınlatılması hem biyolojik olarak hem de klinik olarak önemlidir çünkü obezite engellenebilen ancak ölüme neden olan en yaygın ikinci etmen olarak görülmektedir (tütün ürünü tüketmekten sonra gelmektedir) (Mokdad ve ark. 2004).

Geçtiğimiz yıllarda enerji metabolizması alanında asıl araştırma noktası, peroksizom proliferatör aktive reseptör (PPAR) ailesinin fonksiyonel olarak tanımlanması olmuştur. Nükleer reseptörler PPAR- α , PPAR- δ ve PPAR- γ lipid sensörler olarak görev almaktadırlar ve birlikte enerji metabolizmasının regülasyonu için gerekli olan çeşitler genlerin ekspresyonunu düzenlemektedirler. Ancak derinlemesine yalnızca PPAR- γ ile Klotho ilişkisi incelenmiştir (Berger ve Moller 2002). PPAR- γ , besin ve enerji metabolizmasının ana transkripsiyonel regülatörü olarak tespit edilmiştir (Kawai ve Rosen 2010; Wang 2010).

2.5.2. Adipogenez Regülasyonu

Adipogenez, preadipositlerin yetişkin adipositlere farklılaşması aşamasıdır (Şekil 2.16). Geçmiş yıllarda, adiposit olgunlaşmasını başlatmaya ve ilerletmeye katkıda bulunan birçok önemli faktör tespit edilmiştir. Bu faktörlerin disregülasyonu, adipoz dokunun değişen üretimi ve dağıtımıyla neticelenmektedir. Örneğin, PPAR- γ 'daki (adiposit farklılaşmasının ana regülatörü) heterozigot misens mutasyonları, familial kısmi lipodistrofideki hastalık fenotipine bağlıdır (Hegele ve ark. 2002; Francis ve ark. 2006).



Şekil 2.16. Klotho'nun adiposit gelişimine potansiyel etkisidir. Adipositler MSC'lerden iki olgunlaşma aşamasıyla oluşurlar. WNT ve δ FosB, MSC'lerin adipoblastlara farklılaşmasında yer alırlarken; PPAR- γ , preadipositlerin adipositlere farklılaşmasını yönetmektedir. Klotho potansiyel olarak hem MSC'lerin adipojenik soy bağıllığını hem de adipositik olgunlaşmayı etkileyebilmektedir. Fakat bu roller deneysel olarak onaylanmayı beklemektedir (MSC: Mezenkimal Kök Hücre) (Razzaque 2012).

Klotho, preadiposit hücrelerin adiposit hücrelere farklılaşmasını destekleyerek, *in vitro* adipoz hücre olgunlaşmasını etkileyebilmektedir (Chihara ve ark. 2006). Klotho'nun 3T3-L1 hücrelerindeki fazla ekspresyonu, PPAR- γ , FABP4 ve CCAAT- iyileştirici bağlayıcı proteinleri içeren adipojenik faktörleri upregüle edebilmektedir ve bu durum olgunlaşma sürecini başlatmaktadır (Chihara ve ark. 2006). Klotho ekspresyonu PPAR- γ tarafından başlatılmaktadır (Zhang ve ark. 2008) ve PPAR- γ agonistleriyle tedavi (tizolidindionlar gibi) renal epitel hücre dizilerindeki hem Klotho mRNA hem de protein sentezini artırmaktadır, Klotho'nun bu başlatımı ya PPAR- γ antagonistleri ya da PPAR- γ kullanan küçük etkileşen RNA'ların susturumu tarafından bloke edilebilmektedir. Dahası, insan Klotho geninin (KL) 5'-flanking bölgesi içinde kanonik olmayan bir PPAR-cevap elementi belirlenmiştir. Önemli olarak, bu belirlenen bölge fonksiyonel olarak aktif durumdadır ve bu durum, PPAR- γ agonist (rosiglitazon) tedavisinin ardından reporter bir genin artış gösteren transkripsiyonel aktivitesi aracılığıyla kanıtlanmaktadır (Zhang ve ark. 2008). Bu artış gösteren aktivite bir PPAR- γ antagonisti (GW9662) tarafından durdurulabilmektedir (Zhang ve ark. 2008). Tiazolidindionlar ile tedavi edilen C57BL6 fareleri artış gösteren bir Klotho renal ekspresyonu sergilemişlerdir (Zhang ve ark. 2008), ve aynı zamanda, PPAR- γ 'nin adenovirüs aracılığıyla fazla ekspresyonu, böbrekte Klotho ekspresyonunu upregüle

etmektedir (Zhang ve ark. 2008). Benzer şekilde, Klotho ekspresyonu, metabolik sendrom modeli bir hayvan olan Otsuka Long-Evans Tokushima fatty (OLEFT) ratlarının böbreklerinde azalma göstermiştir. Fakat, troglitazon (insülin duyarlaştırıcısı ve PPAR- γ agonisti) ile tedavi, bu ratlarda renal Klotho ekspresyonunu başlatmıştır (Yamagishi ve ark. 2001). Bu *in vitro* ve *in vivo* sonuçlar, PPAR- γ 'nin Klotho ekspresyonunu artırdığını (Zhang ve ark. 2008; Zhang ve Zheng 2008; Wang ve Sun 2009) ama Klotho'nun aynı zamanda adiposit olgunlaşması esnasında PPAR- γ sentezini başlattığını göstermektedir (Chihara ve ark. 2006).

Bu deneysel gözlemler, adiposit olgunlaşmasında Klotho'nun potansiyel bir rolü olduğunu gösteriyor dahi olsa, Klotho tarafından etkilenmiş olabilen adiposit farklılaşması sürecinin regülatör adımları henüz açıklanamamıştır, ve ayrıca, Klotho'nun, multipotent mezenkimal kök hücrelerinin (MSCs) adipojenik bir soya olan bağlılığını yönetip yönetemeyeceğinin hala deneysel olarak tespit edilmesi gerekmektedir. İlginç olarak, kök hücre nakli Klotho seviyelerini değiştirebilir (Min ve ark. 2007; Yamaza ve ark. 2009; Izbeki ve ark. 2010). Klotho aktivitesi (hem $KL^{-/-}$ hem $KL^{kl/k}$) eksikliği bulunan fareler, doğal tip farelere kıyasla, abdominal boşlukta ya da deri altında daha az farkedilebilen adipoz doku içeriğine sahiptir (Kuro-o ve ark. 1997; Nakatani ve ark. 2009a; Nakatani ve ark. 2009b).

2.5.3. Obezite Regülasyonu

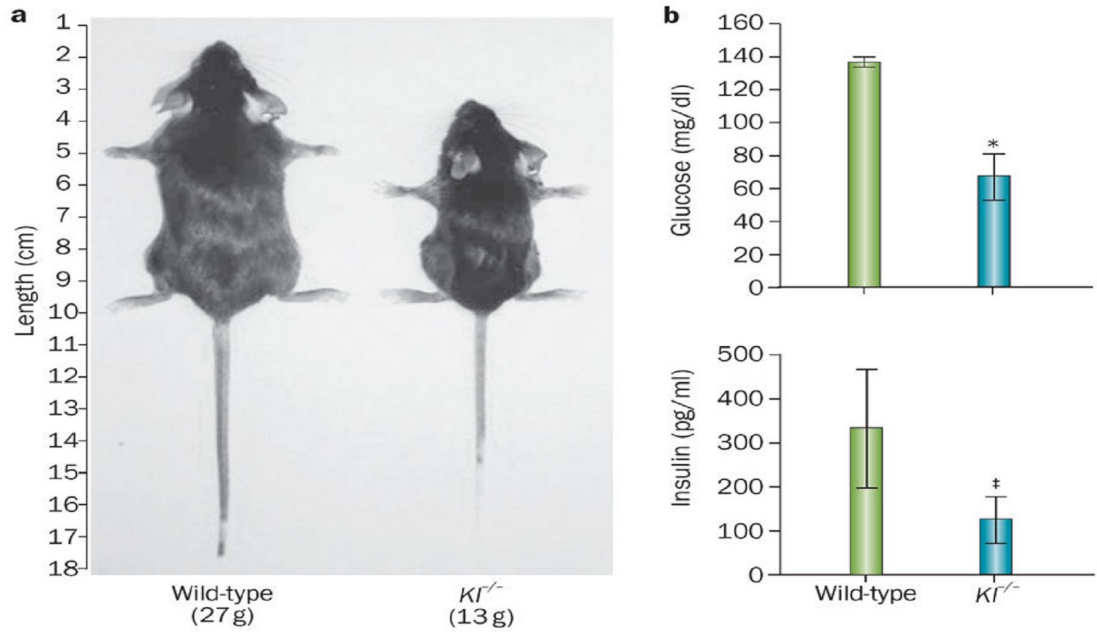
Klotho adipojenik faktörlerin ekspresyonunu başlatıyor olmasına rağmen çözünebilen mi ya da membrana bağlı Klotho proteinin mi transkripsiyonları aktif ettiği belli değildir. KL nakavtı (knockout) ya da knockdown'ı yoluyla genetik olarak farelerdeki Klotho fonksiyonunu durdurmak, azalan beyaz adipoz doku akümüasyonu olan zayıf fareler üretmekle ve aynı zamanda doğal tip farelere kıyasla azalan subkutan adipoz doku tabakası ile neticelenmiştir (Kuro-o ve ark. 1997; Nakatani ve ark. 2009; Ohnishi ve ark. 2009; Ohnishi ve Razzaque 2010). Çok düşük bir Klotho seviyesi sergileyen KL-knockdown ($KL^{kl/k}$) ferelerindeki beyaz adipoz doku kütleindeki gözle görülür azalmaya rağmen, kahverengi adipoz doku kütlelerinde böyle bir azalma görülmemiştir (Mori ve ark. 2000). Dahası, $KL^{kl/k}$ fareleri, onlarla aynı batında olan doğal tiplere kıyasla, karaciğerde azalan glikojen miktarı ve pankreasta düşüş gösteren insülin miktarına sahip olduklarını

göstermişlerdir (Mori ve ark. 2000). Benzer şekilde, $KL^{kl/k}$ fareleri, kahverengi (ısı insüstasyonu sağlayabilen) adipoz dokularda az lipid miktarı göstermişlerdir ve bununla birlikte düşük vücut ısıyla ilişkilendirilen azalmış *Ucp1* ekspresyonu göstermişlerdir (Mori ve ark. 2000). Özet olarak, KL -mutant $KL^{kl/k}$ ve $KL^{-/-}$ farelerinin düşük adipoz doku fenotipleri (Kuro-o ve ark. 1997; Ohnishi ve ark. 2009a; Ohnishi ve ark. 2009b) ve Klotho'nun *in vitro* adiposit-destekleme kabiliyeti (Chihara ve ark. 2006), bu proteinin ya adiposit olgunlaşmasına ya da intrasellüler lipid akümülyasyonuna katkıda bulunabileceğini göstermektedir. Özellikle iskeletsel kas ve karaciğerdeki intrasellüler lipid akümülyasyonu genellikle insülin direnciyle ilişkilidir. $Lep^{ob/ob}$ farelerinden Klotho fonksiyonunun elimine edilmesi, $KL^{-/-}Lep^{ob/ob}$ çift-nakavt (double-knockout) farelerinde (Ohnishi ve ark. 2011) hepatik intrasellüler lipid akümülyasyonunu bastırmıştır, ve bu durum Klotho'nun intrasellüler lipid akümülyasyonunda bir rolü olduğu ihtimalini yükseltmektedir. Klotho'nun, lipid sentezini desteklemesine ek olarak, lipid depolamasını artırıp artıramayacağı henüz açıklığa kavuşturulamamıştır (Razzaque 2012).

Leptin eksikliği olan $Lep^{ob/ob}$ fareleri, yüksek beyaz adipoz doku birikmesinden dolayı, fazla kiloludur; bu fareler 3 haftalık olduklarından itibaren vücut ağırlığı kazanmaya başlamaktadırlar ve 9 haftalık olana kadar doğal tip eşlerinden neredeyse üç kat daha ağırdırlar. Fakat, o zamana kadar $KL^{-/-}$ fareleriyle melezlenen $Lep^{ob/ob}$ farelerinden Klotho aktivitesini elimine etmek, bu ortaya çıkartılan $KL^{-/-}Lep^{ob/ob}$ çift-nakavt farelerinin vücut ağırlığında yüksek oranda bir düşüş sağlamaktadır. Benzer şekilde retroperitoneal, mezenterik ve epididimal adipoz doku akümülyasyonları $KL^{-/-}Lep^{ob/ob}$ çift-nakavt farelerinde, $Lep^{ob/ob}$ farelere kıyasla, daha az seviyededir, bu durum, Klotho'nun $Lep^{ob/ob}$ farelerinin aşırı adipoz doku akümülyasyonu özelliğinde potansiyel bir rolü olduğunu göstermektedir (Ohnishi ve ark. 2011). Buna ek olarak, $KL^{-/-}$ farelerine verilen yüksek yağ (%60) diyeti, standart yağlı (%20) diyetle kıyasla, vücut ağırlığında bir artışa yol açmamıştır (Ohnishi ve ark. 2011). Bu beslenme manipülasyonu çalışmasının sonuçları $KL^{-/-}$ farelerinin yüksek yağlı diyetten kaynaklı obeziteye dayanıklı olduklarını göstermektedir (Rhee ve ark. 2006). Mevcut bilgiler ışığında, bu tarz deneysel gözlemlerin insanlar için geçerliliğini açıklamak mümkün değildir. $Lep^{ob/ob}$ fareleri ve insan metabolik bozuklukları arasında asıl fark, $Lep^{ob/ob}$ faresinin monogenik deneysel bir obezite modeli iken, insan metabolik bozukluklarının genetik geçmiş, çevre ve beslenme alışkanlığı gibi pek çok destekleyici

faktörlerinin olmasıdır. Ek olarak, homozigot *Lep* mutasyonu, farelerde diyabetes mellitus ile birlikte erken başlangıçlı morbid obeziteye sebep olmakta iken, insanlarda bu tip başlangıçlar hayatın daha ileri safhalarında olabilmektedir (Razzaque 2012).

Önemli olarak, $KL^{-/-}$ fareleriyle melezlenen *Lep^{ob/ob}* farelerinde Klotho'nun genetik eliminasyonu aracılığıyla obeziteyi azaltmak, aynı zamanda bu $KL^{-/-}Lep^{ob/ob}$ farelerinin kanındaki glukoz seviyesini azaltmıştır. Bu durum, Klotho'nun, adipojenezin yanı sıra, glukoz metabolizmasını da etkileyebileceğini göstermektedir (Ohnishi ve ark. 2011).



Şekil 2.17. Klotho inaktivasyonunun fizyolojik etkileridir. a) $KL^{-/-}$ fareleri boyut ve ağırlık olarak doğal tip farelere göre daha küçüktür, bu durum kısmi olarak adipoz doku akümülayonu eksikliğinden kaynaklanmaktadır. b) $KL^{-/-}$ fareleri hipoglisemiktir. Daha düşük insülin konsantrasyonuna sahip olmalarına rağmen $P < 0.001$. aynı zamanda, doğal tiplerden $\ddagger P < 0.05$ ve bu yüksek insülin hassasiyetine sahip olduklarını göstermektedir (100 mg/dl glucose=5.55 mmol/l; 100 pg/ml insülin=0.02 pmol/l) (Razzaque 2012).

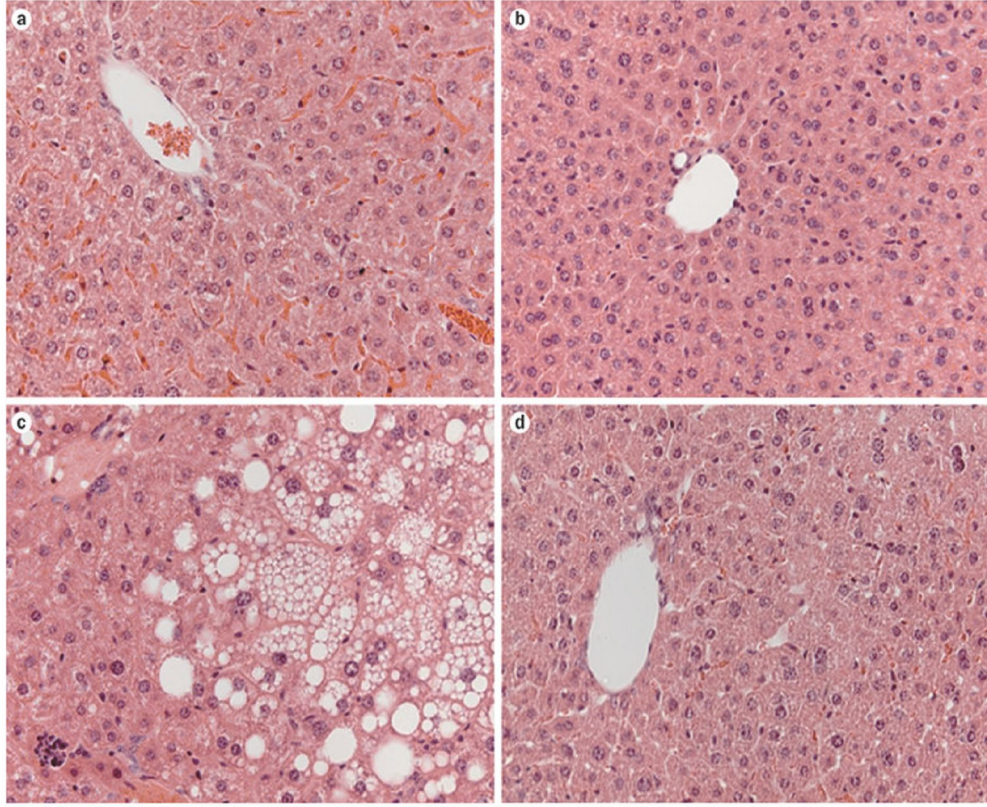
2.5.4. Glukoz Metabolizması

Klotho fonksiyonunun *in vivo* manipülasyonu glukoz metabolizmasını etkilemektedir (Mori ve ark. 2000; Utsugi ve ark. 2000; Ohnishi ve ark. 2011); $KL^{kl/k}$ fareleri düşük pankreatik insülin miktarına sahiplerdir, fakat yine de artan insülin hassasiyetinden dolayı hipoglisemi sorunuyla karşılaşmaktadırlar (Utsugi ve ark. 2000) (Şekil 2.18). İnsülin enjeksiyonlarının ardından kan glukoz seviyeleri

KL^{kl/k} farelerinde, doğal tip kontrol örneklerine kıyasla, yüksek oranda düşüş göstermişlerdir (Mori ve ark. 2000; Utsugi ve ark. 2000; Ohnishi ve ark. 2011).

KL'yi fazla ekspres eden transgenik fareler (EFmKL46 ve EFmKL48) insülin direncinin biyokimyasal özelliklerine sahiptir (Kurosu ve ark. 2005). Klotho'nun doğal tip farelerin pankreasında düşük oranda ekspres edildiği görülmüştür (Kuro-o ve ark. 1997) ve böyle bir ekspresyonun insülin üretimini etkileyip etkilemeyeceği açıklanmamıştır. Dahası, glukoneogenezi artıran bir enzim olan fosfoenolpiruvat karboksikinaz'ın hepatik ekspresyonu KL^{kl/k} farelerinde artış göstermiştir (Mori ve ark. 2000). Alkolik olmayan yağlı karaciğer hastalığı, metabolik sendromun hepatik bir manifestasyonu olarak görülmektedir ve obezite, insülin direnci, Tip 2 diyabetes mellitus (T2DM) ve dyslipidaemia ile yakından ilişkilidir (Anstee ve Goldin 2006; Smith ve Adams 2011; Wree ve ark. 2011). İnsan çalışmalarıyla uyumlu olarak (Anstee ve Goldin 2006; Smith ve Adams 2011; Wree ve ark. 2011), obezite ve Tip 2 diyabetes mellitus (T2DM)'un hayvan modelleri çalışmaları bu hayvanlarda, *Lep^{ob/ob}* farelerindeki benzer şekilde, hepatik yağ değişim özellikleri göstermiştir (Haluzik ve ark. 2004; Ohnishi ve ark. 2011). Tersine, yağ değişimleri, Klotho aktivitesi bulunmayan KL^{-/-}*Lep^{ob/ob}* farelerinin ciğerlerinde görülmemiştir. Çifte-mutant fareler, *Lep^{ob/ob}* farelerine kıyasla, ciğerde daha düşük yağ akümülyasyonuna sahiptirler ve bu durum çifte-mutant farelerdeki düşük kan glukoz seviyeleri ile yansıtılmıştır (Ohnishi ve ark. 2011).

Klotho aktifliği eksikliği olan orta seviye vücut ağırlıklı KL^{-/-}*Lep^{ob/ob}* fareleri fenotipine rağmen, hepatik steatoz tamamiyle elimine edilmiştir (Ohnishi ve ark. 2011). Hepatik steatoz, hepatik insülin direncine yol açan metabolik sendromun integral bir özelliğidir. Bu yüzden, hepatik steatozun Klotho aktivitesinin bastırılması yoluyla KL^{-/-}*Lep^{ob/ob}* farelerinden elimine edilmesi, daha ileri moleküler açıklama ve anlamaya ihtiyaç duyan dikkat çekici bir bulgudur. Klotho aktifliği eksikliği olan KL^{-/-}*Lep^{ob/ob}* farelerinde hepatik steatozun geri döndürülmesinin (reversal) lokal bir etki mi ya da sistemik bir sonuç mu olduğu halen belli değildir. Önemli şekilde, KL^{-/-} fareleri yüksek yağlı diyetten kaynaklanan hepatik steatozun oluşmasına dirençlidirler (Ohnishi ve ark. 2011).



Şekil 2.18. Klotho'nun karaciğer yapısına etkileridir. ciğer kesitleri hematoksilin ve eozin ile boyanmıştır ($\times 40$ büyütülmüştür). a) Doğal tip fareler. b) $KL^{-/-}$ fareleri. c) Leptin eksikliği olan $Lep^{ob/ob}$ obez fareler. d) $KL^{-/-}Lep^{ob/ob}$ çift-nakavt fareleri. KL eksikliği olan fare gruplarının ciğer kesitlerinin hiç birinde steatoz görülmemiştir (Ohnishi ve ark. 2011; Haluzik ve ark. 2004).

2.5.5. Fosfat Metabolizması

FGF-23, önemli bir sistemik fosfat metabolizması regülatörüdür ve Klotho'nun etkilerini göstermesini gerektirmektedir (Razaque ve Lanske 2006; Quarles 2008; Berndt ve Kumar 2009; Razzaque 2009a; Razzaque 2009b; Hu ve ark. 2010; Razzaque 2010; Cheng ve ark. 2011; Razzaque 2011a; Razzaque 2011b). Serum fosfat seviyeleri, FGF-23 tarafından indüklenen yüksek idrar atılımı ile azaltılmaktadır. Klotho'nun varlığı FGF-23'ün bağlama afinitesini, reseptörleri için (Kurosu ve ark. 2006; Urakawa ve ark. 2006; Goetz ve ark. 2007; Goetz ve ark. 2010), yükseltmektedir ve bu durum, FGFR substrat 2, MAPK1 ve MAPK2 fosforilasyonuna yol açmakta ve downstream sinyalleme olaylarının aktivasyonunu başlatmaktadır (Kurosu ve ark. 2006; Urakawa ve ark. 2006; Goetz ve ark. 2007; Medici ve ark. 2008; Goetz ve ark. 2010). $KL^{-/-}$ ya da $KL^{kl/k}$ farelerinde fosfat toksisitesi oluşumu, Klotho'nun *in vivo* fosfat metabolizmasında önemli bir rolü

olduğunu göstermektedir (Kuro-o ve ark. 1997; Osuka ve Razzaque 2012; Ohnishi ve ark. 2011; Nakatani ve ark. 2009). Önemli olarak, X kromozomunda yer alan endopeptidaz kodlayan genlere homolog olan *Phex* (fosfat regüle eden proteinleri kodlar) eksikliği olan farelerde, FGF-23'ün fazla aktivitesinden dolayı fazla oranda üriner fosfat atığı ve ciddi hipofosfatemi olmaktadır (Sitara ve ark. 2004; Liu ve ark. 2006; Nakatani ve ark. 2009). Fakat $KL^{-/-}$ *Phex* çifte-mutant farelerinde oldukça yüksek FGF-23 serum seviyesi olmasına rağmen, *KL*'nin bu *Phex*(fosfat regüle eden proteinleri kodlar)-mutasyonlu farelerdeki genetik inaktivasyonu, onların fenotipini hiperfosfatemiye çevirmiştir. Bu durum, açık bir şekilde, *in vivo* FGF-23 fonksiyonu için *Klotho*'nun büyük önem arz ettiğini göstermektedir (Nakatani ve ark. 2009; Razzaque 2009).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1 Gereç

Çalışma Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi İlaç Ve Tıbbi Cihazlar Dışı Araştırmalar Etik Kurulu'nun 16.03.2018 tarihli ve 2018/1279 sayılı kararınca onaylandı.

3.1.1. Örneklem Grubunun Oluşturulması

Araştırma, Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Hastanesi aile hekimliği polikliniğe müracaat eden bireylerin, Biyokimya Laboratuvarına gönderilen kan değerleri normal olan klinikçe sağlıklı kabul edilen kişiler çalışma kapsamına dahil edildi. Vakaların hastane işlemleri tamamlanmış ve herhangi bir hastalığı olmadığı belirtilen bireyler çalışma kapsamına alındı. Kan değeri normal olan ve herhangi bir hastalığı bulunmayan vakalar ile iletişim sağlandı. Çalışmanın kapsamı, amacı, iletişim sağlanan vakalara anlatılarak, kabul eden, onamları alınan bireyler çalışmaya dahil edildi.

Bireylere öncelikle besin tüketim sıklığı saptama formu verilerek anket uygulandı, bu anket doğrultusunda bireylerin tükettikleri besin miktarları (g/cc) tayin edildi. Bu anket sonucuna göre karbonhidrat beslenenler (%33 ve daha fazla karbonhidrat tüketenler) ve protein beslenenler (%17 ve daha fazla protein tüketenler) şeklinde iki grup oluşturuldu.

Çalışma grupları aşağıdaki şekilde oluşturuldu:

1.Grup: 18-60 yaş aralığında protein beslenen gönüllü bireylerden her hangi bir hastalığı tespit edilmemiş 10 kişiden oluşturuldu.

2.Grup: 18-60 yaş aralığında karbonhidrat beslenen gönüllü bireylerden her hangi bir hastalığı tespit edilmemiş 10 kişiden oluşturuldu.

Oluşturulan bu iki grupta yer alan toplam 20 kişi üzerinde yapılan çalışmamızda vakaların antropometrik ölçümlerden boy, bel, basen, kilo ölçümleri alındı. Kaliper ile yağ kitlesi tespit edildi ve beden kitle indeksi sonuçları kaydedildi.

Kg/m² formülü kullanılarak çalışmada her birey için ayrı ayrı beden kitle indeksi (BMI) hesaplandı. BMI sonuçları WHO'ya göre değerlendirildi.

3.1.2. Materyallerin Toplanması

Numuneler 2mL vakumlu K2EDTA'lı tüplere alındı. Tüplerdeki numuneler 5 dakika alt-üst edilerek numunenin EDTA ile tam karışması sağlandı. Elde edilen bu numune 1mL ependorfa aktarıldı ve üzerine 1mL tampon çözelti ilave edildi. Çalışma için ayrılan bu örnekler -20°C'lik derin dondurucuda çalışma gününe kadar muhafaza edildi.

3.1.3. Kullanılan Kimyasallar

Deneyel çalışmalarda kullanılan kimyasallar;

- Blood Sv DNA İzolasyonu; Kit (Geneall, Cat No: 108-101) kullanıldı.
- Hybrid R Ile RNA İzolasyonu; Kit (Geneall, Cat No: 305-101) kullanıldı.
- RNA izolasyonu yapılan örneklerden cDNA izolasyonu; Kit Hyper Script (GeneAll Cat no: 602-105) kullanıldı.
- Real Time PCR; Realamp Sybr Green Mastermix (High Rox Dye) (Cat no:801-051) kullanıldı.
- Bisülfid Modifikasyonu; Kit (ZYMO RESEARCH-EZ DNA Methylation Direct Cat No: D5020) kullanıldı.
- Elde edilen bisülfid DNA'lar ile Hot-start PCR yapıldı. Kit (2x AmpMaster Hs-Taq; Cat no: 545-002) kullanıldı.

3.1.4. Kullanılan Cihazlar

- Elektroforez tankı ve Güç kaynağı (Life Technologies Model: 4001P).
- Transillumination cihazı (Genedirex)
- Hassas terazi (BEL)
- PCR cihazı (Applied Biosystems Proflex)
- Spin santrifüj cihazı (MRC)
- Eppendorf (Biologix)

- Real Time PCR cihazı (Applied Biosystems ve Step One Plus)
- Ayarlanabilir otomatik pipetler (ABT)
- Pipet uçları (10 μ L, 100 μ L, 200 μ L (Biologix))
- Vorteks (Mrc)
- Santrifüj (24 hazneli mikro 120 Hettich Zentrifugen)
- Dijital ısı bloğu (Benchmark)
- Pudrasız nitril muayene eldiveni (Perfectouch)



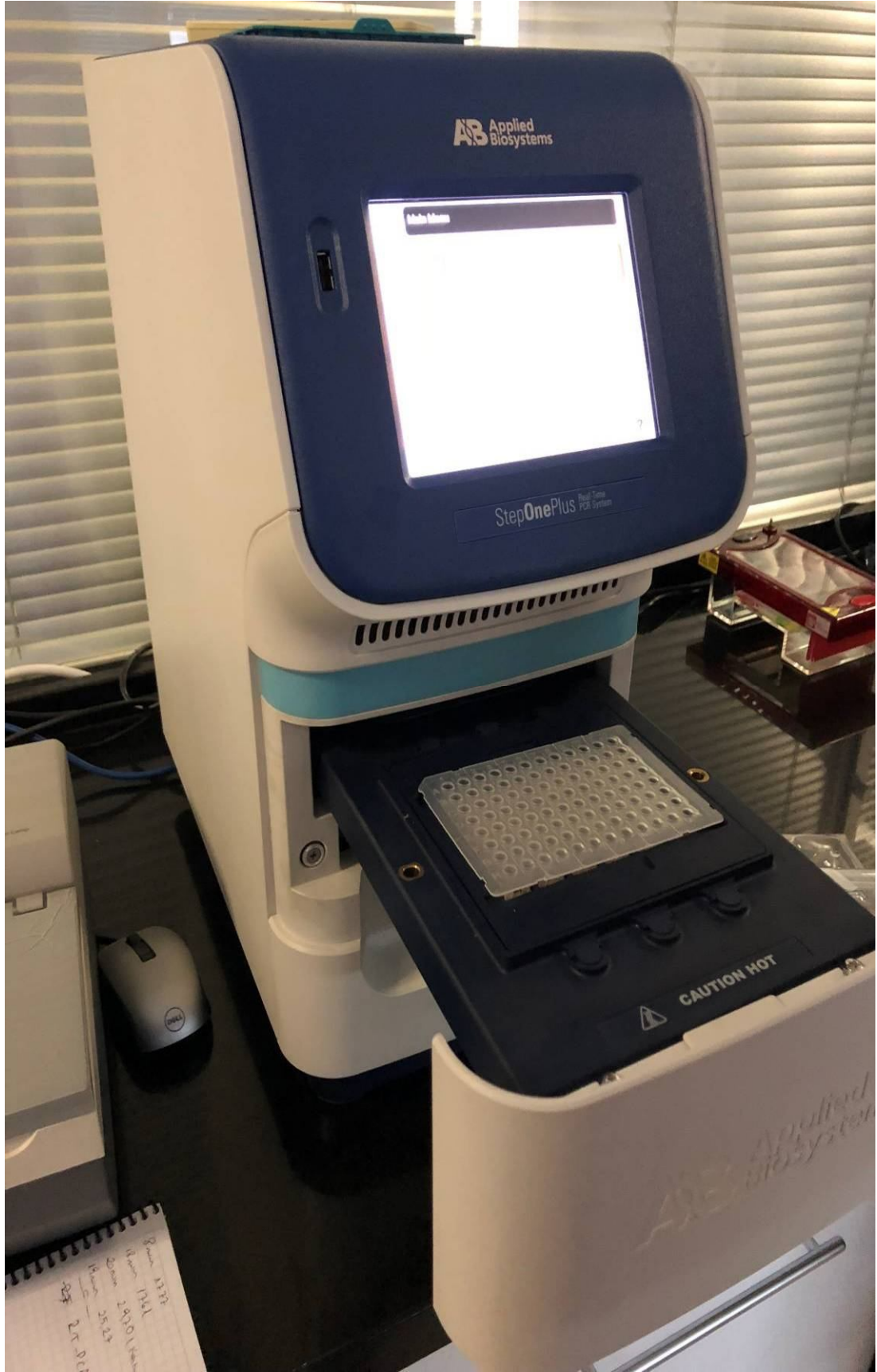
Şekil 3.1. Elektroforez Tankı ve Güç Kaynağı (Life Technologies Model:4001P).



Şekil 3.2. Transillumination Cihazı (GeneDireX).



Şekil 3.3. PCR cihazı (Applied Biosystems ProFlex).



Şekil 3.4. Real-Time PCR Cihazı (Applied Biosystems ve Step One Plus).

3.2. Yöntem

3.2.1. DNA İzolasyonu

Blood SV DNA İzolasyon Kit Protokolü (GeneAll, Cat no: 108-101)

1. 1,5ml' lik tüp içerisine 20uL Proteinase K eklendi.
2. Üzerine 250ul numune eklendi.
3. Optional olarak: 20ul RNase A eklendi. Pipetaj yapıldı ve oda sıcaklığında 2 dk bekletildi.
4. Daha sonra 200ul BL Buffer eklendi. Vorteks ve spin yapıldı ve 56°C 10 dakika inkübe edildi. Spin atırıldı.
5. 200ul absolute ethanol eklendi. Vorteks ve spin yapıldı.
6. Mix kolona aktarıldı ve 10.000 rpm'de 2 dk santrifüj edildi.
7. 600ul BW Buffer eklendi. 10.000 rpm'de 2 dk santrifüj edildi. Collection tüp yenilendi.
8. 700ul TW Buffer eklendi. 10.000 rpm'de 2 dk santrifüj edilir. Collection tüp yenilenir.
9. Boş olarak full speed 14.000 rpm'de 2 dk santrifüj edilir.
10. Kolon temiz ve etiketlenmiş 1.5 ml'lik ependorf içerisine alınır. 60ul AE Buffer eklenir. Full speed 2 dk santrifüj yapılır.

Hybrid R ile RNA İzolasyonu (Geneall, Cat no: 305-101)

1. 200ul numune üzerine 500ul RiboEx eklendi. Oda ısısında 5 dk inkübe edildi. Bu sırada hücre içeriğinin ortaya çıkması için hücre lizis edilmiş oldu.
2. Üzerine 100ul kloroform eklendi. Hücrenin açığa çıkan bileşenleri kloroform sayesinde görünür bir faz ayrımı sağlandı. 4°C' de 12.000g' de 15 dakika santrifüj yapıldı.

3. En üst fazda RNA içeren sıvı başka bir ependorfa alındı. Alınan sıvının hacmi kadar RB1 Buffer eklendi. Pipetaj yapılan mix Type F kolona aktarıldı. 10.000g'de 30 sn santrifüj yapıldı ve collection tüp yenisi ile değiştirildi.

4. Üzerine 500ul SW1 Buffer eklendi. 10.000g'de 30 sn santrifüj yapıldı ve collection tüp yenisi ile değiştirildi.

5. Üzerine 500ul RNW Buffer eklendi. 10.000g'de 30 sn santrifüj yapıldı ve collection tüp yenisi ile değiştirildi. Herhangi bir wash buffer kalma ihtimaline karşın 10.000g'de 1 dk santrifüj yapıldı.

6. Kolonlar RNase-DNase free olan 1.5 ml'lik ependorflara aktarıldı.

7. Üzerine 50ul RNase free su eklendi ve 1 dk oda sıcaklığında bekletildikten sonra 10.000g'de 1 dk santrifüj yapıldı.

8. Örnekler -80°C' e kaldırıldı.

• RNA izolasyonu yapılan örneklerden cDNA izolasyonu aşağıdaki protokole göre yapıldı. HyperScript (GeneAll Cat no: 602-105).

Bileşenler	Miktar
RNA	3 µl
2X Hyperscript One-step RT-PCR master mix	10 µl
Water	7 µl
	55° 1'
	85° 5''
	10 ∞
	(1 cycle)

3.2.2. Real Time PCR Protokolü

Örneklerin RT-PCR ile ekspresyonlarına bakıldı. SYBR Green temelli qRT PCR ile çalışma yapıldı. Kontrol primer olarak ACT-B kullanıldı.

Realamp Sybr Green Mastermix (High Rox Dye) (Cat no:801-051) kullanıldı.

Primerler NCBI yardımı ile dizayn edildi.

Kullanılan Primer

KLOTHO-CDNA-F: CAC AGA GGT TAC AGC ATC AG

KLOTHO-CDNA-R: CAG CAA AGT CAA CAC AGT AGG A

ACTB-F: GATGGTGGGCATGGGTCAGAAGGA

ACTB-R: CATTGTAGAAGGTGTGGTGCCAGAT

PCR BİLEŞENLERİ	Miktar	PCR KOŞULLARI		
Eva Green Mix	6 μ L	95°C	10 dakika	
F(10 μ m)	1 μ L	95°C	15 saniye	
R(10 μ m)	1 μ L	60°C	40 saniye	X40
ROX	1 μ L	95	15 saniye	
cDNA	2 μ L	60	1 dakika	MELT CURVE
WATER	9 μ L	95	15 saniye	
TOTAL	20 μ L			

Çalışma; Applied Biosystems StepOnePlus cihazı ile yapıldı.

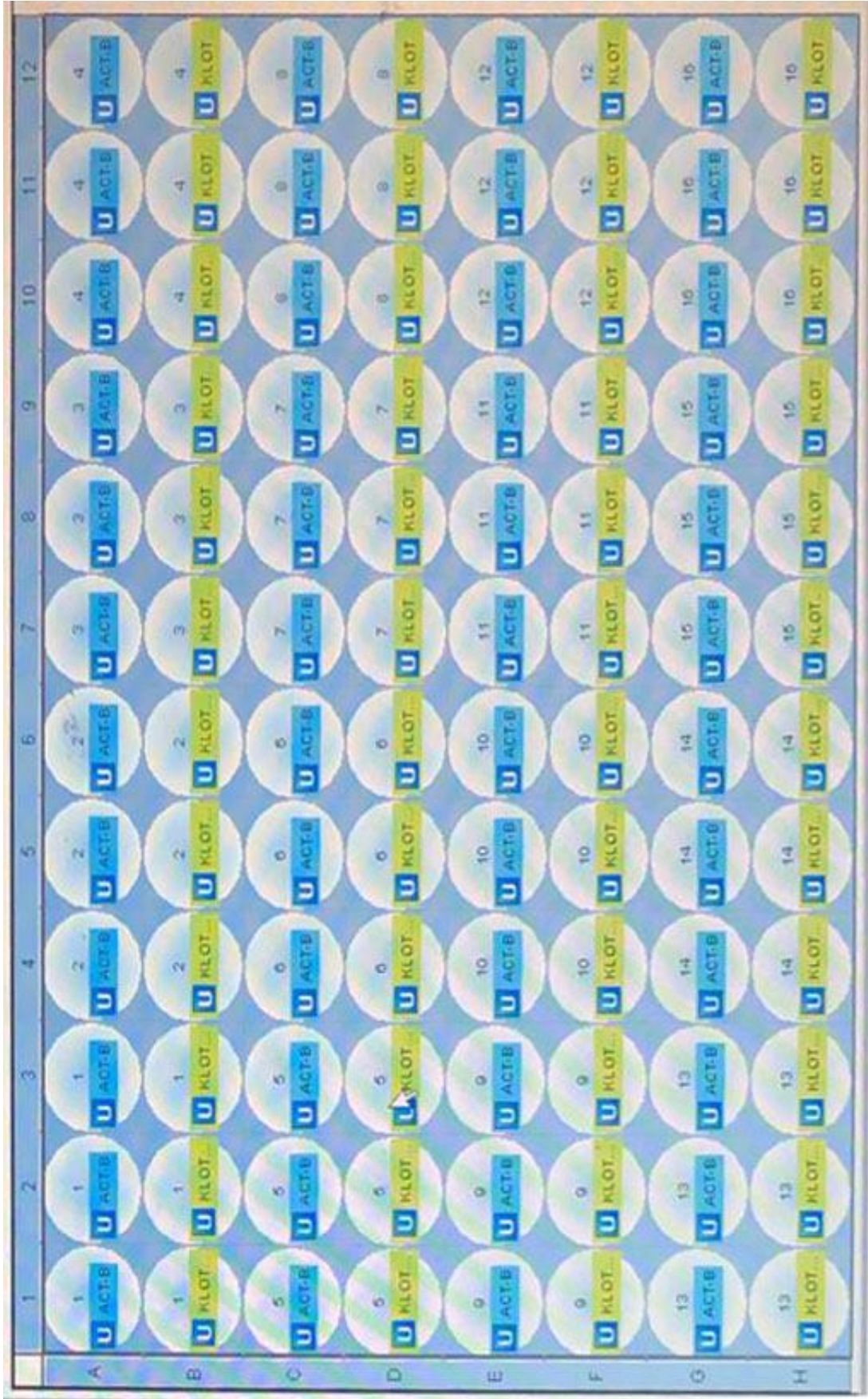
Klotho geninin ekspresyon kantifikasyonu ACTB geni referans olarak kullanılıp kontrol gurubuna göre normalize edilmiştir. Relatif kantifikasyon hesaplaması olan “2- $\Delta\Delta$ CT Yöntemi” kullanıldı.

Real time PCR işlemi sonucunda elde edilen değer Ct (threshold cycle) değeridir. PCR ürünlerinin miktarındaki ilk önemli artışı ifade eder.

- Her bir örneğe ait, her bir genin Ct değerleri, o örneğin housekeeping Ct değerinden çıkartılarak delta siklus eşiği (Δ Ct) değerleri hesaplandı.

- Daha sonra her bir bireyin Δ Ct değerleri kontrol grubunun Ct değerinden çıkartılarak deltadelta siklus eşiği ($\Delta\Delta$ Ct) değerleri hesaplandı.

- Son olarak; her bir genin ne kadar eksprese olduğunu hesaplamak için, son değerlerin başlangıca olan oranı alınarak (fold change) 2- $\Delta\Delta$ Ct değeri belirlendi.



Şekil 3.5. Örneklerin Plate üzerindeki yerleşimi.

3.2.3. Bisülfid Modifikasyonu

(ZYMO RESEARCH-EZ DNA Methylation-Direct Cat No: D5020) kullanılarak bisülfid modifikasyonu yapıldı.

Hazırlık

A. Ct Conversion Reagent'in Hazırlanışı; Ct Conversion Reagent'in içerisine 750 µl distile su ve 210 µl M- Dilution Buffer eklendi ve aralıklı olarak 1-2 dakika vortekslendi. Toplam vortekslenme süresi 10 dakikadır.

B. M-Wash Buffer'ın Hazırlanması; M- Wash Buffer konsantresine 24 ml %100 etanol eklendi.

Protokol

1. 1,5 ml'lik ependorflarda bulunan DNA örneklerinin üzerine 5 µl M-Dilution Buffer eklendi ve distile su ile total hacim 50µl' ye tamamlandı ardından pipetaj yapıldı (örn; 14 µl DNA örneği, 5 µl M-Dilution Buffer, 31 µl distile su).

2. Örnekler 37 °C' de 15 dakika inkübe edildi.

3. 15 dakikalık inkübasyon süresinden sonra her bir örneğe CT Conversion Reagent eklendi ve hafifçe vortekslendi.

4. Örnekler ışık almayan bir ortamda 50 °C de 12-16 saate inkübe edildi (CT Conversion Reagent ışığa duyarlıdır, bu yüzden mümkün olduğu kadar ışıktan uzak tutulmalıdır).

5. Örnekler 10 dakika buz üzerinde inkübe edildi.

6. 400 µl M-Binding Buffer eklendi ve pipetaj yapıldı.

7. Örnekler Zymo-Spin I kolona yüklendi ve kolon 2 ml'lik collection tüplere yerleştirildi.

8. 15-30 saniye hızlıca santrifüj edildi ($\geq 10.000g$). Collection tüpte biriken sıvı boşaltıldı (Collection tüpün kapasitesi 800 µl olduğu için boşaltılması gerekir aksi takdirde kontaminasyon riski oluşabilir).

9. 200 µl M-Wash Buffer eklendi. 15-30 saniye hızlıca spin atıldı.

10. 200 µl M-Desulphonation Buffer eklendi ve kolonlar 15 dakika oda sıcaklığında bekletildi (20-30 °C). İnkübasyondan sonra 15-30 saniye hızlıca spin atıldı.

11. 200 µl M-Wash Buffer eklendi. 15-30 saniye hızlıca spin atıldı. Daha sonra yeniden 200 µl M-Wash Buffer eklendi ve 30 saniye spin atıldı (M-Wash Buffer kalıntılarının tamamen uzaklaştırılması için bu son yıkamada spin süresi biraz uzun olabilir).

12. Kolon matriksine doğrudan 10 µl M-Elution Buffer eklendi ve kolon 1.5 ml lik ependorf tüpe yerleştirildi. Kısa bir spin ile DNA elue edildi. Bu işlem 2 kez tekrarlandı ve total de 20 µl DNA elde edildi.

13. DNA kullanıma hazır hale getirildi. Zymo araştırmalarında her bir PCR reaksiyonu için 2-4 µl DNA kullanılması önerilmektedir.

Primer Dizaynı

KLOTHO-U-F: AGA GGA TGT GTG GTA GGT AAA GAG

KLOTHO-U-R: ACA AAC CAA AAC TAC CTC CAC CCT

KLOTHO-M-F: AGA GGA CGC GCG GTA GGT AA

KLOTHO-M-R: ACG AAC CGA AAC TAC CTC CGC

Klotho metile primerin baz büyüklüğü= 357 bp

Klotho unmetile primerin baz büyüklüğü=260 bp

Elde edilen bisülfite DNA'lar ile Hot-start PCR yapıldı (2x AmpMaster Hs-Taq; Cat no: 545-002).

Bileşenler	Miktar
Hs-Taq	10ul
Primer Mix	2ul
dH ₂ O	6ul
DNA	2ul
Total	20ul

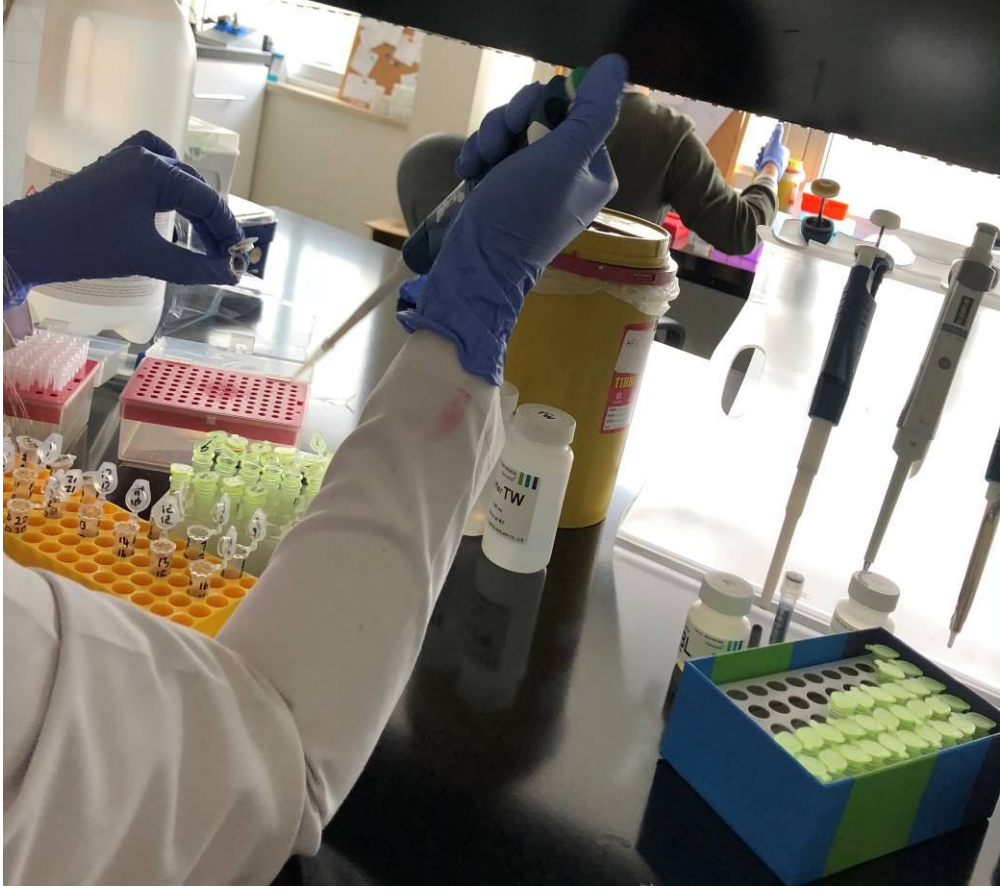
95°	15 dk	}	40 cycle
95°	45 sn		
56°	40 sn		
72°	30 sn		
72°	5 dk		
10°	-		

Per ürünleri %2'lik agaroz jelde 100 V'da 35 dk yürütüldü.

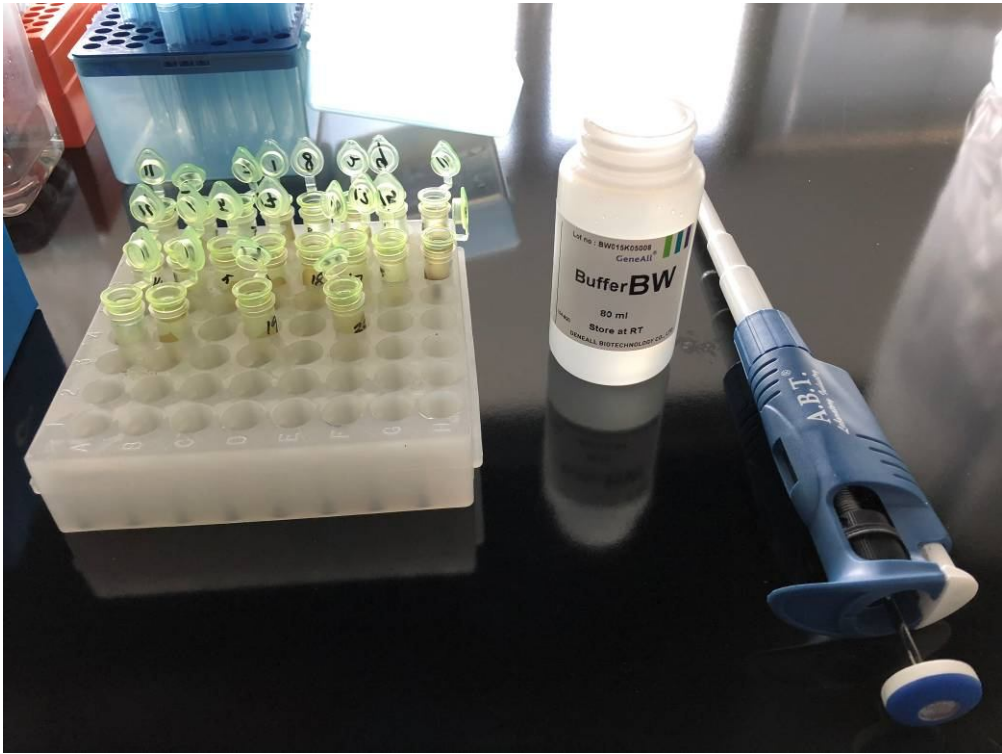
Nzytech agarose	1.2g
Nzytech TBE	60ml
Nzytech Green Safe Premium	2ul



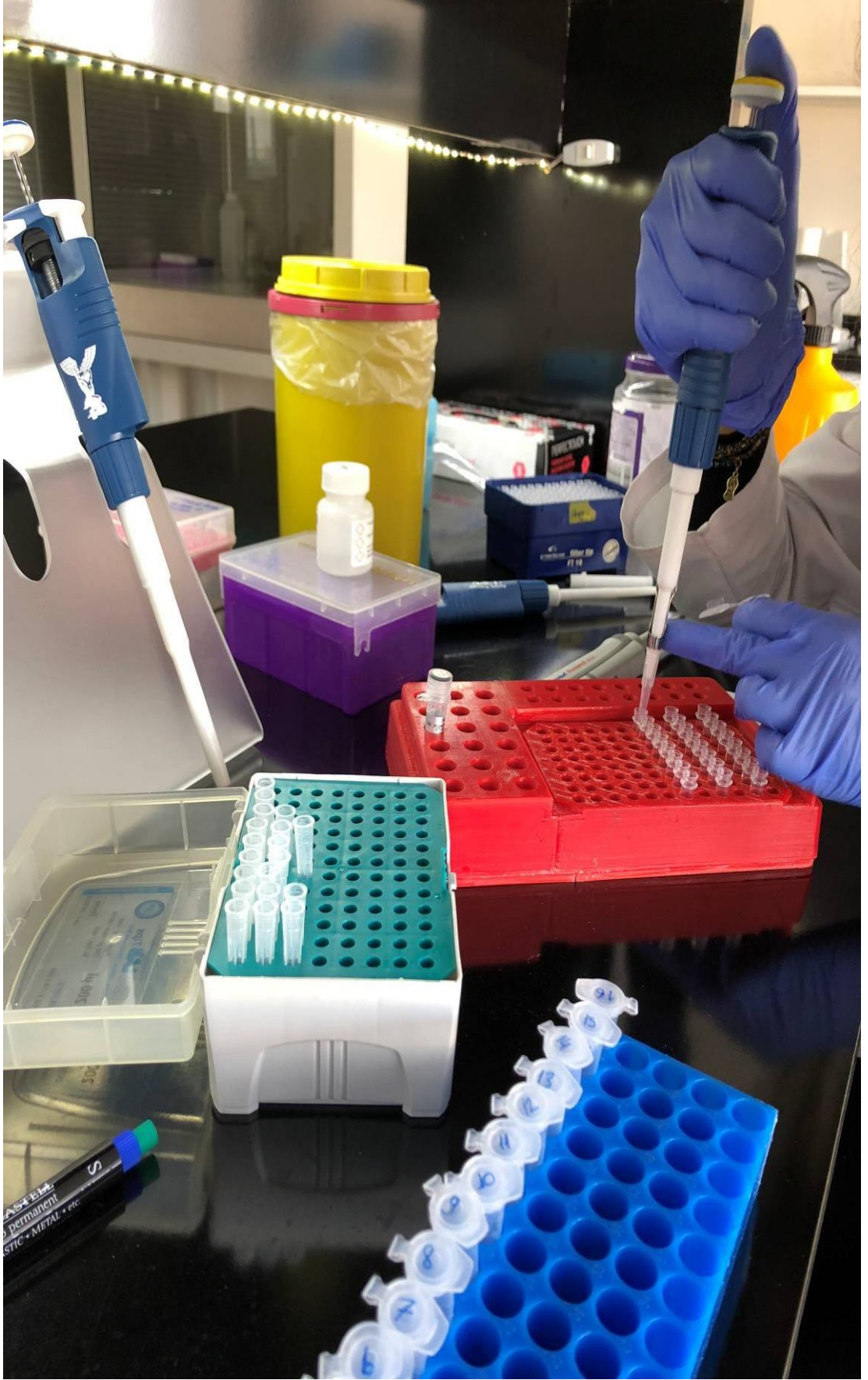
Şekil 3.6. DNA izolasyonu için numunelerin hazırlanması.



Şekil 3.7. DNA izolasyon çalışılması.



Şekil 3.8. Numunelerde DNA izolasyon çalışılma süreci.



Şekil 3.9. RNA izolasyonu için numunelerin hazırlanması.



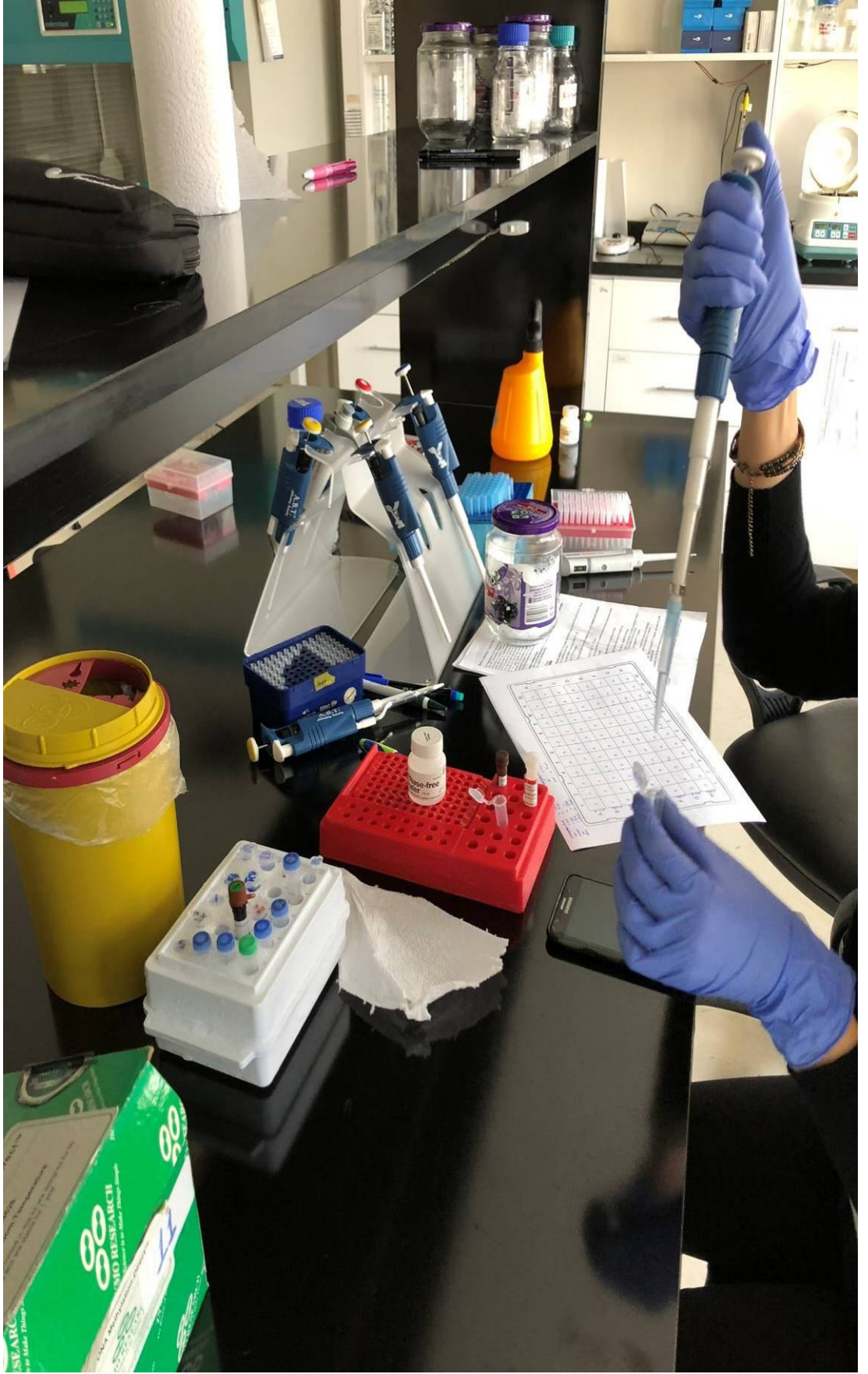
Şekil 3.10. Numunelerin vortekslenmesi.



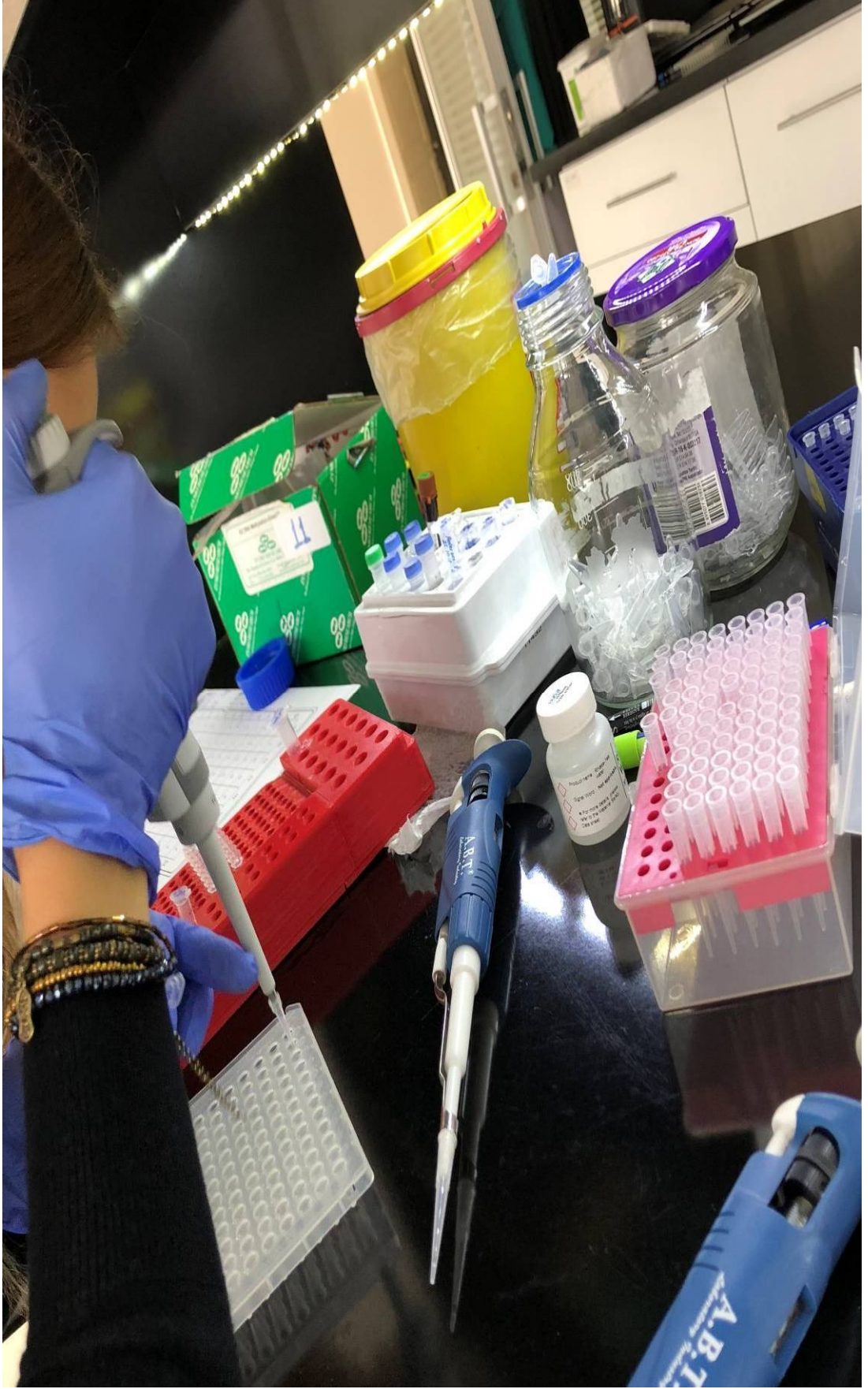
Şekil 3.11. Numunelerin ısı bloğunda bekletilmesi.



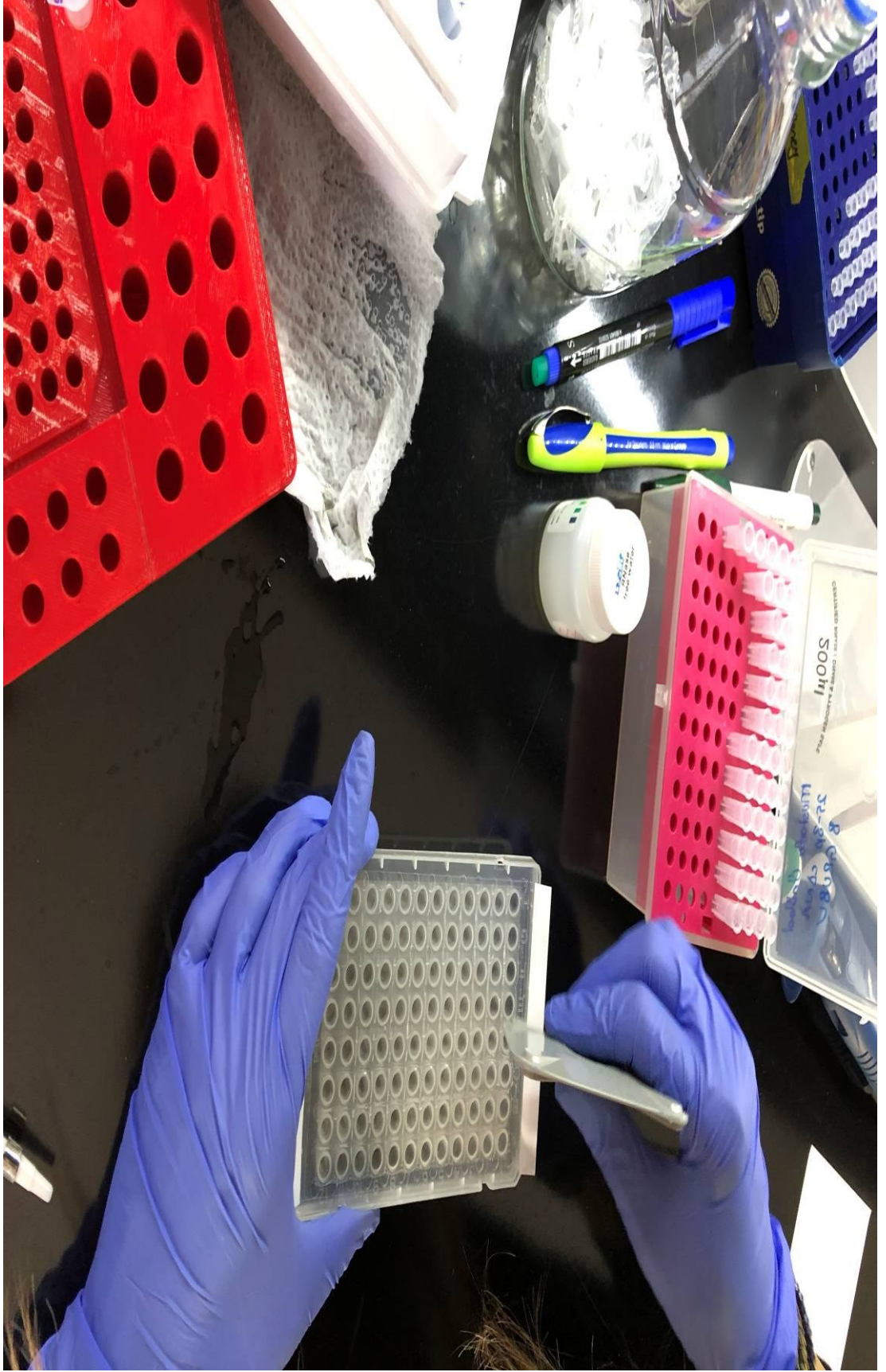
Şekil 3.12. Numunelerin santrifüj cihazına yerleştirilmesi.



Şekil 3.13. RT-PCR çalışması için numunelerin hazırlanması.



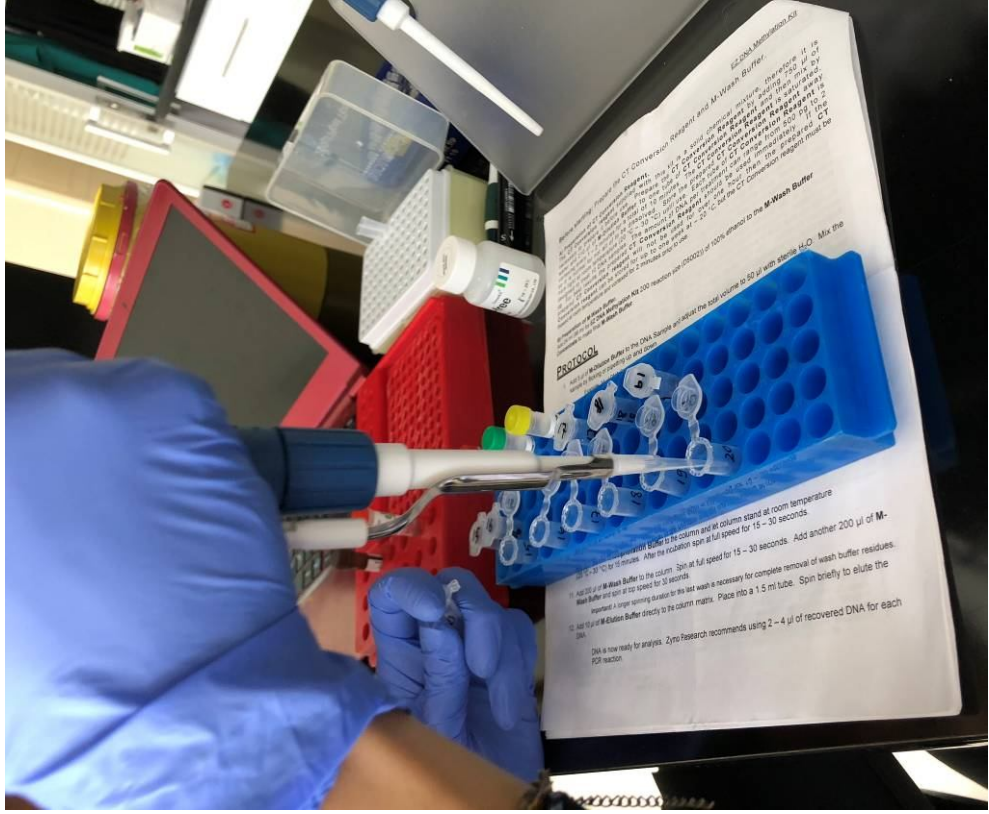
Şekil 3.14. Numunelerin RT-PCR dizaynına göre plate'e aktarılması.



Şekil 3.15. RT-PCR çalışması için numuneler plate aktarıldıktan sonra plate'te hava boşluklarının giderilmesi.



Şekil 3.16. Numunelerin RT-PCR’de çalışılması.



Şekil 3.17. Bisülfid modifikasyon çalışması için numunelerin hazırlanması.



Şekil 3.18. PCR çalışması için numunelerin hazırlanması.



Şekil 3.19. PCR cihazında numunelerin çalışılması.

3.3. Antropometrik Analizler

Boy uzunluğu, bel, beden kitle indeksi, kilo ve kaliper ölçümleri alındı.

Beden Kitle İndeksi (BMI): Denklemine göre [vücut ağırlığı (kg) / boy uzunluğu (m²)] hesaplandı. BMI sonuçları WHO'ya göre değerlendirildi ve obez bireyler çalışmaya dahil edilmedi.

WHO'ya göre;

18.5 kg/ m² 'nin altında olanlar zayıf

18.5-24.9 kg/ m² arasında olanlar normal kilolu

25-29.9 kg/ m² arasında olanlar fazla kilolu

30-39.9 kg/ m² arasında olanlar obez kabul edilmektedir.

Kaliper Ölçümü: Ölçümler sağ koldan ve üç kez ölçüldü. Birinci ve ikinci ölçüm arasında %5'ten fazla fark var ise üçüncü kez ölçüldü. Değerlendirme için ölçümlerin ortalaması hesaplandı.

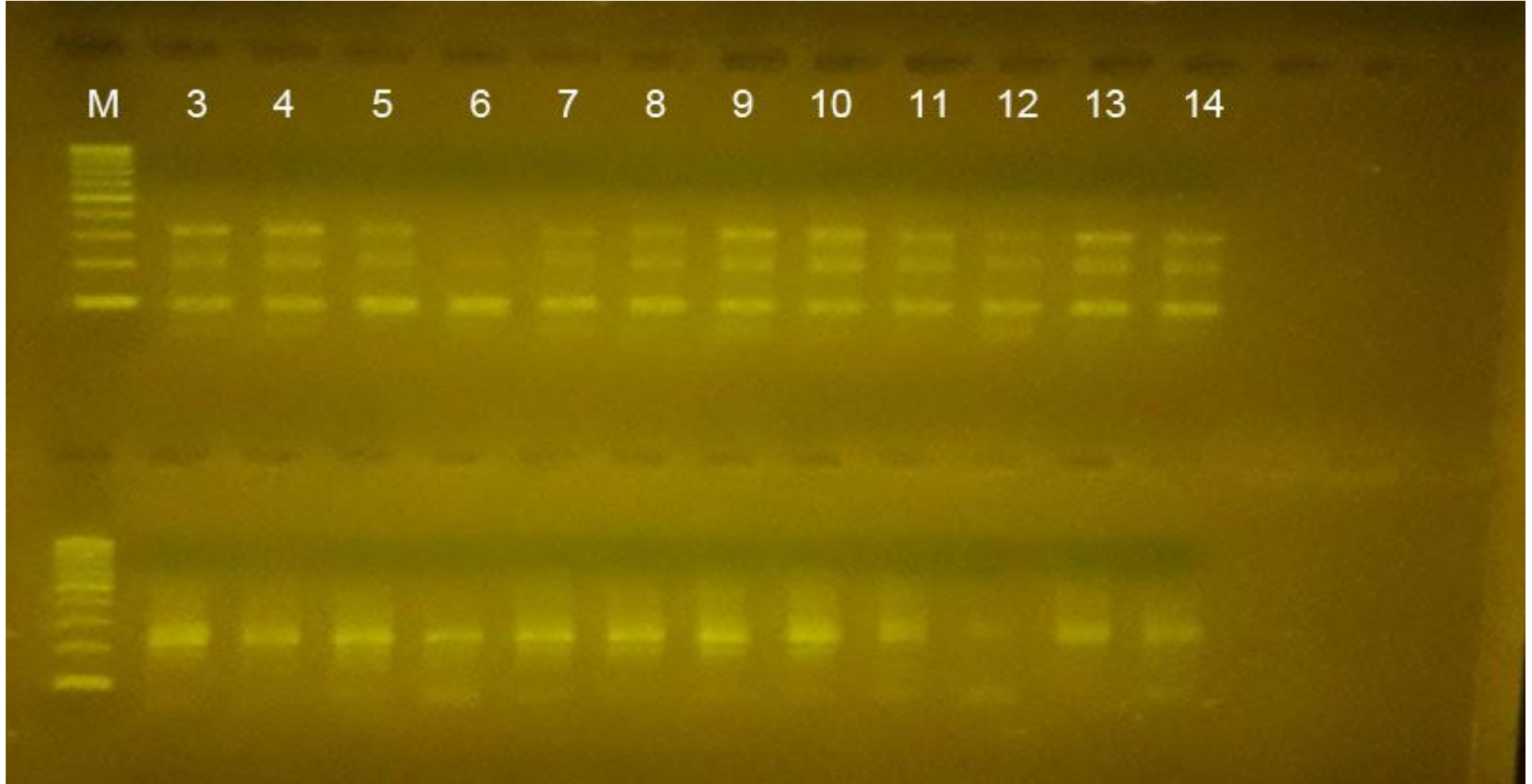
3.4. İstatistik Analiz

Numunelerden elde edilen veriler toplandıktan sonra istatistik paket programı Statistical Package for Social Sciences (SPSS) for 16.0 bilgisayar programına aktarıldı. Gruplar arası karşılaştırma için Mann-Whitney U-testi kullanıldı. Değişkenlerin birbiri ile ilişkisi Pearson korelasyon analizi ile incelendi. Tüm analizlerde 0.05'den küçük p değerleri (p<0.05) istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

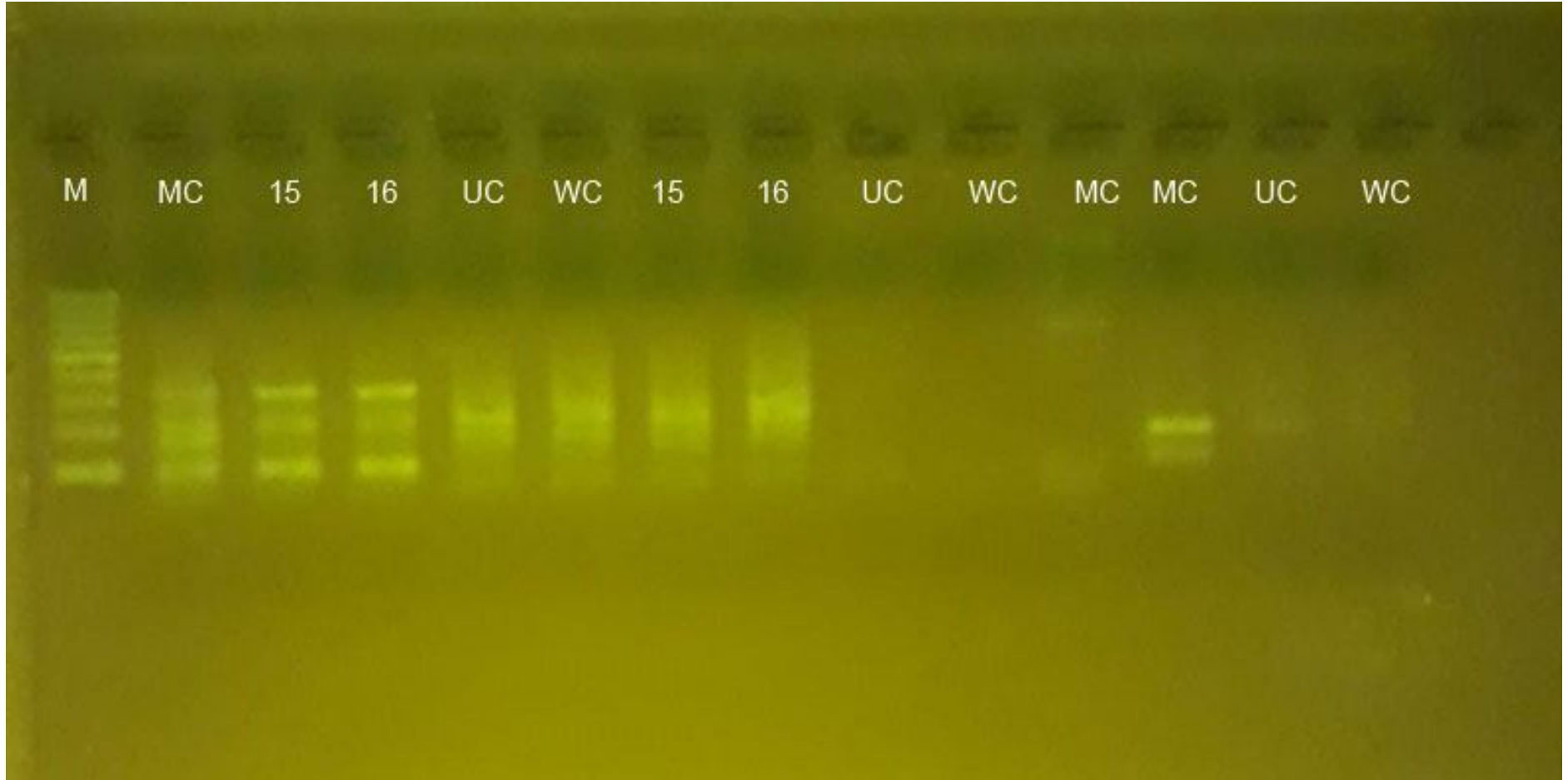
4. BULGULAR

4.1. Analiz Sonuçları ve İstatiksel Değerlendirme

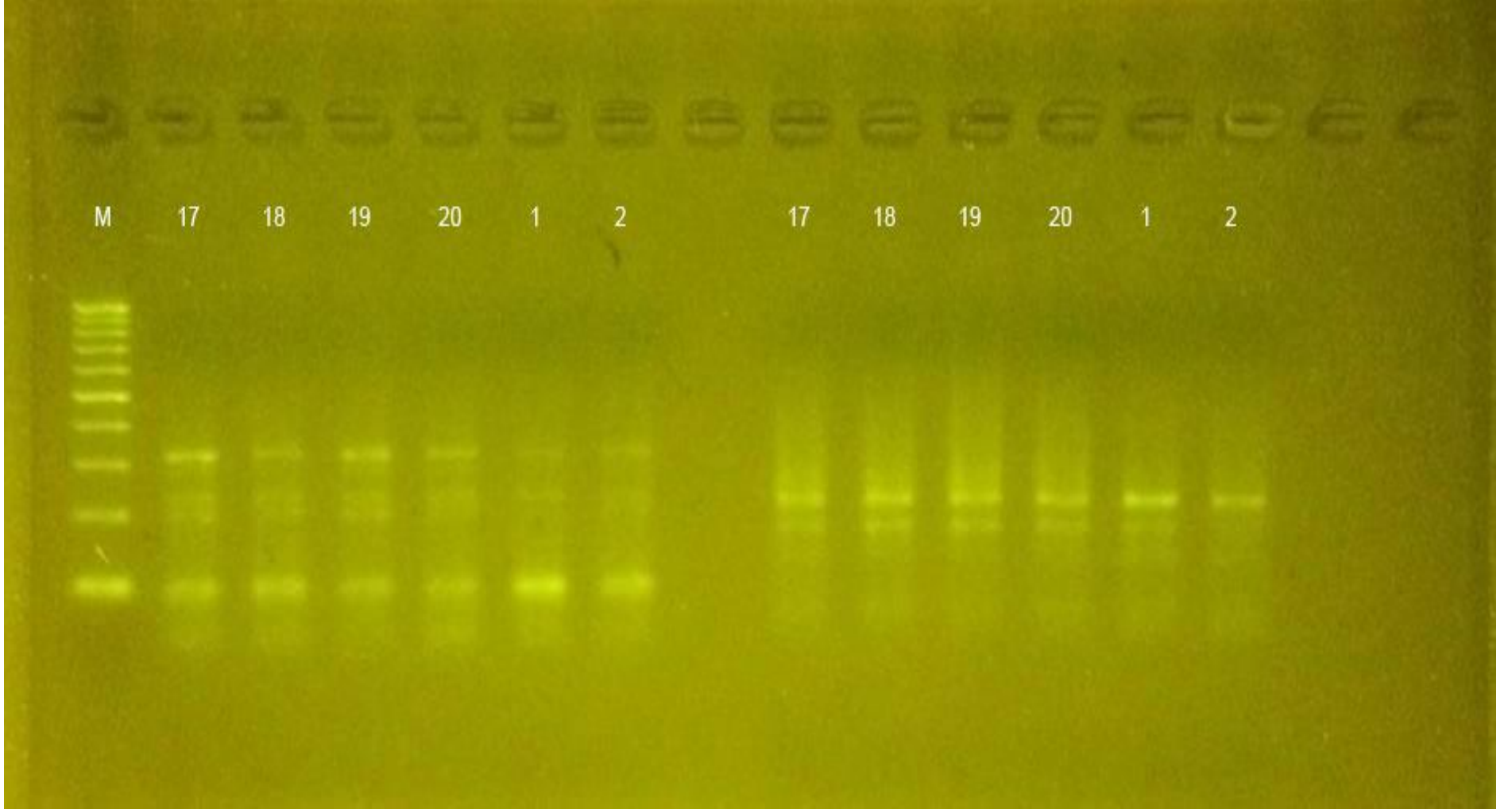
Bisülfıt modifikasyonu sonucu elde edilen bant görüntüleri;



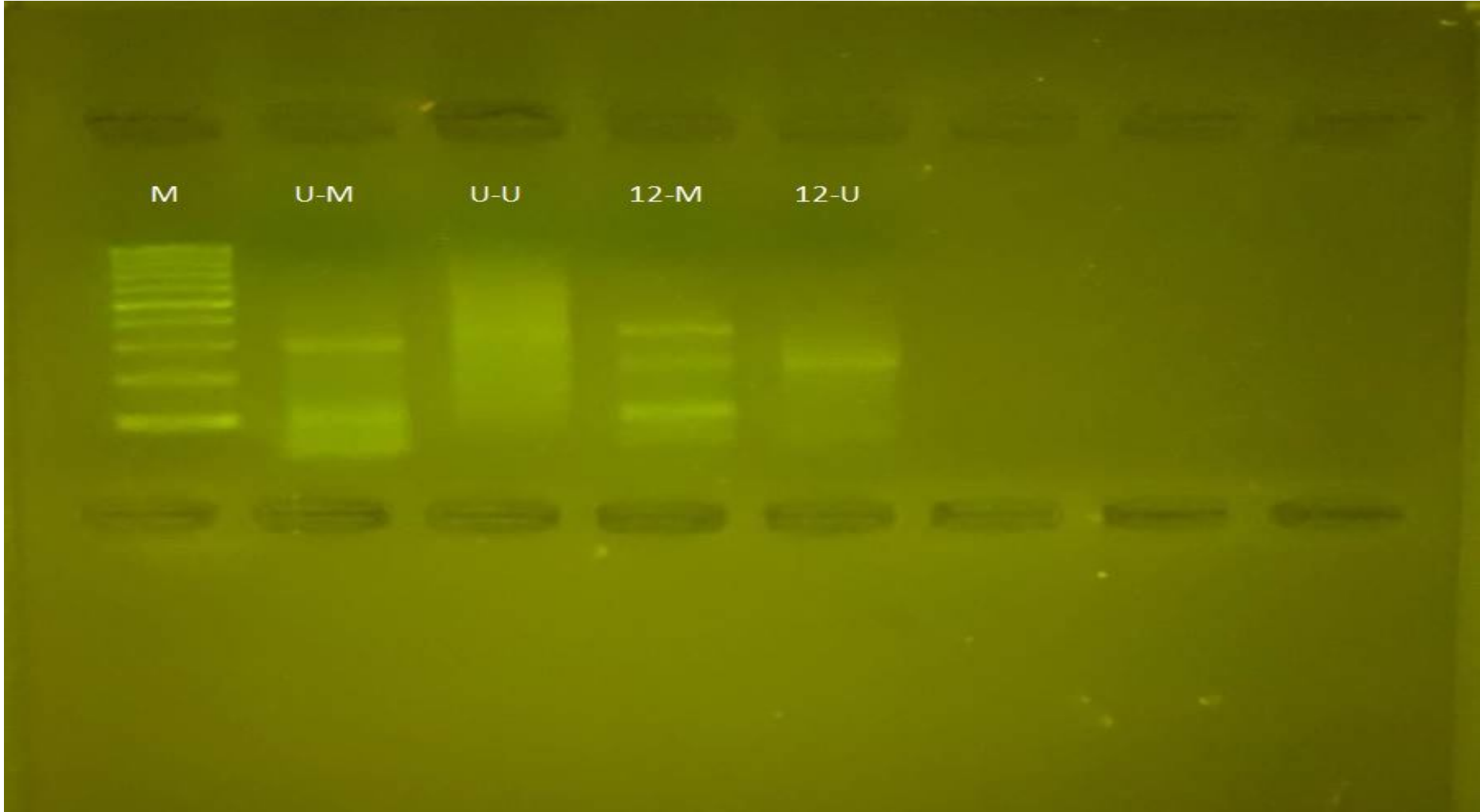
Şekil 4.1. Üst kısımda metile alt kısımda unmetile primerleriyle çalışılan örnekler yer almaktadır. Örnek sırası alt sıra içinde geçerlidir



Şekil 4.2. MC-15-16 numaralı örnekler metile primer ile UC-WC-15-16 numaralı örnekler unmetile primer ile UC-WC-MC kontrol DNA kontrol primer setleri ile son 3 sırada yer alan MC-UC-WC bisülfid DNA'lar kontrol primer setleri ile çalışıldı.



Şekil 4.3. İlk grup metile diğer grup unmetile primerleri ile çalışıldı.



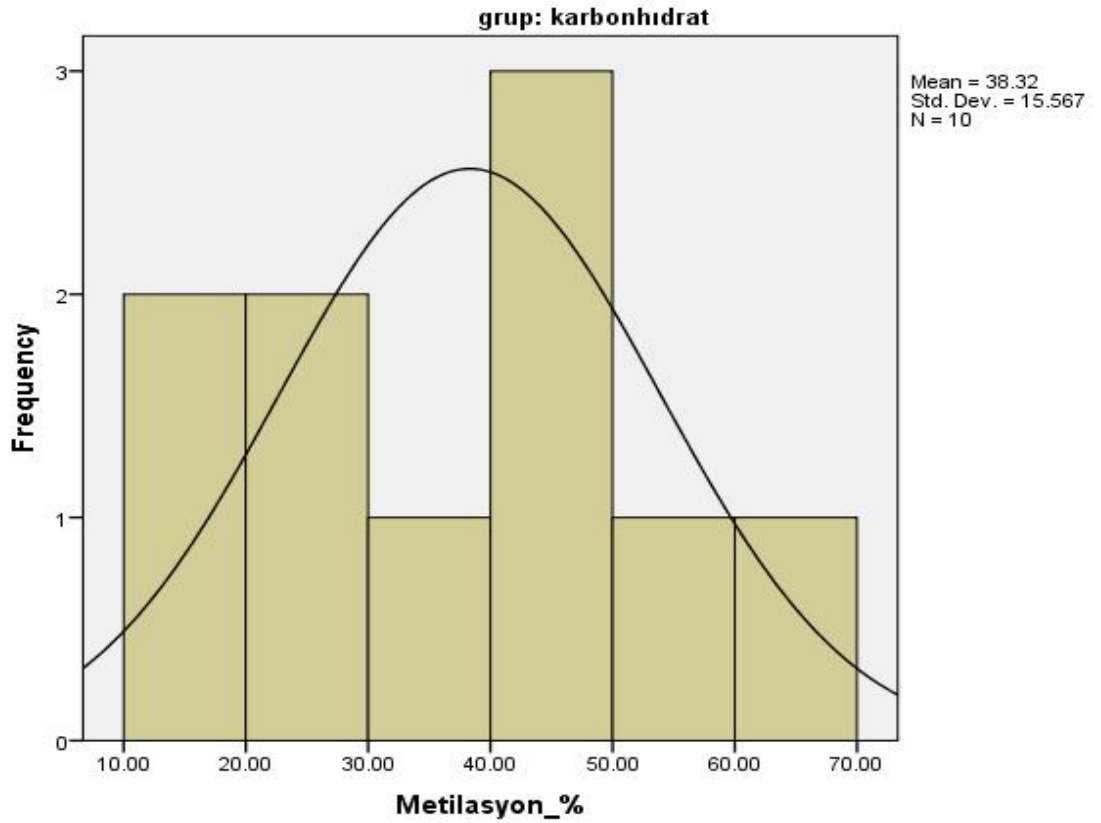
Şekil 4.4. Unmetile kontrol DNA ve 12 numaralı örnekler Klotho M ve U primerlerine ait jel görüntüsü.

Tablo 4.1. Diyet yağ %, diyet karbonhidrat %, BMI ve kolesterol ile metilasyon % arasındaki korelasyon değerleri.

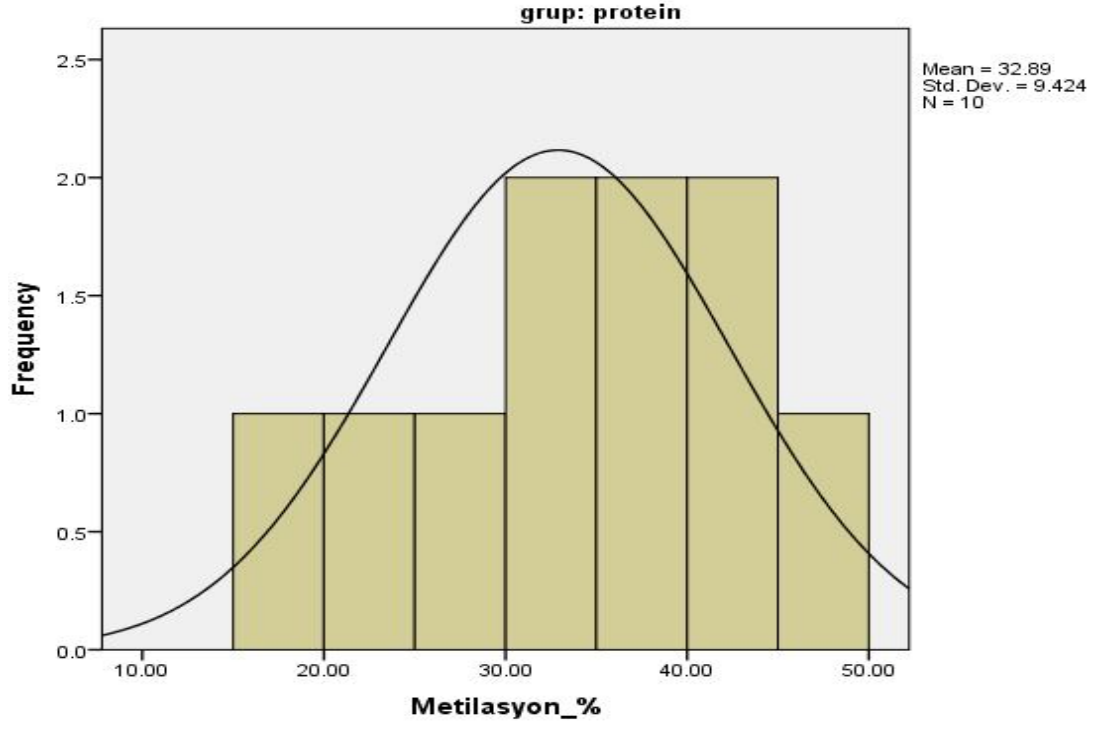
		Yağ %	Karbonhidrat %	BMI	Kolesterol mg
Metilasyon %	Pearson Correlation	-.765	.778	.712	-.556
	P	.005	.004	.01	0,04
	N	10	10	10	10

Tablo 4.2. BMI ile metilasyon % arasındaki korelasyon değerleri.

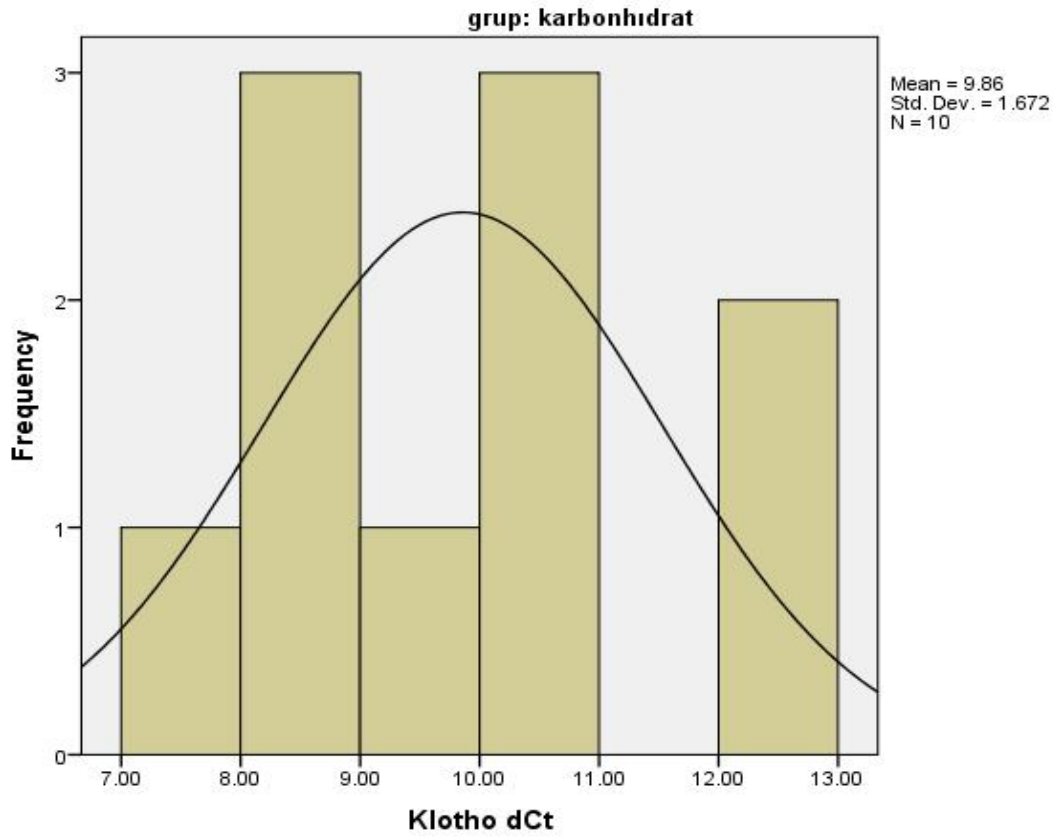
		BMI
Metilasyon %	Pearson Correlation	-.635
	P	.024
	N	10



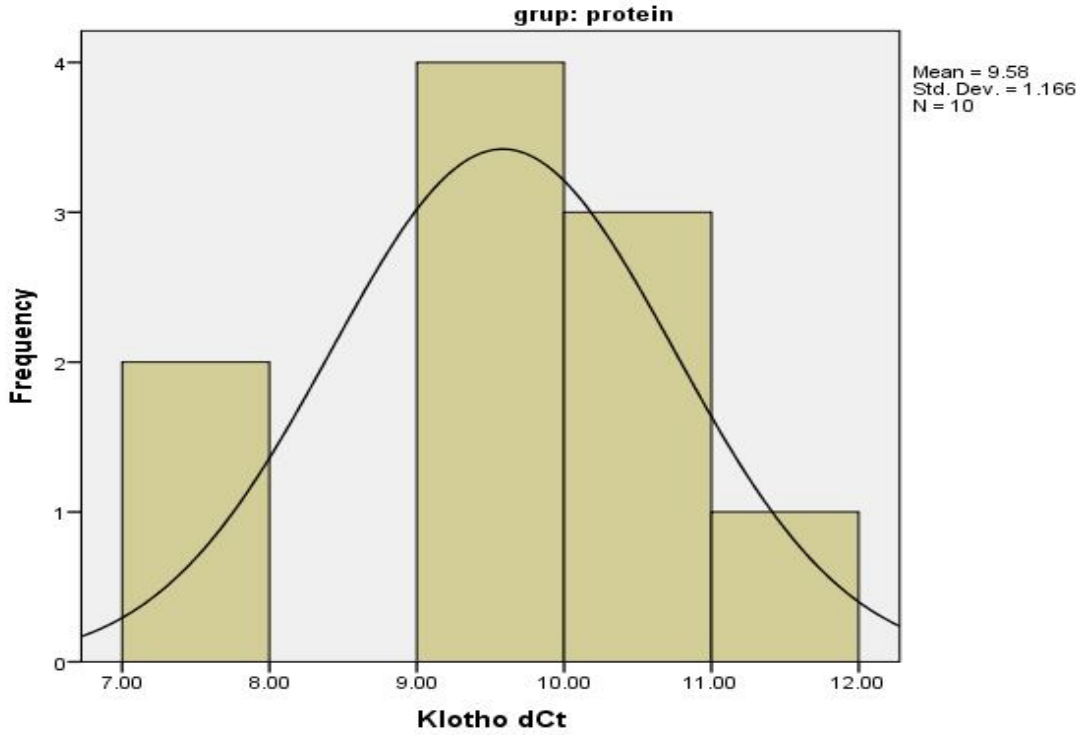
Şekil 4.5. Karbonhidrat beslenenlerde vakalardaki % metilasyon dağılımı.



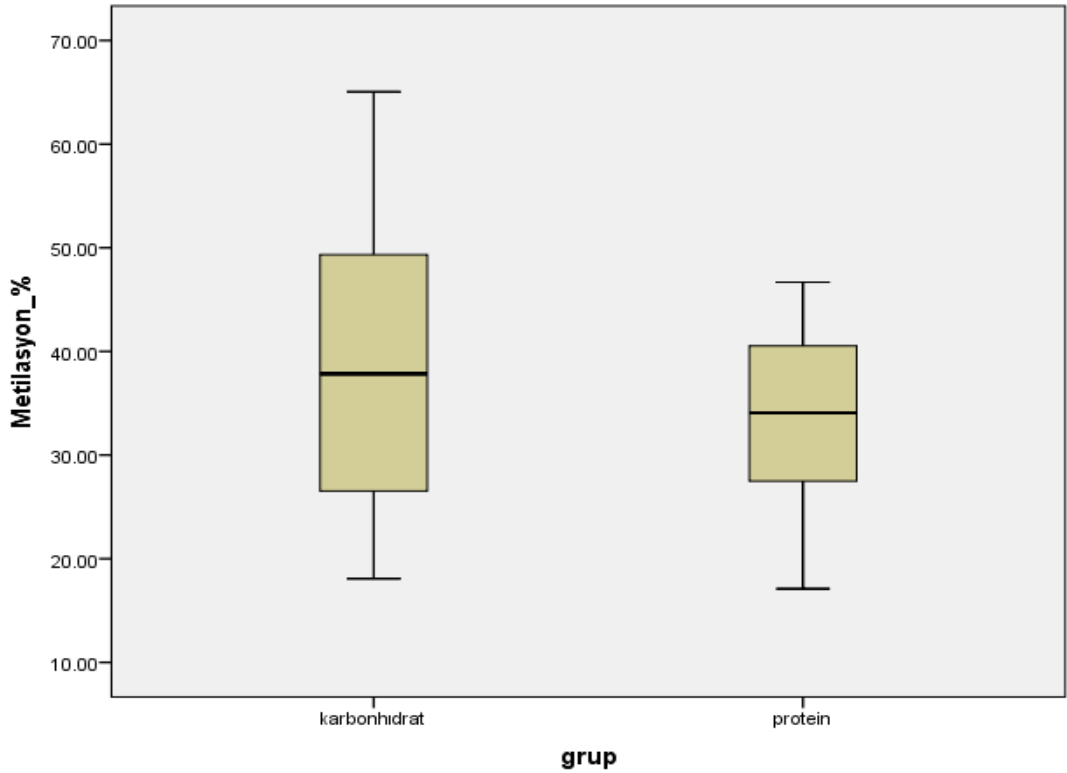
Şekil 4.6. Protein beslenenlerde vakalardaki % metilasyon dağılımı.



Şekil 4.7. Karbonhidrat beslenenlerde Klotho ΔC_t dağılımı.



Şekil 4.8. Protein beslenenlerde Klotho ΔC_t dağılımı.



Şekil 4.9. Karbonhidrat ve Protein grubunun metilasyon % değerleri grafiği. Gruplar arasında fark $P=0.004$ bulundu.

Karbonhidrat grubunda;

Yağ % ile metilasyon % arasında çok kuvvetli anlamlı ve ters bir korelasyon saptandı ($r = -0.765$, $p = 0.05$).

Karbonhidrat % ile metilasyon arasında çok kuvvetli aynı yönlü korelasyon saptandı ($r = 0.778$, $p = 0.004$).

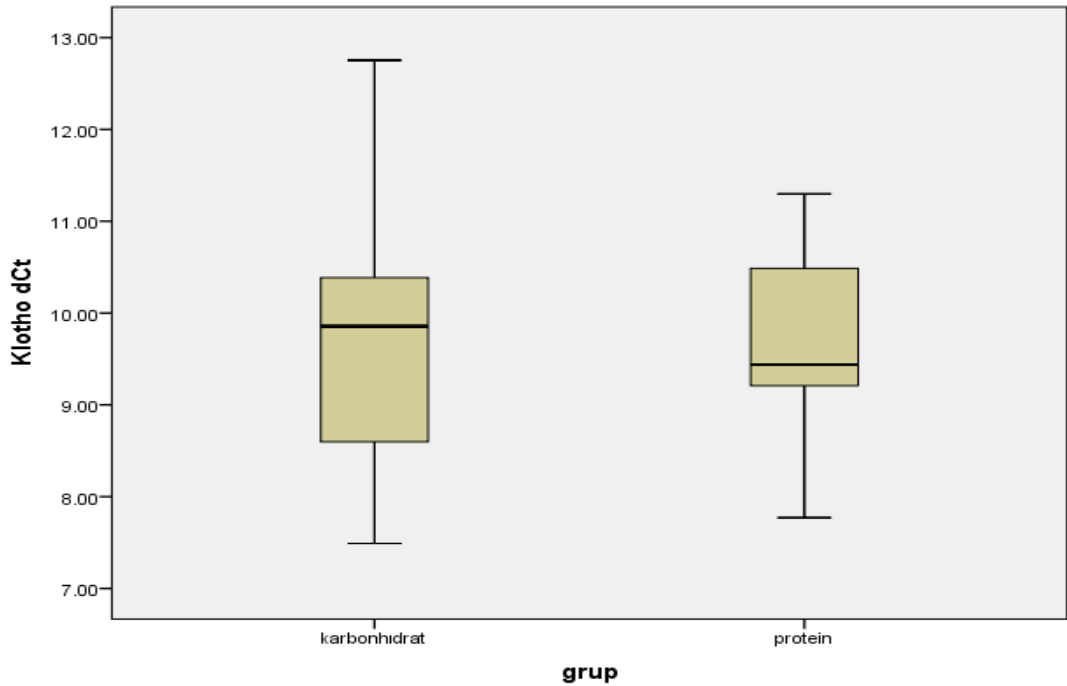
BMI ile metilasyon % arasında kuvvetli aynı yönlü anlamlı bir korelasyon saptandı ($r = 0.712$, $p = 0.01$).

Kolesterol % ile metilasyon % arasında kuvvetli ters yönlü anlamlı bir korelasyon saptandı ($r = -0.556$, $p = 0.04$).

Protein grubunda;

BMI ile metilasyon arasında kuvvetli anlamlı ters korelasyon vardır ($r = -0.635$, $p = 0.024$).

Klotho geni ΔC_t her iki grupta da anlamlı korelasyon yoktur.



Şekil 4.10. Karbohidrat ve Protein grubunun Klotho ΔC_t değerleri grafiği. Gruplar arasında fark $P > 0.05$ bulundu.

5. TARTIŞMA

Birçok çalışma sonucu, Klotho (KL) geninin memelilerde yaşlanma süreçlerinde ve yaşlanmayla ilgili hastalıklarda önemli bir fonksiyonu olduğu tespit edilmiştir. Klotho protein seviyesinin azalmasıyla yaşlılığa benzer fenotipler ortaya çıkmaktadır (Kuro-o ve ark. 1997). İlginç olanı ise, Klotho geninin az miktardaki dokularda sentezlenmesine karşın, Klotho geninin hasarları, tüm dokularda ve organlarda pekçok yaşlılığa benzer fenotiplerin görülmesini sağlamaktadır (Kuro-o ve ark 1997).

KL geni fazla eksprese edilmesi ile ömür uzunluğu yüzde yirmi ila otuz oranında yükselmektedir (Kurosu ve ark. 2005). Klotho proteininin çok miktarda sentezlenmesi, anlamlı olarak oksitativ strese direnç kazandırarak yaşlanma sürecini yavaşlatmakta ve ömrü uzatmaktadır (Kuro-o 2008).

Anormal DNA metilasyon yapıları, genomik kararsızlık ve artan mutasyon oranlarına bağlı olarak, özellikle kanser olmak üzere birçok hastalığın özellikleriyle ilişkilidir (Lengauer ve ark. 1997; Chen ve ark. 1998).

Rat beyininde ve kalbinde yapılan önemli çalışmalar ile, yaşlanma esnasında DNA metilasyonunda genel olarak bir düşüş olduğu gösterilmiş (Vanyushin ve ark. 1973) ve bu daha sonradan rat, fare ve ineklerden alınan farklı dokularda (Romanov ve Vanyushin 1981), kültürde yetiştirilen fare, hamster ve insan primer fibroblastlarında (Wilson ve Jones 1983), insan lenfositlerinde (Drinkwater ve ark. 1989) ve periferal kan hücrelerinde (Fuke ve ark. 2004; Bjornsson ve ark. 2008) de doğrulanmıştır. Çelişkili olarak, yaşlanma sırasında çeşitli spesifik lokuslar normal dokularda hipermetile hale gelmektedir (Fraga ve Esteller 2007). Bunun tersine, yeni doğanlardan yaşlılara kadar farklı yaş gruplarına ait bireylerden alınan T-lenfositlerini kullanan bir çalışma, artan yaşla birlikte lokusların %1'inin hipermetilasyonunu göstermiştir. Başka dokularda da bu lokusların DNA metilasyonunda kıyaslanabilen değişimler görülmüştür (Tra ve ark. 2002).

Benzer şekilde, insan serebral korteksinde DNA metilasyonundaki değişimleri inceleyen bir çalışmada, incelenen 50 lokusun 8'inde sitozin metilasyonunda belirgin bir artış olduğunu göstermiştir (Siegmond ve ark. 2007). Yaşlanma anında hipermetile olan spesifik gen örnekleri; östrojen reseptörü (ER)

(Issa ve ark. 1994), insülin benzeri büyüme faktörü-II (IGF-II) (Issa ve ark. 1996), p14^{ARF} (Shen ve ark. 2003), P16^{ink4a} (So ve ark. 2006), E-cadherin (Bornman ve ark. 2001), c-fos (Choi ve ark. 1996) ve kolajen $\alpha 1$ 'i (Takatsu ve ark. 1999) kapsamaktadır. İlginç bir şekilde, bu promoterlerin pek çoğu, tümörögenез esnasında hipermetile olmuşlardır ve bu durumun yaşla birlikte kansere yatkınlıkta olan artışta bir rolü olduğunu göstermektedir (Gonzalo 2010). Bu durum genomun global hipometilasyonu, spesifik gen promoterlerin artmış metilasyonu ile birlikte yaşlanma sürecine eşlik ettiğini göstermektedir (Esteller 2008; Calvanese ve ark. 2009). Yaşlanma sürecinde DNA metilasyon yapılarında meydana gelen bu değişikliklerin arkasındaki moleküler mekanizmalar belirsiz durmaktadır. DNA metiltransferazları (DNMTs) transkripsiyonel kontrolünün, yaşlı ve dönüştürülmüş insan fibroblastlarında değişikliğe uğradığı gözlemlenmiştir (Casillas ve ark. 2003). DNA metilasyonunda genel çapta düşüşün, yaşlanma esnasında heterokromatik alanlarda DNMT1 aktivitesinin etkinliği düzenli azalmadan kaynaklı olabileceği öne sürülmüştür (Casillas ve ark. 2003; Fraga ve Esteller 2007). Fakat bunun aksine, spesifik promoter CpG adacıklarının hipermetilasyonu, denovo DNMTs'lerin overekspresyonundan da kaynaklanmış olabilmektedir. DNMT3b'nin upregülasyonu, özellikle, kültür edilen fibroblastlarda gözlemlenmiştir (Casillas ve ark. 2003; Fraga ve Esteller 2007).

Fakat çeşitli çalışmalar (Ten Eleven Translokasyon) TET enzimlerinin; 5-metilsitozinin, 5-formil sitozone ve 5-karboksil sitozone dönüşümünü katalize ederek hem global hem de lokusa özgü DNA demetilasyonunda yer aldığını göstermektedir. Bu modifiye olmuş sitozinler, daha sonra timin-DNA glikosilaz tarafından başlatılan DNA baz eksizyon tamiri ile tamamen çıkarılmaktadır (He ve ark. 2011; Ito ve ark. 2011; Nabel ve Kohli 2011). Genom geneli DNA metilasyonu dinamikleri, DNMT1, DNMT3a ve DNMT3b gibi DNA metiltransferazları (DMNTs) tarafından regüle edilmektedir (Wilson ve ark. 1987; Singhal ve ark. 1987; Wilson ve Jones 1983). Eksizyon Tamir Mekanizmalarında DNA'daki hasarlı bazların bulunduğu oligonükleotid parçası çıkarılarak bu bölgelerin doğru bazlar ile doldurulması ve meydana gelen boşluğun ligasyonlarla kapatılması temel prensiptir (Sancar ve ark. 2004; Sancar ve Reardon 2004). Tamir basamakları tüm türlerde aynı olup, tamirde işlev gören proteinler ve sayıları türlere göre çeşitlilik göstermektedir (Huang ve ark. 1992; Sancar ve Rupp 1983; Öğrünç ve ark. 1998).

Bizim çalışmamızın analiz sonucunda ise; protein beslenen bireylerin Klotho geni metilasyon yüzdesinin, karbonhidrat beslenen bireylerin Klotho geni metilasyon yüzdesinden daha düşük olduğu tespit edilmiştir. İstatistiksel olarak anlamlı korelasyon bulunmuştur ve Şekil: 4.9 da grafik olarak belirtilmiştir. Bu durum bizi protein tüketim oranı arttıkça Klotho geni metilasyon düzeyinin azaldığı sonucuna ulaştırmaktadır.

Yaşla birlikte DNA metilasyonu değişikliğindeki artış, ilk olarak monozigotik ikizlerde fark edilmiştir (Fraga ve ark. 2005; Martin 2005; Poulsen ve ark. 2007; Kaminsky ve ark. 2009; Martino ve ark. 2011). Bu çalışmalar, aynı zamanda, DNA metilasyonunun ömür boyu devamlılıkta azalan bir tutarlılık gösterdiği ve bu yüzden DNA metilasyonunda genel bir azalmayla birlikte bireyler arası değişkenlikte bir artışa sebep olduğu fikrini desteklemiştir (Meaghan ve ark. 2015). Yeni doğan kanındaki DNA metilasyon seviyeleri, hayat boyunca gözlenen diğer çoğu bölgelerden daha azdır (Martino ve ark. 2011; Wang ve ark. 2012). Hem kan hem de bukkal epitelyal hücrelerde, monozigotik ikizler arasındaki DNA metilasyonunun yaşamın ilk senesinde daha değişken olduğu gösterilmiştir (Martino ve ark. 2011, 2013). Bu olgu, paylaşılan prenatal çevrenin, çocuklar arasında yüksek derecede epigenetik benzerlik sağladığını göstermektedir, oysaki postnatal çevrede izlenen değişiklikler doğumdan sonra epigenetik farklılık ile sonuçlanır (Martino ve ark. 2011).

Hollanda’da postpartum dönem beslenmenin bebeklerde daha sonra görülen rahatsızlıklara etkisi, 1944 yılında “Dutch Hunger Winter (Hollanda Açlık Kışı)” olarak bilinen kıtlık vakasında ortaya çıkmıştır. Görülen vakada anne adayları birinci trimesterde kıtlık sebebiyle besin bulamamış ve bu kıtlıktan yeni doğan çocukların kiloları etkilenmemiştir. Ancak yetişkinlik döneminde kıtlık görmeyenlere göre yüksek düzeyde şişmanlık ve kardiyovasküler hastalıkların görülme olasılıkları artmıştır. Halbuki kıtlığa maruz kalan ikinci ve üçüncü trimesterdaki anne adaylarının yeni doğan bebekleri kilo olarak zayıf dünyaya gelmişlerdir ve bu kişilerde insulin direnci ve yüksek tansiyon görülme olasılıkları da artmıştır (Painter ve ark. 2005). İnsulin direnci, yüksek tansiyon gibi riskler yalnızca annenin postpartum döneminde besin kıtlığı maruziyeti sonucu fenotipik değişimler olmayıp

aşırı beslenmeyle bağlantılı, metabolik rahatsızlıkların gelişme riskinde arttırmıştır (Sırıken ve ark. 2018).

Son yıllarda yapılan başka bir çalışmada ise, beslenme üzerine hayvanlar üzerinde araştırmalar gerçekleştirilmiştir. Gebeliklerinde yada erken postpartum döneminde enerji bakımından eşit kalori değerine sahip proteinden fakir beslenen, global beslenme kısıtlanması yada yağ oranı fazla beslenmeyle rat ve fare üzerinde araştırmalar gerçekleştirilmiştir. Ayrı beslenme alışkanlığına sahip annelerin yavruları şişmanlık, insülin direnci, yüksek tansiyon, yüksek serum kolesterol seviyeleri dahil kardiyometabolik rahatsızlıklarının farklı özellikleri görülmüştür. Örnek verecek olursak; gebeliklerinde proteinden fakir besin tüketen ratların bozulmuş glikoz metabolizması (Burns ve ark. 1997), dolaşım sistemi problemleri (Torrens ve ark. 2002; Sırıken ve ark. 2018), immun sistemi problemleri (Sırıken ve ark. 2018), serbest radikal (Langley-Evans ve Sculley 2005), yüksek yağ deposu ve nutrisyon kültüründe farklılıklar görüldü. Annelerin beslenme tarzı ile ömürlerinin ilk yıllarında fizyolojik değişimlere uğrayan çocukların fizyolojisindeki geri dönüşümü olmayan değişim, metabolik yolak aktivitelerindeki homeostazis denge sürecinde gen ekspresyonundaki uzun süreli değişiklikleri başlattığını ve bu yüzden ifade ettiğimiz istenmeyen değişimlerin meydana geldiği görülmektedir (Lilycrop ve Burdge 2012).

İleri çocukluk çağı ve adölesan dönemi boyunca DNA metilasyonundaki değişikliklerle ilgili az sayıda çalışma bulunmakla birlikte, yaşamın ilk birkaç yılı geniş oranda incelenmiştir. İnsan gelişiminin bu dönemini inceleyen çalışmalar, DNA metilasyon seviyelerinin hızla yükseldiğini ve daha sonrasında bu seviyenin, hem beyinde hem de kanda yetişkinliğe girmeye birlikte sabit konuma geldiğini göstermektedir (Alisch ve ark. 2012; Lister ve ark. 2013). Yetişkinlikten ileri yaşa doğru, kandaki genel DNA metilasyonu seviyeleri stabil kalmakta iken, bireyler arası değişkenlik bu zaman içinde artmaktadır (Talens ve ark. 2012; Weidner ve ark. 2014).

Yetişkinlik sonrası pek çok çalışmada, kan DNA metilasyonunda artan yaşla birlikte ciddi bir azalma tespit etmiştir (Bjornsson ve ark. 2004; Boks ve ark. 2009; Heyn ve ark. 2012; Horvath ve ark. 2012; Hannum ve ark. 2013; Johansson ve ark. 2013; Florath ve ark. 2014; Weidner ve ark. 2014). Yaşla birlikte DNA metilasyonu

kazanan bölgeler; CpG adaları açısından daha zengin durumdayken, CpG adacığı olmayan alanlar yaşla birlikte DNA metilasyonu kaybına uğramaya yatkındır (Rakyan ve ark. 2010; Heyn ve ark. 2012; Horvath ve ark. 2012; Florath ve ark. 2014; Weidner ve ark. 2014). Bu bulgular ilginç bir yapı sergilemektedir; promoter ilişkili CpG adacıkları gibi genel olarak düşük DNA metilasyonu gösteren bölgelerin, yaşla birlikte metilasyonu yükseltme eğilimi varken; İntergenik adacık içermeyen CpGs'ler gibi DNA metilasyonu yüksek bölgeler, yaşla birlikte metilasyon kaybı yaşamaya yatkındır. Çoğu CpGs'ler, CpG adacıkları dışında bulunduğu ve yüksek ölçüde metile oldukları için, bu durum, daha sonraki yaşam içinde genel bir DNA metilasyon kaybına ve bunun yanı sıra DNA metilasyon seviyelerinde yaşla birlikte bir kayma eğilimine neden olmaktadır (Saxonov ve ark. 2006; Weber ve ark. 2007; Illingworth ve Bird 2009; Hannum ve ark. 2013; Teschendorff ve ark. 2013; Weidner ve ark. 2014).

Genel olarak, birçok doku, hayatın erken evrelerinde ortalama DNA metilasyonundaki artış yapısıyla ve hayatın sonraki evrelerindeki aşamalı düşüşle uyumludur (Grönniger ve ark. 2010; Ong ve Holbrook 2014). Örneğin; çoğu çalışma, beyin bölgelerinin, hayatın erken evrelerinde DNA metilasyonunda hızlı değişimler göstererek ve sonrasında hayat boyunca gitgide yavaşladığını göstererek bu yapıyı takip ettiğini göstermektedir (Horvath ve ark. 2012; Numata ve ark. 2012; Lister ve ark. 2013).

DNA metilasyonunun dikkate değer bir özelliği de, dış faktörler tarafından modifiye edilebilir ve bazı durumlarda ortaya çıkan belirtiler hücre bölünmeleri yoluyla aktarılabilir. Kalıtsallık ve uyarılara karşı bu tepki dengesi, ömür boyunca biriken çevresel faktörlerin kalıcı izlerini taşıyan eşsiz bir mekanizma oluşması ile sonuçlanır (Cortessis ve ark. 2012; Feil ve Fraga 2012).

Yaptığımız çalışmada Klotho geni metilasyon düzeyi ile beslenme alışkanlığı arasındaki ilişkinin araştırılması kapsamında karbonhidrat beslenenler %33 ve daha fazlası, protein beslenenler %17 ve daha fazlası şeklinde oluşturulan örneklem grubumuzun analiz sonuçlarında: Karbonhidrat grubunda; diyetle yağ ve kolesterol yüzde miktarı arttıkça Klotho geni metilasyon düzeyi azalmıştır, karbonhidrat yüzde miktarı arttıkça Klotho geni metilasyon düzeyi artmıştır ve beden kitle indeksi (BMI) arttıkça Klotho geninde metilasyon düzeyi arttığı bilgisine ulaşılmıştır. Protein

grubunda ise; beden kitle indeksi arttıkça Klotho geninde metilasyon seviyesinin azaldığı bilgisine ulaşılmıştır.

Başka bir çalışmada ise; kalıcı bir iz bıraktığı gösterilen spesifik bir maruz kalma örneği olarak sigara dumanı, hem içenlerde hem de içen kişilerin çocuklarında AHRR lokusundaki DNA metilasyonunda değişikliklere sebep olmaktadır (Saxonov ve ark. 2006; Monick ve ark. 2012; Joubert ve ark. 2012; Shenker ve ark. 2013; Sun ve ark. 2013; Elliott ve ark. 2014; Shah ve ark. 2014; Lee ve ark. 2015). Sigara içmeyle ilişkili DNA metilasyon değişiklikleri, aynı zamanda, kalp hastalığı ve felç gibi yaşla ilgili hastalıklar riski taşımakta, önemli adaylar olan inflamatuvar ağlarda bulunan genlerde de tespit edilmiştir (Breitling ve ark. 2012; Dogan ve ark. 2014). Sigara kullananlarda akciğer kanserlerine neden olan benzo(a)piren guaninin neden olduğu DNA hasarı, polisiklik karsinojenler, hepatik kanserlerine sebep olduğu görülen asetilaminofluoren guaninin meydana getirdiği DNA hasarı, Nükleotid Eksizyon Onarım (NER) mekanizmasıyla tamir edilmektedir (de Baer ve Hoeijmakers 2000; Friedberg ve ark. 1995; Sancar 1996; Petit ve Sancar 1999; Sancar ve Reardon 2004). Eksizyon onarımı mekanizmalarının aynı zamanda oksitleyici ve alkilleştiren ajanlar ile oluşan küçük baz lezyonların onarımında, baz eksizyon tamir mekanizmasının yeterli olmadığı durumlarda da etkisinin bulunduğu saptanmıştır (Sancar 1996; Reardon ve ark. 1997; Petit ve Sancar 1999; Sancar ve Reardon 2004).

KL proteininin fonksiyonlarını tespit etmek maksadıyla pek çok araştırma yapılmıştır. Yapılan araştırmalar neticesinde, KL proteininin hücrelerde çok farklı görevlerde yer aldığı görülmüştür. Membran KL proteinleri, fibroblast büyüme faktörü reseptörleriyle tetramerik kompleks gerçekleştirir ve FGF-23 için koreseptör fonksiyonu bulunmaktadır (Kurosu ve ark. 2006; Urakawa ve ark.2006; Goetz ve ark. 2010). KL proteinleri, kalsiyum-fosfat regülasyonlarında işlevi olan hormonlarla (paratiroit hormon, fibroblast büyüme faktörü-23 ve 1,25 -(OH)₂ vitamin D₃) beraber vücut mineral homeostazisinde görev almaktadır (Hu ve ark. 2013). KL proteini noksanlığı kronik böbrek rahatsızlığı, kemik erimesi ve kardiovasküler komplikasyonlar şeklinde insan vücudunda hastalıklara neden olmaktadır (Ogata ve ark. 2002; Arking ve ark 2003; John ve ark. 2011).

Lee ve ark.(2010) yaptıkları araştırmada insanların Klotho geni upstreaminde CpG dizilerinin fazla olduğunu görmüşlerdir. Elde edilen bu sonuç Klotho (KL) gen anlatımı kontrollerinde epigenetiğin etkin olduğunu düşündürmektedir. Öte yandan, kanserleşmelerde DNA metilasyonu etkisini belirten araştırmalar bulunmaktadır (Enokida ve Nakagawa 2008; Chin ve ark. 2011; Catalano ve ark. 2012; Dubuc ve ark. 2012; Gigeek ve ark. 2012; Khare ve Verma 2012). Güncel araştırmalarda Klotho Geni'nin, IGF 1 yolunun inhibasyonu ile kanserleşmeye etki edebileceği görülmüştür (Wolf ve ark. 2008). Mide kanserli bireylerle gerçekleştirilen araştırmada, kanserli bireylerin yüzde kırkaltısında Klotho (KL) gen promoterlerinde metilasyon görüldürken, kansersiz bireylerde sağlıklı mide dokularında metilasyon görülmemiştir (Wang ve ark. 2011). Sonuç olarak mide kanserlerinde Klotho geni, inaktive olmuş yeni epigenetik tümör baskılayıcı gen olduğu bilgisine ulaşılmıştır (Çağlayan ve Turan 2014).

Gerçekleştirilen diğer araştırmalarda, mide mukozası ve kolondaki sağlıklı hücrelerde Klotho geni promoter metilasyonu normalden malingniteye dönüşümünde metilasyon miktarının yükseldiği bilgisi edinilmiştir (Lee ve ark. 2010; Pan ve ark. 2011; Wang ve ark. 2011; Rubinek ve ark. 2012). Sun ve ekibi (2012) üremik hastalarla gerçekleştirdikleri araştırmada, üremik toksidite birikimine bağlı DNA metiltransferaz (DNMT) enzimleri miktarının çoğaldığını ve Klotho geni CpG adalarındaki metilasyon miktarındaki yükselişle beraber Klotho protein sentezinin düştüğü bilinmektedir. Bu bilgiler ışığında tümör baskılayıcı genlerin DNA metiltransferaz (DNMT) enzimleriyle epigenetik anlatım seviyelerinin azaltılması veya inaktive olması kanserlerin gelişmesinde mühim bir rolü olduğu görülmektedir (Kulis ve Esteller 2010). Farklı kanser tipleriyle bağlantılı olduğu düşünölen ve noksanlığında yaşlanma benzeri değişikliklerin meydana gelme sebebi Klotho protein sentezlerinin regölasyonu bazı hastalıkları iyileştirebileceğini düşündürmektedir (Zhang ve ark. 2008; Moreno ve ark. 2011; King ve ark. 2012).

Çalışmamızda karbonhidrat beslenen bireyler ile protein beslenen bireylerin Klotho gen ekspresyon seviyesi karşılaştırıldığında her iki grupta anlamlı korelasyon bulunmamıştır ve gruplar arasındaki fark karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır (anlamlılık değer $p > 0.05$). Şekil: 4.10 'daki grafikte görüldüğü üzere; protein beslenen bireylerin Klotho gen ekspresyon seviyesi ile karbonhidrat beslenen bireylerin Klotho gen ekspresyon seviyesi

karşılaştırıldığında az miktarda bir artış görülmektedir fakat bu artış miktarı istatistiki olarak anlamlı bulunmamıştır. Bu sonucun farklı nedenlerden kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Ancak bu farkın azlığına rağmen, çalışmamızın analiz sonucunda; karbonhidrat beslenen bireylerin Klotho (KL) geni metilasyon yüzdesi protein beslenen bireylerin Klotho (KL) geni metilasyon yüzdesinden daha yüksek bulundu ve bu durum bizi karbonhidrat tüketimi arttıkça Klotho (KL) geni metilasyon düzeyinin arttığı sonucuna ulaştırdı. Beslenme alışkanlığı Klotho (KL) geni metilasyon seviyesini etkilemiştir bununla birlikte konunun aydınlatılabilmesi için kapsamlı araştırmaların yapılması gerektiği düşünülmektedir

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

İnsan metabolizmasının sistematik çalışması DNA' nın korunmasına bağlıdır. Yaptığımız çalışma sonucu karbonhidrat grubunda; diyetle yağ ve kolesterol yüzde miktarı arttıkça Klotho geni metilasyon düzeyi azalmıştır, beden kitle indeksi(BMI) arttıkça Klotho geni metilasyon düzeyi artmıştır ve diyetle karbonhidrat yüzde miktarı arttıkça Klotho geni metilasyon düzeyi arttığı bilgisine ulaşılmıştır. Protein grubunda ise; beden kitle indeksi (BMI) arttıkça Klotho geninde metilasyon düzeyinin azaldığı bilgisine ulaşılmıştır.

Protein beslenen bireylerin Klotho geni metilasyon yüzdesinin, karbonhidrat beslenen bireylerin, Klotho geni metilasyon yüzdesinden daha düşük olduğu tespit edilmiştir. İstatistiksel olarak anlamlı korelasyon bulunmuştur. Bu durum bizi protein tüketim oranı arttıkça Klotho geni metilasyon düzeyinin azaldığı sonucuna ulaştırmaktadır.

Çalışmamızda karbonhidrat beslenen bireyler ile protein beslenen bireylerin Klotho gen ekspresyon seviyesi karşılaştırıldığında her iki grupta anlamlı korelasyon bulunmamıştır ve gruplar arasındaki fark karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır. Protein beslenen bireylerin Klotho gen ekspresyon seviyesi ile karbonhidrat beslenen bireylerin Klotho gen ekspresyon seviyesi karşılaştırıldığında az miktarda bir artış görülmektedir fakat bu artış miktarı istatistiki olarak anlamlı bulunmamıştır, konunun aydınlatılabilmesi için kapsamlı araştırmaların yapılması gerektiği düşünülmektedir.

Yaşlanma sürecinin anlaşılmasında önemli bir role sahip olan metilasyon düzeyi, karbonhidrat beslenme ile metilasyon arasında çok kuvvetli aynı yönlü korelasyon saptanmıştır. Böylelikle karbonhidrat oranının beslenmede azaltılmasının sağlık ve uzun yaşamda önemli bir role sahip olduğunu düşünmekteyiz.

Bireylere yeterli ve dengeli beslenme alışkanlığının kazandırılmasıyla kardiyovasküler rahatsızlıklar, şeker hastalığı, kanser ve obezite başta olmak üzere, epigenetik değişim sonucu gelişen hastalıkların görülme sıklığının düşürülebileceği, yaşlanmaya neden olan epigenetik değişimlerin giderilebileceği kanaatindeyiz.

7. KAYNAKLAR

- Adams ER, Nolan VG, Andersen SL, et al. Centenarian Offspring: start healthier. *J AM Geriatr Soc* 2008; 56:2089-2092.
- Agherbi H, Gaussmann-Wenger A, Verthuy C, Chasson L, Serrano M, Djabali M. Polycomb mediated epigenetic silencing and replication timing at the INK4a/ARF locus during senescence. *PLoS One* 4: e5622, 2009.
- Agrelo R, Cheng WH, Setien F, et al. Epigenetic inactivation of the premature aging Werner syndrome gene in human cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103:8822-8827.
- Akbarian S, Beeri MS, Haroutunian V. Epigenetic determinants of healthy and diseased brain aging and cognition. *JAMA Neurol.* 2013 Jun;70:711-8.
- Alcedo J., Kenyon, C. Regulation of *C. elegans* Longevity by Specific Gustatory and Olfactory Neurons, *Neuron*, 41 (2004); 45-55.
- Alisch RS, Barwick BG, Chopra P, Myrick LK, Satten GA, Conneely KN, Warren ST (2012) Age- associated DNA methylation in pediatric populations. *Genome Res.* 22, 623–632.
- Alpatov WW and Pearl R. Experimental studies on the duration of life. XII. Influence of temperature during the larval period of adult life of *Drosophila melanogaster*. *Am Nat* 1929; 63:37-67.
- Alves G, Tatro A, Fanning T (1996) Differential methylation of human LINE-1 retrotransposons in malignant cells. *Gene* 176, 39–44.
- Anstee QM, Goldin RD. Mouse models in non-alcoholic fatty liver disease and steatohepatitis research. *Int. J. Exp. Pathol.* 2006; 87:1–16. [PubMed: 16436109]
- Aravin AA, Sachidanandam R, Girard A, Fejes-Toth K, Hannon GJ. Developmentally regulated piRNA clusters implicate MILI in transposon control. *Science* 316: 744–747, 2007.
- Arking DE, Becker DM, Yanek LR, Fallin D, Judge DP, Moy TF, Becker LC, Dietz HC. KLOTHO allele status and the risk of early-onset occult coronary artery disease. *Am J Hum Genet.* 2003;72:1154-1161.
- Arking DE, Krebsova A, Macek M, Macek, M, Arking A, Mian IS, Fried L, Hamosh A, Dey S, McIntosh I, Dietz HC. Association of human aging with a functional variant of klotho. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99:856-861.
- Arking, D. E, Becker D. M, Yanek L. R, Fallin D, Judge D. P, Moy T. F, Becker L. C, and Dietz H. C. (2003) KLOTHO allele status and the risk of early-onset occult coronary artery disease. *Am J Hum Genet.*;72:1154-1161.
- Atlı, K., Bozcuk, A.N. Telomer ve Hücresel Yaşlanma, *Geriatrics*, 5(2002); 111-114.
- Aslan A; Can Mİ, 2014 Yaşlanmanın moleküler temelleri. *Erciyes üniversitesi fen bilimleri enstitüsü dergisi*, 30(2):107-112
- Badman MK, et al. Hepatic fibroblast growth factor 21 is regulated by PPAR- α and is a key mediator of hepatic lipid metabolism in ketotic states. *Cell. Metab.* 2007; 5:426–347. [PubMed: 17550778]
- Bagul PK, Banerjee SK. Insulin Resistance, Oxidative Stress And Cardiovascular Complications: Role Of Sirtuins. *Curr Pharm Des*, 2013, 19:5663–5677.

- Ballestar E, Esteller M. Methyl-CpG-binding proteins in cancer: blaming the DNA methylation messenger. *Biochem Cell Biol* 83: 374–384, 2005.
- Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* 136: 215–233, 2009.
- Bayram A, İğci M, Sirtuin genleri ve işlevleri. Gaziantep üniversitesi tıp fakültesi firat tıp dergisi, firat med J 2013; 18(3): 136-140
- Becker, L. C., and Dietz, H. C. (2003) KLOTHO allele status and the risk of earlyonset occult coronary artery disease, *Am J Hum Genet* 72, 1154-1161.
- Benetti R, Gonzalo S, Jaco I, Schotta G, Klatt P, Jenuwein T, Blasco MA. Suv4–20h deficiency results in telomere elongation and derepression of telomere recombination. *J Cell Biol* 178: 925– 936, 2007.
- Berdasco M, Esteller M, Hot topics in epigenetic mechanism of aging: 2011. *Aging Cell* (2012) 11, pp 181-186
- Berger J, Moller DE. The mechanism of action of PPARs. *Annu. Rev. Med.* 2002; 53:409–435. [PubMed: 11818483]
- Berger SL. The complex language of chromatin regulation during transcription. *Nature* 447: 407–412, 2007.
- Berndt T, Kumar R. Novel mechanisms in the regulation of phosphorus homeostasis. *Physiology (Bethesda)*. 2009; 24:17–25. [PubMed: 19196648]
- Bird A (2007) Perceptions of epigenetics. *Nature* 447, 396–398.
- Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev* 16: 6–21, 2002.
- Birney E, et. al. Identification and analysis of functional elements in 1% of the human genome by the ENCODE pilot project. *Nature* 447: 799–816, 2007.
- Bishop, N. A., Guarente, L. Genetic Links Between Diet And Lifespan: Shared Mechanism From Yeast to Humans, *Nature*, 8 (2007); 835-844.
- Bjornsson HT, Fallin MD, Feinberg AP (2004) An integrated epigenetic and genetic approach to common human disease. *Trends Genet.* 20, 350–358.
- Bjornsson HT, Sigurdsson MI, Fallin MD, Irizarry RA, Aspelund T, Cui H, Yu W, Rongione MA, Ekstrom TJ, Harris TB, Launer LJ, Eiriksdottir G, Leppert MF, Sapienza C, Gudnason V, Feinberg AP. Intra-individual change over time in DNA methylation with familial clustering. *JAMA* 299: 2877–2883, 2008.
- Blackburn EH. Telomerases. *Annu. Rev. Biochem* 1992; 61:113-29.
- Bocklandt S, Lin W, Sehl ME, Sanchez FJ, Sinsheimer JS, Horvath S, Vilain E (2011) Epigenetic predictor of age. *PLoS ONE* 6, e14821.
- Boehm M, Slack F. A developmental timing microRNA and its target regulate life span in *C. elegans*. *Science* 310: 1954–1957, 2005.
- Bohannon NJ. Large phosphate shifts with treatment for hyperglycemia. *Arch. Intern. Med.* 1989; 149:1423–1425. [PubMed: 2730261]
- Boks MP, Derks EM, Weisenberger DJ, Strengman E, Janson E, Sommer IE, Kahn RS, Ophoff RA (2009) The relationship of DNA methylation with age, gender and genotype in twins and healthy controls. *PLoS ONE* 4, e6767.

- Bond DM, Finnegan EJ. Passing the message on: inheritance of epigenetic traits. *Trends Plant Sci* 2007; 12(5):211-216.
- Bornman DM, Mathew S, Alsrue J, Herman JG, Gabrielson E. Methylation of the E-cadherin gene in bladder neoplasia and in normal urothelial epithelium from elderly individuals. *Am J Pathol* 159: 831–835, 2001.
- Breitling LP, Salzmann K, Rothenbacher D, Burwinkel B, Brenner H (2012) Smoking, F2RL3 methylation, and prognosis in stable coronary heart disease. *Eur. Heart J.* 33, 2841–2848.
- Brian C.-S Liu, Kevin R. Loughlin. Telomerase in human bladder cancer. *Urologic Clinics of North America* 2000; 27(1):115-23.
- Brown WT. Progeria: a human-disease model of accelerated aging. *Am J Clin Nutr* 1992; 55 (6 Suppl): 1222-1224.
- Burns CM, Chu H, Rueter SM, Hutchinson LK, Canton H, Sanders-Bush E, Emeson RB, 1997: Regulation of serotonin-2C receptor G-protein coupling by RNA editing. *Nature*, 387(6630), 303-8.
- Butcher SE, Brow DA. Towards understanding the catalytic core structure of the spliceosome. *Biochem Soc Trans.* 2005; 33:447-449
- Byun H-M, Siegmund KD, Pan F, Weisenberger DJ, Kanel G, Laird PW, Yang AS (2009) Epigenetic profiling of somatic tissues from human autopsy specimens identifies tissue- and individual- specific DNA methylation patterns. *Hum. Mol. Genet.* 18, 4808–4817.
- Callinan PA, Feinberg AP. The emerging science of epigenomics. *Hum Mol Genet* 15, Spec No 1: R95–R101, 2006.
- Calvanese V, Lara E, Kahn A, Fraga MF. The role of epigenetics in aging and age-related diseases. *Ageing Res Rev* 8: 268–276, 2009.
- Casillas MA Jr, Lopatina N, Andrews LG, Tollefsbol TO. Transcriptional control of the DNA methyltransferases is altered in aging and neoplastically-transformed human fibroblasts. *Mol Cell Biochem* 252: 33–43, 2003.
- Catalano MG, Fortunati N, Boccuzzi G. Epigenetics modifications and therapeutic prospects in human thyroid cancer. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2012; 3: 40.
- Cawthon, R.M., Smith, K.R., O'Brien, E., Sivatchenko, A., Kerber, R.A. Association Between Telomere Length in Blood and Mortality in People Aged 60 Years or Older, *Research Letters*, 361 (2003); 393-395.
- Chen CD, Podvin S, Gillespie E, Leeman SE, Abraham CR. Insulin stimulates the cleavage and release of the extracellular domain of Klotho by ADAM10 and ADAM17. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104:19796-19801.
- Chen RZ, Pettersson U, Beard C, Jackson-Grusby L, Jaenisch R. DNA hypomethylation leads to elevated mutation rates. *Nature* 395: 89–93, 1998.
- Chen YR, Lai YL, Lin SD, Li XT, Fu YC, Xu WC. Sirt1 Interacts With Metabolic Transcriptional Factors In The Pancreas Of Insulin-Resistant And Calorie-Restricted Rats. *Mol Biol Rep*, 2013, 40:3373–3380.
- Cheng CY, Kuro-o M, Razzaque MS. Molecular regulation of phosphate metabolism by fibroblast growth factor-23–Klotho system. *Adv. Chronic Kidney Dis.* 2011; 18:91–97. [PubMed: 21406293]

- Chihara Y, et al. Klotho protein promotes adipocyte differentiation. *Endocrinology*. 2006; 147:3835–3842. [PubMed: 16709611]
- Chin SP, Dickinson JL, Holloway AF. Epigenetic regulation of prostate cancer. *Clin Epigenetics*. 2011;2:151-169.
- Choi EK, Uyeno S, Nishida N, Okumoto T, Fujimura S, Aoki Y, Nata M, Sagisaka K, Fukuda Y, Nakao K, Yoshimoto T, Kim YS, Ono T. Alterations of c-fos gene methylation in the processes of aging and tumorigenesis in human liver. *Mutat Res* 354: 123–128, 1996.
- Conti B. Considerations on temperature, longevity and aging. *Cell Moll Life Sci* 2008; 65:1626-1630.
- Cortessis VK, Thomas DC, Levine AJ, Breton CV, Mack TM, Siegmund KD, Haile RW, Laird PW (2012) Environmental epigenetics: prospects for studying epigenetic mediation of exposure-response relationships. *Hum. Genet.* 131, 1565–1589.
- Crosby ME, Kulshreshtha R, Ivan M, Glazer PM. MicroRNA regulation of DNA repair gene expression in hypoxic stress. *Cancer Res* 69: 1221–1229, 2009.
- Cummings MR. ve Klug, WS. *Genetik*, 6. baskı, Palme Yayın, Ankara, 816. 2002.
- Çağlayan E, Turan K, Klotho geni, yaşlanma ve DNA metilasyonu. *Marmara üniversitesi sağlık bilimleri enstitüsü dergisi*, C.4, S.3, 2014
- Çağlayan E, Biyokimya Anabilim Dalı, DNA Metil Transferanz Enzimlerinin yaşlanma ile ilgili insan Klotho geni anlatımı üzerine etkilerinin araştırılması, T.C. Marmara üniversitesi sağlık bilimleri enstitüsü, 2014
- Davies MN, Volta M, Pidsley R, Lunnon K, Dixit A, Lovestone S, Coarfa C, Harris RA, Milosavljevic A, Troakes C, Al-Sarraj S, Dobson R, Schalkwyk LC, Mill J (2012) Functional annotation of the human brain methylome identifies tissue-specific epigenetic variation across brain and blood. *Genome Biol.* 13, R43.
- de Baer J, Hoeijmakers JHJ. [2000]Nucleotide excision repair and human syndromes. *Carcinogenesis*. 21 [3]: 453-460.
- Dhalluin C, Carlson JE, Zeng L, He C, Aggarwal AK, Zhou MM. Structure and ligand of a histone acetyltransferase bromodomain. *Nature* 399: 491–496, 1999.
- Dillon N, Festenstein R. Unravelling heterochromatin: competition between positive and negative factors regulates accessibility. *Trends Genet* 18: 252–258, 2002.
- Dogan MV, Shields B, Cutrona C, Gao L, Gibbons FX, Simons R, Monick M, Brody GH, Tan K, Beach SRH, Philibert RA (2014) The effect of smoking on DNA methylation of peripheral blood mononuclear cells from African American women. *BMC Genom.* 15, 151.
- Dong E1, Chen Y, Gavin DP, Grayson DR, Guidotti A. Valproate induces DNA demethylation in nuclear extracts from adult mouse brain. *Epigenetics*. 2010 Nov- Dec;5:730-5.
- Drinkwater RD, Blake TJ, Morley AA, Turner DR (1989) Human lymphocytes aged in vivo have reduced levels of methylation in transcriptionally active and inactive DNA. *Mutat. Res.* 219, 29–37.
- Dubuc AM, Mack S, Unterberger A, Northcott PA, Taylor MD. The epigenetics of brain tumors. *Methods Mol Biol.* 2012;863:139-153.
- Elliott HR, Tillin T, McArdle WL, Ho K, Duggirala A, Frayling TM, Davey Smith G, Hughes AD, Chaturvedi N, Relton CL (2014) Differences in smoking associated DNA methylation patterns in South Asians and Europeans. *Clin. Epigenetics* 6, 4.

- Enokida H, Nakagawa M. Epigenetics in bladder cancer. *Int J Clin Oncol*. 2008;13:298-307.
- Esteller M. Epigenetics in cancer. *N Engl J Med* 358: 1148–1159, 2008.
- Erbaş, F, Akın A. (2008). “*Yaşlılık, Sağlık ve Kadın*,” Sağlık ve Toplum Dergisi Yıl: 18, Sayı: 3-4.
- Fabbri M, Garzon R, Cimmino A, Liu Z, Zanesi N, Callegari E, Liu S, Alder H, Costinean S, Fernandez-Cymering C, Volinia S, Guler G, Morrison CD, Chan KK, Marcucci G, Calin GA, Huebner K, Croce CM. MicroRNA-29 family reverts aberrant methylation in lung cancer by targeting DNA methyltransferases 3A and 3B. *Proc Natl. Acad Sci USA* 104: 15805-15810, 2007.
- Feil R, Fraga MF (2012) Epigenetics and the environment: emerging patterns and implications. *Nat. Rev. Genet.* 13, 97–109.
- Feng J, Zhou Y, Campbell SL, Le T, Li E, Sweatt JD, Silva AJ, Fan G. Dnmt1 and Dnmt3a maintain DNA methylation and regulate synaptic function in adult forebrain neurons. *Nat Neurosci*. 2010 Apr;13:423-30.
- Fischer A, Sananbenesi F, Mungenast A, Tsai LH. Targeting the correct HDAC(s) to treat cognitive disorders. *Trends Pharmacol Sci*. 2010 Dec;31:605-17.
- Fleming JE, Miquel J, Cottrell SF, Yengoyan LS, Economos AC. Is cell aging caused by respiration-dependent injury to the mitochondrial genome? *Gerontology* 1982;28:44-53.
- Florath I, Butterbach K, Müller H, Bewerunge-Hudler M, Brenner H (2014) Cross-sectional and longitudinal changes in DNA methylation with age: an epigenome-wide analysis revealing over 60 novel age-associated CpG sites. *Hum. Mol. Genet.* 23, 1186–1201.
- Ford J, Ahmed S, Allison S, Jiang M, Milner J. JNK2-dependent regulation of SIRT1 protein. Gerhart-Hines Z, Rodgers JT, Bare O, Lerin C, Kim SH, Mostoslavsky R, Alt FW, Wu Z, Puigserver P. Metabolic control of muscle mitochondrial function and fatty acid oxidation through SIRT1/PGC-1 α . *EMBO J* 2007; 26(7):1913-1923.
- Forster RE, et al. Vitamin D receptor controls expression of the anti-aging Klotho gene in Mouse and human renal cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2011; 414:557–562. [PubMed: 21982773]
- Fraga MF, Ballestar E, Paz MF, Ropero S, Setien F, Ballestar ML, Heine-Suner D, Cigudosa JC, Urioste M, Benitez J, Boix-Chornet M, Sanchez-Aguilera A, Ling C, Carlsson E, Poulsen P, Vaaga A, Stephan Z, Spector TD, Wu YZ, Plass C, Esteller M (2005) Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 102, 10604–10609.
- Fraga MF, Ballestar E, Villar-Garea A, Boix-Chornet M, Espada J, Schotta G, Bonaldi T, Haydon C, Ropero S, Petrie K, Iyer NG, Perez-Rosado A, Calvo E, Lopez JA, Cano A, Calasanz MJ, Colomer D, Piris MA, Ahn N, Imhof A, Caldas C, Jenuwein T, Esteller M. Loss of acetylation at Lys16 and trimethylation at Lys20 of histone H4 is a common hallmark of human cancer. *Nat Genet* 37: 391–400, 2005.
- Fraga MF, Esteller M. Epigenetics and aging: the targets and the marks. *Trends Genet* 23: 413–418, 2007.
- Francis GA, et al. Peroxisomal proliferator activated receptor- γ deficiency in a Canadian kindred with familial partial lipodystrophy type 3 (FPLD3). *BMC Med. Genet.* 2006; 7:3. [PubMed: 16412238]
- Friedberg EC, Walker GC, Siede W. [1995]DNA Repair and Mutagenesis. s: 24-25, ASM press, Washington DC.
- Friedman JM, Liang G, Liu CC, Wolff EM, Tsai YC, Ye W, Zhou X, Jones PA. The putative tumor suppressor microRNA-101 modulates the cancer epigenome by repressing the polycomb group protein EZH2. *Cancer Res* 69: 2623–2629, 2009.

- Friedman RC, Farh KK, Burge CB, Bartel DP. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res* 19: 92–105, 2009.
- Fuke C, Shimabukuro M, Petronis A, Sugimoto J, Oda T, Miura K, Miyazaki T, Ogura C, Okazaki Y, Jinno Y (2004) Age related changes in 5-methylcytosine content in human peripheral leukocytes and placentas: an HPLC-based study. *Ann. Hum. Genet.* 68, 196–204.
- Garg A. Acquired and inherited lipodystrophies. *N. Engl. J. Med.* 2004; 350:1220–1234. [PubMed: 15028826]
- Gentilini D, Mari D, Castaldi D, Remondini D, Ogliari G, Ostan R, Bucci L, Sirchia SM, Tabano S, Cavagnini F, Monti D, Franceschi C, Di Blasio AM, Vitale G (2013) Role of epigenetics in human aging and longevity: genome-wide DNA methylation profile in centenarians and centenarians' offspring. *Age* 35, 1961–1973.
- Gigek CO, Chen ES, Calcagno DQ, Wisnieski F, Burbano RR, Smith MA. Epigenetic mechanisms in gastric cancer. *Epigenomics.* 2012;4:279- 294.
- Gilbert N, Boyle S, Fiegler H, Woodfine K, Carter NP, Bickmore WA. Chromatin architecture of the human genome: gene-rich domains are enriched in open chromatin fibers. *Cell* 118: 555–566, 2004.
- Goetz R, et al. Isolated C-terminal tail of FGF23 alleviates hypophosphatemia by inhibiting FGF23-FGFR-Klotho complex formation. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2010; 107:407–412. [PubMed: 19966287]
- Goetz R, et al. Molecular insights into the Klotho-dependent, endocrine mode of action of fibroblast growth factor 19 subfamily members. *Mol. Cell Biol.* 2007; 27:3417–3428. [PubMed: 17339340]
- Goetz, R., Nakada, Y., Hu, M. C., Kurosu, H., Wang, L., Nakatani, T., Shi, M., Eliseenkova, A. V., Razzaque, M. S., Moe, O. W., Kuro-o, M., and Mohammadi, M. (2010) Isolated C-terminal tail of FGF23 alleviates hypophosphatemia by inhibiting FGF23-FGFR-Klotho complex formation, *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 407-412.
- Gonzalo S, Blasco MA. Role of Rb family in the epigenetic definition of chromatin. *Cell Cycle* 4: 752–755, 2005.
- Gonzalo S, Garcia-Cao M, Fraga MF, Schotta G, Peters AH, Cotter SE, Eguia R, Dean DC, Esteller M, Jenuwein T, Blasco MA. Role of the RB1 family in stabilizing histone methylation at constitutive heterochromatin. *Nat Cell Biol* 7: 420–428, 2005.
- Gonzalo S, Highlighter Topic / Epigenetic in health and disease, epigenetic alterations in aging. *J Appl Physiol* 109: 586-597, 2010 [PubMed: 20448029]
- Gorham H, Yoshida K, Sugino T, et al. Telomerase activity in human gynaecological malignancies. *J Clin. Pathol.* 1997; 50:501-4.
- Greider CW. Telomere length regulation. *Annu Rev Biochem* 1996; 65:337-65.
- Greonniger E, Weber B, Heil O, Peters N, Stfab F, Wenck H, Korn B, Winnefeld M, Lyko F (2010) Aging and chronic sun exposure cause distinct epigenetic changes in human skin. *PLoS Genet.* 6, e1000971.
- Grewal SI, Jia S. Heterochromatin revisited. *Nat Rev Genet* 8: 35–46, 2007.
- Grillari J, Grillari-Voglauer R. Novel modulators of senescence, aging, and longevity: small non-coding RNAs enter the stage. *Exp Gerontol* 45F: 302–311, 2010.

- Grönniger E, Weber B, Heil O, Peters N, Staib F, Wenck H, Korn B, Winnefeld M, Lyko F (2010) Aging and chronic sun exposure cause distinct epigenetic changes in human skin. *PLoS Genet.* 6, e1000971.
- Grunstein M. Histone acetylation in chromatin structure and transcription. *Nature* 389: 349–352, 1997.
- Guarente, L., Kenyon, C., 2000. Genetic Pathways That Regulate Ageing in Model Organisms, *Nature.* 408 (2000); 255-262.
- Gupta S, Kim SY, Artis S, Molfese DL, Schumacher A, Sweatt JD, Paylor RE, Lubin FD. Histone methylation regulates memory formation. *J Neurosci.* 2010 Mar 10;30(10):3589-99.
- Gutierrez Arcelus M, Lappalainen T, Montgomery SB, Buil A, Ongen H, Yurovsky A, Bryois J, Giger T, Romano L, Planchon A, Falconnet E, Bielser D, Gagnebin M, Padiotau I, Borel C, Letourneau A, Makrythanasis P, Guipponi M, Gehrig C, Antonarakis SE, Dermitzakis ET (2013) Passive and active DNA methylation and the interplay with genetic variation in gene regulation. *Elife* 2, e00523.
- Güler, Ç, Akın L. (2006). “*Halk Sağlığı Hakkında Temel Bilgiler*” Hacettepe Üniversitesi Yayınları, s. 1020-1031.
- Haggarty SJ and Tsai LH. Probing the role of HDACs and mechanisms of chromatin-mediated neuroplasticity. *Neurobiol Learn Mem* 96: 41-52.
- Haigis MC, Mostoslavsky R, Haigis KM, Fahie K, Christodoulou DC, Murphy AJ, Valenzuela DM, Yancoğoulos GD, Karow M, Blander G, Wolbrger C, Prolla TA, Weindruch R, Alt FW, Guarente L. SIRT4 Inhibits Glutamate Dehydrogenase And Opposes The Effects Of Calorie Restriction In Pancreatic Beta Cells. *Cell*, 2006, 126(5):941-954.
- Hall JE, et al. Obesity-associated hypertension and kidney disease. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 2003; 12:195–200. [PubMed: 12589181]
- Haluzik M, et al. Genetic background (C57BL/6J versus FVB/N) strongly influences the severity of diabetes and insulin resistance in ob/ob mice. *Endocrinology.* 2004; 145:3258–3264. [PubMed: 15059949]
- Hannum G, Guinney J, Zhao L, Zhang L, Hughes G, Sada S, Klotzle B, Bibikova M, Fan J-B, Gao Y, Deconde R, Chen M, Rajapakse I, Friend S, Ideker T, Zhang K(2013) Genome-wide Methylation Profiles Reveal Quantitative Views of Human Aging Rates. *Mol. Cell* 49, 359–367.
- Harman D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol* 1956;11:298-300.
- Hassan AH, Prochasson P, Neely KE, Galasinski SC, Chandy M, Carrozza MJ, Workman JL. Function and selectivity of bromodomains in anchoring chromatin-modifying complexes to promoter nucleosomes. *Cell* 111: 369–379, 2002.
- He L, Hannon GJ. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat Rev Genet* 5: 522– 531, 2004.
- He L, He X, Lowe SW, Hannon GJ. microRNAs join the p53 network– another piece in the tumour- suppression puzzle. *Nat Rev Cancer* 7: 819–822, 2007.
- He XJ, Chen T, Zhu JK. Regulation and function of DNA methylation in plants and animals. *Cell Res.* 2011 Mar;21:442-65.
- He YF, Li BZ, Li Z, Liu P, Wang Y, Tang Q, Ding J, Jia Y, Chen Z, Li L, Sun Y, Li X, Dai Q, Song CX, Zhang K, He C, Xu GL. Tet-mediated formation of 5-carboxylecytosine and its excision by TDG in mammalian DNA. *Science.* 2011 Sep 2;333:1303-7.

- Hegele RA, Cao H, Frankowski C, Mathews ST, Leff T. PPAR γ F388L, a transactivation-deficient mutant, in familial partial lipodystrophy. *Diabetes*. 2002; 51:3586–3590. [PubMed: 12453919]
- Heilbronn LK, Ravussin E. Calorie restriction and aging: review of the literature and implications for studies in humans. *Am J Clin Nutr* 2003; 78:361-369.
- Hennekam RC. Hutchinson–Gilford progeria syndrome: review of the phenotype. *Am J Med Genet A* 2006; 140: 2603-2624.
- Herbstman JB, Wang S, Perera FP, Lederman SA, Vishnevetsky J, Rundle AG, Hoepner LA, Qu L, Tang D (2013) Predictors and consequences of global DNA methylation in cord blood and at three years. *PLoS ONE* 8, e72824.
- Hershko A, Ciechanover A. The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem* 1998; 67:425-479.
- Herskind AM, McGue M, Holm NV, Sorensen TI, Harvald B, Vaupel J W. The heritability of human longevity: a population-based study of 2872 Danish twin pairs born 1870-1900. *Hum Genet*. 1996;97:319-323.
- Heyn H, Li N, Ferreira HJ, Moran S, Pisano DG, Gomez A, Diez J, Sanchez-Mut JV, Setien F, Javier Carmona F, Puca AA, Sayols S, Pujana MA, Serra-Musach J, Iglesias-Platas I, Formiga F, Fernandez AF, Fraga MF, Heath SC, Valencia A, Gut IG, Wang J, Esteller M (2012) Distinct DNA methylomes of newborns and centenarians. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 109, 10522–10527.
- Holliday R. Epigenetics: a historical overview. *Epigenetics* 2006; 1(2):76-80.
- Holloszy JO and Smith EK. Longevity of coldexposed rats: a reevaluation of the “rate-of-living theory”. *J Appl Physiol* 1986; 61:1656-1660.
- Holt SE, Wright WE, Shay JW. Multiple pathways for the regulation of telomerase activity. *Eur J Cancer* 1997; 33(5):761-6.
- Horvath S (2013) DNA methylation age of human tissues and cell types. *GenomeBiol*. 14, R115.
Horvath S, Erhart W, Brosch M, Ammerpohl O, von Schönfels W, Ahrens M, Heits N, Bell JT, Tsai
- Horvath S, Zhang Y, Langfelder P, Kahn RS, Boks MP, van Eijk K, van den Berg LH, Ophoff RA (2012) Aging effects on DNA methylation modules in human brain and blood tissue. *Genome Biol*. 13, R97.
- Hovarth ve ark. 2014; Obesity accelerates epigenetic aging of human liver *proc. Natl. Acad Sci. USA* 111, 15538-15543
- Hristova M, Birse D, Hong Y, Ambros V. The *Caenorhabditis elegans* heterochronic regulator LIN-14 is a novel transcription factor that controls the developmental timing of transcription from the insulin/insulinlike growth factor gene *ins-33* by direct DNA binding. *Mol Cell Biol* 25: 11059– 11072, 2005.
- <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:1SZD.png>.
- <http://humanandscience1.blogspot.com.tr/2015/05/yaslanma-engellenebilir-mi.html>.
- <http://progeriafamilycircle.blogspot.com.tr/p/symptoms.html>.
- Hu MC, Kuro-o M, Moe OW. Klotho and kidney disease. *J. Nephrol*. 2010; 23(Suppl. 16):S136– S144. [PubMed: 21170871]

- Hu MC, Shi M, Zhang J, Pastor J, Nakatani T, Lanske B, Razzaque MS, Rosenblatt KP, Baum MG, Kuro-o M, Moe OW. Klotho: a novel phosphaturic substance acting as an autocrine enzyme in the renal proximal tubule. *FASEB J.* 2010;24:3438-3450.
- Hu, M. C., Kuro-o, M., and Moe, O. W. (2013) Renal and extrarenal actions of Klotho, *Semin Nephrol* 33, 118-129.
- Huang JC, Svobada DL, Reardon JT, Sancar A. [1992] Human nucleotide excision nuclease removes thymine dimers from DNA by incising the 22nd phosphodiester bond 5' and the 6th phosphodiester bond 3' to the photodimer. *Proc Natl Acad Sci USA.* 89: 3664-3668.
- Humpherys D, Eggan K, Akutsu H, Hochedlinger K, Rideout WM, Biniszkiwicz D, Yanagimachi R, Jaenisch R (2001) Epigenetic instability in ES cells and cloned mice. *Science* 293, 95–97.
- Illingworth RS, Bird AP (2009) CpG islands—'a rough guide'. *FEBS Lett.* 583, 1713–1720.
- Imura A, Iwano A, Tohyama O, Tsuji Y, Nozaki K, Hashimoto N, Fujimori T, Nabeshima Y. Secreted Klotho protein in sera and CSF: implication for post-translational cleavage in release of Klotho protein from cell membrane. *FEBS Lett.* 2004;565:143-147.
- Inagaki T, et al. Fibroblast growth factor 15 functions as an enterohepatic signal to regulate bile acid homeostasis. *Cell. Metab.* 2005; 2:217–225. [PubMed: 16213224]
- Issa JP, Ottaviano YL, Celano P, Hamilton SR, Davidson NE, Baylin SB. Methylation of the oestrogen receptor CpG island links ageing and neoplasia in human colon. *Nat Genet* 7: 536–540, 1994.
- Issa JP, Vertino PM, Boehm CD, Newsham IF, Baylin SB. Switch from monoallelic to biallelic human IGF2 promoter methylation during aging and carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:11757–11762, 1996.
- Ito S, et al. Molecular cloning and expression analyses of mouse β -Klotho, which encodes a novel Klotho family protein. *Mech. Dev.* 2000; 98:115–119. [PubMed: 11044614]
- Ito S, Fujimori T, Furuya A, Satoh J, Nabeshima Y. Impaired negative feedback suppression of bile acid synthesis in mice lacking β -Klotho. *J. Clin. Invest.* 2005; 115:2202–2208. [PubMed: 16075061]
- Ito S, Shen L, Dai Q, Wu SC, Collins LB, Swenberg JA, He C, Zhang Y. Tet proteins can convert 5-methylcytosine to 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine. *Science.* 2011 Sep 2;333:1300-3.
- Izbeki F, et al. Loss of Kitlow progenitors, reduced stem cell factor and high oxidative stress underlie gastric dysfunction in progeric mice. *J. Physiol.* 2010; 588:3101–3117. [PubMed: 20581042]
- İzmirli M, Epigenetik mekanizmalar ve kanser tedavisinde epigenetik yaklaşımlar. *Van tıp dergisi:* 20(1): 48-51, 2013
- Jacobson RH, Ladurner AG, King DS, Tjian R. Structure and function of a human TAFII250 double bromodomain module. *Science* 288: 1422–1425, 2000.
- Jenuwein T, Allis CD. Translating the histone code. *Science* 293: 1074–1080, 2001.
- Jiang R, Jones MJ, Chen E, Neumann SM, Fraser HB, Miller GE, Kobor MS (2015) Discordance of DNA methylation variance between two accessible human tissues. *Sci. Rep.* 5, 8257
- Jin C, Li J, Green CD, Yu X, Tang X, Han D, Xian B, Wang D, Huang X, Cao X, Yan Z, Hou L, Liu J, Shukeir N, Khaitovich P, Chen CD, Zhang H, Jenuwein T, Han JD (2011) Histone demethylase UTX-1 regulates *C. elegans* life span by targeting the insulin / IGF-1 signaling pathway. *Cell Metab.* 14, 161–172.

- Johansson A, Enroth S, Gyllenstein U (2013) Continuous Aging of the Human DNA Methylome Throughout the Human Lifespan. *PLoS ONE* 8, e67378.
- John, G. B., Cheng, C. Y., and Kuro-o, M. (2011) Role of Klotho in aging, phosphate metabolism, and CKD, *Am J Kidney Dis* 58, 127-134.
- Jones MJ, Goodman SJ, Kobor MS, DNA methylation and healthy human aging. *Aging Cell* (2015) 14, pp 924-932
- Jones PA (2012) Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nat. Rev. Genet.* 13, 484–492.
- Joubert BR, Hnaberg SE, Nilsen RM, Wang X, Vollset SE, Murphy SK, Huang Z, Hoyo C, Middtun Ø, Cupul-Uicab LA, Ueland PM, Wu MC, Nystad W, Bell DA, Peddada SD, London SJ (2012) 450K epigenome-wide scan identifies differential DNA methylation in newborns related to maternal smoking during pregnancy. *Environ. Health Perspect.* 120, 1425–1431.
- Kaas GA, Zhong C, Eason DE, Ross DL, Vachhani RV, Ming GL, King JR, Song H, Sweatt JD. TET1 controls CNS 5-methylcytosine hydroxylation, active DNA demethylation, gene transcription, and memory formation. *Neuron.* 2013 Sep 18;79:1086-93.
- Kamemori M, Ohyama Y, Kurabayashi M, Takahashi K, Nagai R, Furuya N. Expression of Klotho protein in the inner ear. *Hear Res.* 2002;171:103-110.
- Kaminsky ZA, Tang T, Wang S-C, Ptak C, Oh GHT, Wong AHC, Feldcamp LA, Virtanen C, Halfvarson J, Tysk C, McRae AF, Visscher PM, Montgomery GW, Gottesman II, Martin NG, Petronis A (2009) DNA methylation profiles in monozygotic and dizygotic twins. *Nat. Genet.* 41, 240–245.
- Karan MA, Tufan F, Yaşlanma mekanizmaları. *ege tıp dergisi / ege journal of medicine* 49(3), Ek/Supplement: 11-17, 2010
- Kawai m, Rosen CJ. PPAR: a circadian transcription factor in adipogenesis and osteogenesis. *Nat. Rev. Endocrinol.* 2010; 6:629-636. (PubMed: 20820194)
- Kennedy BK, Austriaco NR Jr, Zhang J, Guarente L. Mutation in the silencing gene SIR4 can delay aging in *S. cerevisiae*. *Cell* 80: 485–496, 1995.
- Kennedy BK, Gotta M, Sinclair DA, Mills K, McNabb DS, Murthy M, Pak SM, Laroche T, Gasser SM, Guarente L. Redistribution of silencing proteins from telomeres to the nucleolus is associated with extension of life span in *S. cerevisiae*. *Cell* 89: 381–391, 1997.
- Khare S, Verma M. Epigenetics of colon cancer. *Methods Mol Biol.* 2012;863:177-185.
- Kharitonov A, et al. FGF-21 as a novel metabolic regulator. *J. Clin. Invest.* 2005; 115:1627– 1635. [PubMed: 15902306]
- Kharitonov A, Shanafelt AB. Fibroblast growth factor-21 as a therapeutic agent for metabolic diseases. *BioDrugs.* 2008; 22:37–44. [PubMed: 18215089]
- Kharitonov A. FGFs and metabolism. *Curr. Opin. Pharmacol.* 2009; 9:805–810. [PubMed: 19683963]
- Khatib, H. 2012. *Livestock Epigenetics.* Wiley-Blackwell, Oxford.
- King GD, Chen C, Huang MM, Zeldich E, Brazee PL, Schuman ER, Robin M, Cuny GD, Glicksman MA, Abraham CR. Identification of novel small molecules that elevate Klotho expression. *Biochem J.* 2012;441:453- 461.

- Kirkwood TBL, Tallis RC, Fillit HM. Evolution theory and the mechanisms of aging. eds. *Geriatric Medicine and Gerontology*. 6th edition. Spain: Churchill Livingstone. 2003: 31-35.
- Kissebah AH, Freedman DS, Peiris AN. Health risks of obesity. *Med. Clin. North Am.* 1989; 73:111– 138. [PubMed: 2643000]
- Klein CJ, Botuyan MV, Wu Y, et al. Mutations in DNMT1 cause hereditary sensory neuropathy with dementia and hearing loss. *Nat Genet* 2011, 43:595-600.
- Klose RJ, Bird AP. Genomic DNA methylation: the mark and its mediators. *Trends Biochem Sci* 31: 89–97, 2006.
- Kochanek S, Renz D, Doerfler W (1993) DNA methylation in the Alu sequences of diploid and haploid primary human cells. *EMBO J.* 12, 1141–1151.
- Kouzarides T. Histone methylation in transcriptional control. *Curr Opin Genet Dev* 12: 198–209, 2002.
- Köprü B, Balıkesir üniversitesi sağlık bilimleri enstitüsü tıbbi biyokimya anabilim dalı obstrüktif uyku apne sendromunda galektin-3, sırt-1, tiyoredoksin, nitrik oksit düzeylerinin değerlendirilmesi, yüksek lisans tezi
- Kulis M, Esteller M. DNA methylation and cancer. *Adv Genet.* 2010;70:27-56.
- Kulshreshtha R, Ferracin M, Wojcik SE, Garzon R, Alder H, Agosto-Perez FJ, Davuluri R, Liu CG, Croce CM, Negrini M, Calin GA, Ivan M. A microRNA signature of hypoxia. *Mol Cell Biol* 27: 1859–1867, 2007.
- Kuo MH, Allis CD. Roles of histone acetyltransferases and deacetylases in gene regulation. *Bioessays* 20: 615–626, 1998.
- Kuro-o M, et al. Mutation of the mouse Klotho gene leads to a syndrome resembling ageing. *Nature.* 1997; 390:45–51. [PubMed: 9363890]
- Kuro-o M. A potential link between phosphate and aging—lessons from Klotho-deficient mice. *Mech Ageing Dev.* 2010;131:270-275.
- Kuro-o M. Endocrine FGFs and Klothos: emerging concepts. *Trends Endocrinol. Metab.* 2008; 19:239–245. [PubMed: 18692401]
- Kuro-o, M. Klotho as a regulator of oxidative stress and senescence. *Biol Chem.* 2008;389:233-241.
- Kurosu H, et al. Regulation of fibroblast growth factor-23 signaling by Klotho. *J. Biol. Chem.* 2006; 281:6120–6123. [PubMed: 16436388]
- Kuro-o, M., Matsumura, Y., Aizawa, H., Kawaguchi, H., Suga, T., Utsugi, T., Ohyama, Y., Kurabayashi, M., Kaname, T., Kume, E., Iwasaki, H., Iida, A., Shiraki- Iida, T., Nishikawa, S., Nagai, R., and Nabeshima, Y. I. (1997) Mutation of the mouse klotho gene leads to a syndrome resembling ageing, *Nature* 390, 45-51.
- Kurosu H, et al. Suppression of aging in mice by the hormone Klotho. *Science.* 2005; 309:1829– 1833. [PubMed: 16123266]
- Kurosu H, et al. Tissue-specific expression of β -Klotho and fibroblast growth factor (FGF) receptor isoforms determines metabolic activity of FGF19 and FGF21. *J. Biol. Chem.* 2007; 282:26687– 26695. [PubMed: 17623664]
- Kurosu, H., Ogawa, Y., Miyoshi, M., Yamamoto, M., Nandi, A., Rosenblatt, K. P., Baum, M. G., Schiavi, S., Hu, M. C., Moe, O. W., and Kuro-o, M. (2006) Regulation of fibroblast growth factor-23 signaling by klotho, *J Biol Chem* 281, 6120-6123.

- Kwabi-Addo B, Chung W, Shen L, Ittmann M, Wheeler T, Jelinek J, Issa JP (2007) Age-related DNA methylation changes in normal human prostate tissues. *Clin. Cancer Res.* 13, 3796–3802.
- Lachner M, Jenuwein T. The many faces of histone lysine methylation. *Curr Opin Cell Biol* 14: 286– 298, 2002.
- Lachner M, O’Sullivan RJ, Jenuwein T. An epigenetic road map for histone lysine methylation. *J Cell Sci* 116: 2117–2124, 2003.
- Lam LL, Emberly E, Fraser HB, Neumann SM, Chen E, Miller GE, Kobor MS (2012) Factors underlying variable DNA methylation in a human community cohort. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 109(Suppl 2), 17253–17260.
- Langley-Evana SC, Sculley DV, 2005: Programming of hepatic antioxidant capacity and oxidative injury in the ageing rat. *Mech Ageing Dev*, 126 (6-7), 804- 812.
- Lara E, Mai A, Calvanese V, Altucci L, Lopez-Nieva P, Martinez- Chantar ML, Varela-Rey M, Rotili D, Nebbioso A, Ropero S, Montoya G, Oyarzabal J, Velasco S, Serrano M, Witt M, Villar-Garea A, Imhof A, Mato JM, Esteller M, Fraga MF. Salermide, a Sirtuin inhibitor with a strong cancer- specific proapoptotic effect. *Oncogene* 28: 781–791, 2009.
- Larsen PL, Clarke CF. Extension of life-span in *Caenorhabditis elegans* by a diet lacking coenzyme Q. *Science* 2002;295:120-3.
- Lee CG, et al. Mortality risk in older men associated with changes in weight, lean mass, and fat mass. *J. Am. Geriatr. Soc.* 2011; 59:233–240. [PubMed: 21288234]
- Lee J, Jeong DJ, Kim J, Lee S, Park JH, Chang B, Jung SI, Yi L, Han Y, Yang Y, Kim KI, Lim JS, Yang I, Jeon S, Bae DH, Kim CJ, Lee MS. The anti-aging gene KLOTHO is a novel target for epigenetic silencing in human cervical carcinoma. *Mol Cancer.* 2010;9:109.
- Lee KWK, Richmond R, Hu P, French L, Shin J, Bourdon C, Reischl E, Waldenberger M, Zeilinger S, Gaunt T, McArdle W, Ring S, Woodward G, Bouchard L, Gaudet D, Davey Smith G, Relton C, Paus T, Pausova Z (2015) Prenatal exposure to maternal cigarette smoking and DNA methylation: epigenome-wide association in a discovery sample of adolescents and replication in an independent cohort at birth through 17 years of age. *Environ. Health Perspect.* 123, 193–199.
- Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75: 843–854, 1993
- Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. DNA methylation and genetic instability in colorectal cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 2545–2550, 1997.
- Li SA, Watanabe M, Yamada H, Nagai A, Kinuta M, Takei K. Immunohistochemical localization of Klotho protein in brain, kidney, and reproductive organs of mice. *Cell Struct Funct.* 2004;29:91- 99.
- Liang R, Bates DJ, Wang E. Epigenetic control of MicroRNA expression and aging. *Curr Genomics* 10: 184–193, 2009.
- Lillycrop KA, Burdge GC, 2012: Epigenetic mechanisms linking early nutrition to long term health. *Best Pract Res Clin Endocr Metab*, 26, 667-676.
- Lin WY, et al. Body mass index and all-cause mortality in a large Chinese cohort. *CMAJ.* 2011; 183:E329–E336. [PubMed: 21398246]
- Linnane AW, Zhang C, Baumer A, Nagley P. Mitochondrial DNA mutation and the ageing process: bioenergy and pharmacological intervention. *Mutat Res* 1992;275:195-208.

- Lister R, Mukamel EA, Nery JR, Urich M, Puddifoot CA, Johnson ND, Lucero J, Huang Y, Dwork AJ, Schultz MD, Yu M, Tonti-Filippini J, Heyn H, Hu S, Wu JC, Rao A, Esteller M, He C, Haghghi FG, Sejnowski TJ, Behrens MM, Ecker JR (2013) Global epigenomic reconfiguration during mammalian brain development. *Science* 341, 1237905.
- Lister R, Pelizzola M, Dowen RH, Hawkins RD, Hon G, Tonti-Filippini J, Nery JR, Lee L, Ye Z, Ngo Q-M, Edsall L, Antosiewicz-Bourget J, Stewart R, Ruotti V, Millar AH, Thomson JA, Ren B, Ecker JR (2009) Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences. *Nature* 462, 315–322.
- Liu RK and Walford RL. The effect of lowered body temperature on lifespan and immune and non-immune processes. *Gerontologia* 1972; 18:363-388.
- Liu S, et al. Pathogenic role of Fgf23 in Hyp mice. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2006; 291:E38–E49. [PubMed: 16449303]
- Liu S, Quarles LD. How fibroblast growth factor 23 works. *J Am Soc Nephrol.* 2007;18:1637-1647.
Long YC, Kharitonov A. Hormone-like fibroblast growth factors and metabolic regulation. *Biochim. Biophys. Acta.* 2011; 1812:791–795. [PubMed: 21504790]
- Luger K, Mader AW, Richmond RK, Sargent DF, Richmond TJ. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* 389: 251–260, 1997.
- Lundblad V, Wright WE. Telomeres and telomerase: a simple picture becomes complex. *Cell* 1996; 87(1):369-75.
- Luo J, Nikolaev AY, Imai S, Chen D, Su F, Shiloh A, Guarente L, Gu W. Negative control of p53 by Sir2alpha promotes cell survival under stress. *Cell* 107: 137–148, 2001.
- Maes OC, An J, Sarojini H, Wang E. Murine microRNAs implicated in liver functions and aging process. *Mech Ageing Dev* 129: 534–541, 2008.
- Maison C, Bailly D, Peters AH, Quivy JP, Roche D, Taddei A, Lachner M, Jenuwein T, Almouzni G. Higher-order structure in pericentric heterochromatin involves a distinct pattern of histone modification and an RNA component. *Nat Genet* 30: 329–334, 2002.
- Maloney WJ. Hutchinson-Gilford Progeria syndrome: its presentation in F. Scott Fitzgerald's short story 'The Curious Case of Benjamin Button' and its oral manifestations. *J Dent Res* 2009; 88: 873-876.
- Marioni RE, Shah S, McRae AF, Chen BH, Colicino E, Harris SE, Gibson J, Henders AK, Redmond P, Cox SR, Pattie A, Corley J, Murphy L, Martin NG, Montgomery GW, Feinberg AP, Fallin M, Multhaup ML, Jaffe AE, Joehanes R, Schwartz J, Just AC, Lunetta KL, Murabito JM, Starr JM, Horvath S, Baccarelli AA, Levy D, Visscher PM, Wray NR, Deary IJ (2015) DNA methylation age of blood predicts all-cause mortality in later life. *Genome Biol.* 16, 25.
- Martin C, Zhang Y. Mechanisms of epigenetic inheritance. *Curr Opin Cell Biol* 2007; 19(3):266-272.
- Martin C, Zhang Y. The diverse functions of histone lysine methylation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6: 838–849, 2005.
- Martin GM (2005) Epigenetic drift in aging identical twins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 10413–10414.
- Martin GM. Genetics and the pathobiology of ageing. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1997; 352:1773-1780

- Martino D, Loke YJ, Gordon L, Ollikainen M, Cruickshank MN, Saffery R, Craig JM (2013) Longitudinal, genome-scale analysis of DNA methylation in twins from birth to 18 months of age reveals rapid epigenetic change in early life and pairspecific effects of discordance. *Genome Biol.* 14, R42.
- Martino DJ, Tulic MK, Gordon L, Hodder M, Richman TR, Metcalfe J, Prescott SL, Saffery R (2011) Evidence for age-related and individual-specific changes in DNA methylation profile of mononuclear cells during early immune development in humans. *Epigenetics* 6, 1085–1094.
- Matsumura Y, Aizawa H, Shiraki-Iida T, Nagai R, Kuro-o M, Nabeshima Y. Identification of the human klotho gene and its two transcripts encoding membrane and secreted klotho protein. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998;242:626-630.
- Matera AG, Terns RM, Terns MP. Non-coding RNAs: lessons from the small nuclear and small nucleolar RNAs. *Nature reviews Molecular Cell Biology.* 2007; 8(3):209-220
- Maures TJ, Greer EL, Hauswirth AG, Brunet A (2011) H3K27 demethylase UTX-1 regulates *C. elegans* lifespan in a germline-independent, insulin-dependent, manner. *Aging Cell* 10, 980–990. doi:10.1111/j.1474-9726.2011.00738.x.
- Mayerson M. Role of telomerase in normal and cancer cells. *Journal of Clinical Oncology* 2000; 18(13):2626-34.
- McClay JL, Aberg KA, Clark SL, Nerella S, Kumar G, Xie LY, Hudson AD, Harada A, Hultman CM, Magnusson PKE, Sullivan PF, van den Oord EJCG (2014) A methylome-wide study of aging using massively parallel sequencing of the methyl-CpG-enriched genomic fraction from blood in over 700 subjects. *Hum. Mol. Genet.* 23, 1175–1185.
- Meaghan J. Jones, Sarah J. Goodman and Michael S. Kobor, DNA methylation and healthy human *Aging Cell* (2015) 14,pp924-932 [PubMed: 25913071
- Mercer TR, Dinger ME, Mattick JS . Long non-coding RNAs: insights into functions. *Nat Reviews Genetics.* 2009; 10(3):155-159
- Meaney MJ (2010) Epigenetics and the biological definition of gene x environment interactions. *Child Dev.* 81, 41–79.
- Medici D, et al. FGF-23–Klotho signaling stimulates proliferation and prevents vitamin D-induced apoptosis. *J. Cell Biol.* 2008; 182:459–465. [PubMed: 18678710]
- Mello CC, Conte D Jr. Revealing the world of RNA interference. *Nature* 431: 338–342, 2004. Mikkelsen TS, Ku M, Jaffe DB, Issac B, Lieberman E, Giannoukos G, Alvarez P, Brockman W, Kim
- Meyerson M. Telomerase enzym activation and human cell immortalization. *Toxicology Letters* 1998; 102- 103:41-5.
- Min D, et al. Sustained thymopoiesis and improvement in functional immunity induced by exogenous KGF administration in murine models of aging. *Blood.* 2007; 109:2529–2537. [PubMed: 17138819]
- Mikkelsen et al. Genome-wide maps of chromatin state in pluripotent and lineage-committed cells. *Nature* 448:553-560, 2007
- Mokdad AH, Marks JD, Stroup DF, Gerberding JL. Actual causes of death in the United States. *JAMA.* 2004; 29:1238–1245. [PubMed: 15010446]
- Monick MM, Beach SRH, Plume J, Sears R, Gerrard M, Brody GH, Philibert RA (2012) Coordinated changes in AHRH methylation in lymphoblasts and pulmonary macrophages from smokers. *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet.* 159B, 141–151.

- Moreno JA, Izquierdo MC, Sanchez-Nino MD, Suarez-Alvarez B, Lopez-Larrea C, Jakubowski A, Blanco J, Ramirez R, Selgas R, Ruiz-Ortega M, Egido J, Ortiz A, Sanz AB. The inflammatory cytokines TWEAK and TNF α reduce renal klotho expression through NF κ B. *J Am Soc Nephrol*. 2011;22:1315-1325.
- Morgan TE, Wong AM, Finch CE. Anti-inflammatory mechanisms of dietary restriction in slowing aging processes. *Interdiscip Top Gerontol* 2007; 35:83-97.
- Mori K, et al. Disruption of Klotho gene causes an abnormal energy homeostasis in mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000; 278:665–670. [PubMed: 11095966]
- Mostoslavsky R, Chua KF, Lombard DB, Pang WW, Fischer MR, Gellon L, Liu P, Mostoslavsky G, Franco S, Murphy MM, Mills KD, Patel P, Hsu JT, Hong AL, Ford E, Cheng HL, Kennedy C, Nunez N, Bronson R, Frenthewey D, Auerbach W, Valenzuela D, Karow M, Hottiger MO, Hursting S, Barrett JC, Guarente L, Mulligan R, Demple B, Yancopoulos GD, Alt FW. Genomic instability and aginglike phenotype in the absence of mammalian SIRT6. *Cell* 124: 315–329, 2006.
- Muftuoglu M, Oshima J, von Kobbe C, et al. The clinical characteristics of Werner syndrome: molecular and biochemical diagnosis. *Hum Genet* 2008;124:369-77.
- Nabel CS, Kohli RM. Molecular biology. Demystifying DNA demethylation. *Science*. 2011 Sep 2;333:1229-30.
- Nakatani T, et al. In vivo genetic evidence for Klotho-dependent, fibroblast growth factor 23 (Fgf23)-mediated regulation of systemic phosphate homeostasis. *FASEB J*. 2009; 23:433–441. [PubMed: 18835926]
- Nakatani T, Ohnishi M, Razzaque MS. Inactivation of Klotho function induces hyperphosphatemia even in presence of high serum fibroblast growth factor 23 levels in a genetically engineered hypophosphatemic (Hyp) mouse model. *FASEB J*. 2009; 23:3702–3711. [PubMed: 19584304]
- Nalbant S, Yaşlanmanın biyolojisi (The biology of aging). XXXVI. Geleneksel çubukçu günleri konuşması. GATA Haydarpaşa Eğitim Hastanesi, İç hastalıkları servisi, Ocak 2006, İstanbul
- North BJ, Marshall BL, Borra MT, Denu JM, Verdin E. The Human Sir2 Ortholog, SIRT2, Is An NAD $^{+}$ -Dependent Tubulin Deacetylase. *Mol Cell*, 2003, 11:437-444.
- Nott A, Watson PM, Robinson JD, Crepaldi L, Riccio A. S-Nitrosylation of histone deacetylase 2 induces chromatin remodelling in neurons. *Nature* 2008; 455(7211):411-415.
- Numata S, Ye T, Hyde TM, Guitart-Navarro X, Tao R, Wininger M, Colantuoni C, Weinberger DR, Kleinman JE, Lipska BK (2012) DNA methylation signatures in development and aging of the human prefrontal cortex. *Am. J. Hum. Genet.* 90, 260–272.
- O'Hagan HM, Mohammad HP, Baylin SB. Double strand breaks can initiate gene silencing and SIRT1-dependent onset of DNA methylation in an exogenous promoter CpG island. *PLoS Genet* 4: e1000155, 2008.
- Oberdoerffer P, Michan S, McVay M, Mostoslavsky R, Vann J, Park SK, Hartlerode A, Stegmüller J, Hafner A, Loerch P, Wright SM, Mills KD, Bonni A, Yankner BA, Scully R, Prolla TA, Alt FW, Sinclair DA. SIRT1 redistribution on chromatin promotes genomic stability but alters gene expression during aging. *Cell* 135: 907–918, 2008.
- Oberdoerffer P, Sinclair DA. The role of nuclear architecture in genomic instability and ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8: 692–702, 2007.

- Ogata, N., Matsumura, Y., Shiraki, M., Kawano, K., Koshizuka, Y., Hosoi, T., Nakamura, K., Kuro, O. M., and Kawaguchi, H. (2002) Association of klotho gene polymorphism with bone density and spondylosis of the lumbar spine in postmenopausal women, *Bone* 31, 37-42.
- Ogawa Y, et al. β -Klotho is required for metabolic activity of fibroblast growth factor 21. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2007; 104:7432–7437. [PubMed: 17452648]
- Ohnishi M, Kato S, Razzaque MS. Genetic induction of phosphate toxicity significantly reduces the survival of hypercholesterolemic obese mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2011; 415:434– 438. [PubMed: 22037453]
- Ohnishi M, Kato S, Akiyoshi J, Atfi A, Razzaque MS. Dietary and genetic evidence for enhancing glucose metabolism and reducing obesity by inhibiting Klotho functions. *FASEB J.* 2011; 25:2031–2039. [PubMed: 21382979]
- Ohnishi M, Nakatani T, Lanske B, Razzaque MS. Reversal of mineral ion homeostasis and soft-tissue calcification of Klotho knockout mice by deletion of vitamin D 1 α -hydroxylase. *Kidney Int.* 2009; 75:1166–1172. [PubMed: 19225558]
- Ohnishi M, Nakatani T, Lanske B, Razzaque MS. In vivo genetic evidence for suppressing vascular and soft-tissue calcification through the reduction of serum phosphate levels, even in the presence of high serum calcium and 1,25-dihydroxyvitamin D levels. *Circ. Cardiovasc. Genet.* 2009; 2: 583-590. (PubMed: 20031638).
- Ohnishi M, Razzaque MS. Dietary and genetic evidence for phosphate toxicity accelerating mammalian aging. *FASEB J.* 2010; 24:3562–3571. [PubMed: 20418498]
- Ohyama Y, Kurabayashi M, Masuda H, Nakamura T, Aihara Y, Kaname T, Suga T, Arai M, Aizawa H, Matsumura Y, Kuro-o M, Nabeshima Y, Nagail, R. Molecular cloning of rat klotho cDNA: markedly decreased expression of klotho by acute inflammatory stress. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998;251:920-925.
- Oliveira AM, Hemstedt TJ, Bading H. Rescue of aging-associated decline in Dnmt3a2 expression restores cognitive abilities. *Nat Neurosci.* 2012 Jul 1;15:1111-3.
- Ong M-L, Holbrook JD (2014) Novel region discovery method for Infinium 450K DNA methylation data reveals changes associated with aging in muscle and neuronal pathways. *Aging Cell* 13, 142– 155.
- Orcan S, Epigenetik ve epigenomik. Hacettepe üniversitesi, 2006
- Osuka S, Razzaque MS. Can features of phosphate toxicity appear in normophosphatemia? *J. Bone Miner. Metab.* 2012; 30:10–18. [PubMed: 22219005]
- Ozawa T. Genetic and functional changes in mitochondria associated with aging. *Physiol Rev* 1997;77:425-64.
- Öğrünç M, Becker DF, Ragsdale SW, Sancar A. [1998]Nucleotide excision repair: from E. Coli to man. *Biochimie.* 81: 15-25.
- Özer N. 2017; Konya Bölgesinde Yaşayan Annelerin Biyolojik Sınırlarında Besin Kaynaklı miRNA Varlığının Araştırılması Necmettin Erbakan üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Tıbbi biyokimya Anabilim Dalı Uzmanlık Tezi
- Painter RC, Roseboom TJ, Bleker OP, 2005: Prenatal exposure to the Dutch famine and disease in later life: an overview. *Repro Toxicol*, 20, 345-352.
- Pan J, Zhong J, Gan LH, Chen SJ, Jin HC, Wang X, Wang LJ. Klotho, an anti-senescence related gene, is frequently inactivated through promoter hypermethylation in colorectal cancer. *Tumour Biol.*2011;32:729-735.

- Pan JJ, et al. Prevalence of metabolic syndrome and risks of abnormal serum alanine aminotransferase in Hispanics: a population-based study. *PLoS ONE*. 2011; 6:e21515. [PubMed: 21720553]
- Park SY, Lee JH, Ha M, Nam JW, Kim VN. miR-29 miRNAs activate p53 by targeting p85 alpha and CDC42. *Nat Struct Mol Biol* 16: 23–29, 2009.
- Peris TT. The different paths to 100. *Am J Clin Nutr* 2006; 83:484S-487S.
- Petit C, Sancar A. [1999]Nucleotide excision repair: From E. Coli to man. *Biochimie*. 81: 15-25.
- Picard F, Kurtev M, Chung N, Topark-Ngarm A, Senawong T, Machado De Oliveira R, Leid M, McBurney MW, Guarente L. Sirt1 promotes fat mobilization in white adipocytes by repressing PPARgamma. *Nature* 429: 771–776, 2004.
- Poulsen P, Esteller M, Vaag A, Fraga MF (2007) The epigenetic basis of twin discordance in age-related diseases. *Pediatr. Res.* 61, 38R–42R.
- Pruitt K, Zinn RL, Ohm JE, McGarvey KM, Kang SH, Watkins DN, Herman JG, Baylin SB. Inhibition of SIRT1 reactivates silenced cancer genes without loss of promoter DNA hypermethylation. *PLoS Genet* 2: e40, 2006.
- Pucci B, Villanova L, Sansone L, Pellegrini L, Tafani M, Carpi A, Fini M, Russo MA. Sirtuins: The Molecular Basis Of Beneficial Effects Of Physical Activity. *Intern Emerg Med*, 2013, 8(Suppl 1):S23–S25.
- Pulkkinen K, Malm T, Turunen M, Koistinaho J, Yla-Herttuala S. Hypoxia induces microRNA miR-210 in vitro and in vivo ephrin-A3 and neuronal pentraxin 1 are potentially regulated by miR-210. *FEBS Lett* 582: 2397–2401, 2008.
- Qian H, Xu X. Reduction in DNA methyltransferases and alteration of DNA methylation pattern associate with mouse skin ageing. *Exp Dermatol*. 2014 May;23:357-9.
- Quarles LD. Endocrine functions of bone in mineral metabolism regulation. *J. Clin. Invest.* 2008; 118:3820–3828. [PubMed: 19033649]
- Rakyan VK, Down TA, Maslau S, Andrew T, Yang T-P, Beyan H, Whittaker P, McCann OT, Finer S, Valdes AM, Leslie RD, Deloukas P, Spector TD (2010) Human aging-associated DNA hypermethylation occurs preferentially at bivalent chromatin domains. *Genome Res.* 20, 434–439.
- Ramirez CL, Cadiñanos J, Varela I Freije JM, López-Otin C. Human Progeroid syndromes, aging and cancer: new genetic and epigenetic insights into old questions. *Cell Moll Life Sci* 2007;64:155- 170.
- Razzaque MS, Lanske B. Hypervitaminosis D and premature aging: lessons learned from Fgf23 and Klotho mutant mice. *Trends Mol. Med.* 2006; 12:298–305. [PubMed: 16731043]
- Razzaque MS, The role of klotho in energy metabolism. *Nat rev endocrinol*, 2012 october; 8(10); 579- 587, doi: 10.1038/nrendo.2012.75
- Razzaque MS. Does FGF23 toxicity influence the outcome of chronic kidney disease? *Nephrol. Dial. Transplant.* 2009; 24:4–7. [PubMed: 18996835]
- Razzaque MS. Osteo-renal regulation of systemic phosphate metabolism. *IUBMB Life.* 2011; 63:240–247. [PubMed: 21438115]
- Razzaque MS. The FGF23–Klotho axis: endocrine regulation of phosphate homeostasis. *Nat. Rev. Endocrinol.* 2009; 5:611–619. [PubMed: 19844248]
- Razzaque MS. Therapeutic potential of Klotho-FGF23 fusion polypeptides: WO2009095372. *Expert Opin. Ther. Pat.* 2010; 20:981–985. [PubMed: 20459364]

- Razzaque MS. Phosphate toxicity: new insights into an old problem. *Clin. Sci. (Lond.)*. 2011; 120: 91-97. (Pubmed: 20958267).
- Razzaque MS. FGF23- mediated regulation of systemic phosphate homeostasis: is Klotho an essential player? *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 2009; 296: F470-F479. (Pubmed: 19019915).
- Reardon JT, Bessho T, Kung HC, Balton PH, Sancar A. [1997]In vitro repair of oxidative DNA damage by human nucleotide excision repair system:possible explanation for neurodegeneration in xeroderma pigmentosum patients *Proc Nat Acad Sci USA*. 94: 9463-9468.
- Rhee EJ, et al. The differential effects of age on the association of Klotho gene polymorphisms with coronary artery disease. *Metabolism*. 2006; 55:1344–1351. [PubMed: 16979405]
- Rhyu MS. Telomeres, telomerase, and immortality. *Journal of The National Cancer Institute* 1995; 87(12):884-94.
- Robertson, K.D. 2005. DNA methylation and human diseases. *Nat. Rev. Genet.* 6: 597-610.
- Romanov GA, Vanyushin BF. Methylation of reiterated sequences in mammalian DNAs. Effects of the tissue type, age, malignancy and hormonal induction. *Biochim Biophys Acta* 653: 204–218, 1981.
- Rubinek T, Shulman M, Israeli S, Bose S, Avraham A, Zundelevich A, Evron E, Gal-Yam EN, Kaufman B, Wolf I. Epigenetic silencing of the tumor suppressor klotho in human breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2012;133:649-657.
- Saito Y, Jones PA. Epigenetic activation of tumor suppressor microRNAs in human cancer cells. *Cell Cycle* 5: 2220–2222, 2006.
- Sancar A, Lindsey-Boltz LA, Ünsal-Kaçmaz K, Linn S. Molecular mechanisms of Mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. [2004]*Annu Rev Biochem.* 73: 39-85.
- Sancar A, Reardon JT. [2004]Nucleotide excision repair in E.Coli and Man. *Advances in Protein Chemistry.* 69: 43-71.
- Sancar A, Reardon JT. [2004]Nucleotide excision repair in E.Coli and Man. *Advances in Protein Chemistry.* 69: 43-71.
- Sancar A, Rupp WD. [1983]A novel repair enzyme: Uvr ABC excision nuclease of Esherishia Coli cuts a DNA strand on both sides of the damaged region *Cell.* 33: 249-260.
- Sancar A. [1996]DNA excision repair. *Annu Rev Biochem.* 65: 43-81.
- Santos-Rosa H, Schneider R, Bannister AJ, Sherriff J, Bernstein BE, Emre NC, Schreiber SL, Mellor J, Kouzarides T. Active genes are tri-methylated at K4 of histone H3. *Nature* 419: 407–411, 2002.
- Sarafidis PA. Obesity, insulin resistance and kidney disease risk: insights into the relationship. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 2008; 17:450–456. [PubMed: 18695384]
- Sarg B, Koutzamani E, Helliger W, Rundquist I, Lindner HH. Postsynthetic trimethylation of histone H4 at lysine 20 in mammalian tissues is associated with aging. *J Biol Chem* 277: 39195–39201, 2002.
- Saxonov S, Berg P, Brutlag DL (2006) A genome-wide analysis of CpG dinucleotides in the human genome distinguishes two distinct classes of promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 1412– 1417.
- Saygılı, S. (2011). “*Yaşlılık Psikolojisi,*” Türedav Yayın Grubu, 1. Baskı, İstanbul, s. 152.

- Segre CV, Chiocca S. Regulating the regulators: The Post-Translational Code of Class I HDAC1 and HDAC2. *J Biomed Biotech* 2011;doi: 10.1155/2011/690848
- Shah S, McRae AF, Marioni RE, Harris SE, Gibson J, Henders AK, Redmond P, Cox SR, Pattie A, Corley J, Murphy L, Martin NG, Montgomery GW, Starr JM, Wray NR, Deary IJ, Visscher PM (2014) Genetic and environmental exposures constrain epigenetic drift over the human life course. *Genome Res.* 24, 1725–1733.
- Shen L, Kondo Y, Hamilton SR, Rashid A, Issa JP. P14 methylation in human colon cancer is associated with microsatellite instability and wild-type p53. *Gastroenterology* 124: 626–633, 2003.
- Shenker NS, Polidoro S, van Veldhoven K, Sacerdote C, Ricceri F, Birrell MA, Belvisi MG, Brown R, Vineis P, Flanagan JM (2013) Epigenome-wide association study in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC-Turin) identifies novel genetic loci associated with smoking. *Hum. Mol. Genet.* 22, 843–851.
- Shi T, Wang F, Stieren E, Tong Q. SIRT3, A Mitochondrial Sirtuin Deacetylase, Regulates Mitochondrial Function And Thermogenesis In Brown Adipocytes. *J Biol Chem*, 2005, 280:13560-13567.
- Shi Y, Lan F, Matson C, Mulligan P, Whetstine JR, Cole PA, Casero RA, Shi Y. Histone demethylation mediated by the nucleamine oxidase homolog LSD1. *Cell* 119: 941–953, 2004.
- Shilatifard A. Chromatin modifications by methylation and ubiquitination: implications in the regulation of gene expression. *Annu Rev Biochem* 75: 243–269, 2006.
- Shiraki-Iida T, Aizawa H, Matsumura Y, Sekine S, Iida A, Anazawa H, Nagai R, Kuro-o M, Nabeshima Y. Structure of the mouse klotho gene and its two transcripts encoding membrane and secreted protein. *FEBS Lett.* 1998;424:6-10.
- Sırıken Belgin, Sırıken Fatih, Ünsal Cengiz, Çiftci Gülay Beslenme ve Epigenetik Harran Üniv Vet Fak Derg, 2018; UGAP2018
- Siegmund KD, Connor CM, Campan M, Long TI, Weisenberger DJ, Biniszkievicz D, Jaenisch R, Laird PW, Akbarian S. DNA methylation in the human cerebral cortex is dynamically regulated throughout the life span and involves differentiated neurons. *PLoS One* 2: e895, 2007.
- Siegmund KD, Connor CM, Campan M, Long TI, Weisenberger DJ, Biniszkievicz D, Jaenisch R, Laird PW, Akbarian S. DNA methylation in the human cerebral cortex is dynamically regulated throughout the life span and involves differentiated neurons. *PLoS One.* 2007;2:e895.
- Sims RJ 3rd, Nishioka K, Reinberg D. Histone lysine methylation: a signature for chromatin function. *Trends Genet* 19: 629–639, 2003.
- Singhal RP, Mays-Hoopers LL, Eichhorn GL. DNA methylation in aging of mice. *Mech Ageing Dev.* 1987 Dec;41:199-210.
- Sitara D, et al. Homozygous ablation of fibroblast growth factor-23 results in hyperphosphatemia and impaired skeletogenesis, and reverses hypophosphatemia in Phex-deficient mice. *Matrix Biol.* 2004; 23:421–432. [PubMed: 15579309]
- Slijepcevic P. DNA damage response, telomere maintenance and ageing in light of the integrative model. *Mech Ageing Dev* 2008;129(1-2):11-16.
- Slijepcevic P. Telomere length regulation-A view from the individual chromosome perspective. *Experimental Cell Research* 1998; 244:268-74.
- Smith BW, Adams LA. Nonalcoholic fatty liver disease and diabetes mellitus: pathogenesis and treatment. *Nat. Rev. Endocrinol.* 2011; 7:456–465. [PubMed: 21556019]

- So K, Tamura G, Honda T, Homma N, Waki T, Togawa N, Nishizuka S, Motoyama T (2006) Multiple tumor suppressor genes are increasingly methylated with age in non-neoplastic gastric epithelia. *Cancer Sci.* 97, 1155–1158.
- So K, Tamura G, Honda T, Homma N, Waki T, Togawa N, Nishizuka S, Motoyama T. Multiple tumor suppressor genes are increasingly methylated with age in non-neoplastic gastric epithelia. *Cancer Sci* 97: 1155–1158, 2006.
- Su SC, Tsai LH. DNA methylation in cognition comes of age. *Nat Neurosci.* 2012 Jul 26;15:1061-2.
- Sun CY, Chang SC, Wu MS. Suppression of Klotho expression by protein-bound uremic toxins is associated with increased DNA methyltransferase expression and DNA hypermethylation. *Kidney Int.*2012;81:640-650.
- Sun D, Lopez-Guajardo CC, Quada J, et al. Regulation of catalytic activity and processivity of human telomerase. *Biochemistry* 1999; 38:4037-44.
- Sun YV, Smith AK, Conneely KN, Chang Q, Li W, Lazarus A, Smith JA, Almli LM, Binder EB, Klengel T, Cross D, Turner ST, Ressler KJ, Kardia SLR (2013) Epigenomic association analysis identifies smoking-related DNA methylation sites in African Americans. *Hum. Genet.* 132, 1027– 1037.
- Suzuki M, et al. β -Klotho is required for fibroblast growth factor (FGF) 21 signaling through FGF receptor (FGFR) 1c and FGFR3c. *Mol. Endocrinol.* 2008; 22:1006–1014. [PubMed: 18187602]
- Şekeroğlu, Z.A. Oksidatif Mitokondrial Hasar ve Yaşlanmadaki Önemi, *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, 2 (2009); 69-74.
- Taguchi A, Yanagisawa K, Tanaka M, Cao K, Matsuyama Y, Goto H, Takahashi T. Identification of hypoxia-inducible factor-1 alpha as a novel target for miR-17–92 microRNA cluster. *Cancer Res* 68: 5540– 5545, 2008.
- Takatsu M, Uyeno S, Komura J, Watanabe M, Ono T. Age-dependent alterations in mRNA level and promoter methylation of collagen alpha1(I) gene in human periodontal ligament. *Mech Ageing Dev* 110: 37–48, 1999.
- Talens RP, Christensen K, Putter H, Willemsen G, Christiansen L, Kremer D, Suchiman HED, Slagboom PE, Boomsma DI, Heijmans BT (2012) Epigenetic variation during the adult lifespan: cross-sectional and longitudinal data on monozygotic twin pairs. *Aging Cell* 11, 694–703.
- Telomeraz Ve Kanser *Telomerase And Cancer* Günnur Dikmen, Pakize Doğan Uz.Dr., Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Ad, Prof.Dr., Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Ad, Ankara T Klinik Tıp Bilimleri 2003, 23:334-341.
- Teschendorff AE, Jones A, Fiegl H, Sargent A, Zhuang JJ, Kitchener HC, Widschwendter M (2012) Epigenetic variability in cells of normal cytology is associated with the risk of future morphological transformation. *Genome Med.* 4, 24.
- Teschendorff AE, West J, Beck S (2013) Age-associated epigenetic drift: implications, and a case of epigenetic thrift? *Hum. Mol. Genet.* 22, 7–15.
- Thakur MK, Kanungo MS. Methylation of chromosomal proteins and DNA of rat brain and its modulation by estradiol and calcium during aging. *Exp Gerontol* 16: 331–336, 1981.
- Tohyama O, Imura A, Iwano A, Freund JN, Henrissat B, Fujimori T, Nabeshima Y. Klotho is a novel beta-glucuronidase capable of hydrolyzing steroid beta-glucuronides. *J Biol Chem.* 2004;279:9777-9784.

- Tomiyama K, et al. Relevant use of Klotho in FGF19 subfamily signaling system in vivo. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2010; 107:1666–1671. [PubMed: 20080590]
- Torrens C, Brawley L, Dance CS, Itoh S, Poston L, Hanson MA, 2002: First evidence for transgenerational vascular programming in the rat protein restriction model. *J Physiol*, 543, 41-42.
- Tra J, Kondo T, Lu Q, Kuick R, Hanash S, Richardson B. Infrequent occurrence of age-dependent changes in CpG island methylation as detected by restriction landmark genome scanning. *Mech Ageing Dev* 123: 1487–1503, 2002.
- Tsujikawa H, Kurotaki Y, Fujimori T, Fukuda K, Nabeshima Y. Klotho, a gene related to a syndrome resembling human premature aging, functions in a negative regulatory circuit of vitamin D endocrine system. *Mol. Endocrinol.* 2003; 17:2393–2403. [PubMed: 14528024]
- Tsukada Y, Fang J, Erdjument-Bromage H, Warren ME, Borchers CH, Tempst P, Zhang Y. Histone demethylation by a family of JmjC domain-containing proteins. *Nature* 439: 811–816, 2006.
- Turan K, Ata P. Effects of intra- and extracellular factors on anti-aging klotho gene expression. *Genet Mol Res.* 2011;10:2009-2023.
- Urakawa I, et al. Klotho converts canonical FGF receptor into a specific receptor for FGF23. *Nature.* 2006; 444:770–774. [PubMed: 17086194]
- Urakawa, I., Yamazaki, Y., Shimada, T., Iijima, K., Hasegawa, H., Okawa, K., Fujita, T., Fukumoto, S., and Yamashita, T. (2006) Klotho converts canonical FGF receptor into a specific receptor for FGF23, *Nature* 444, 770-774.
- Utsugi T, et al. Decreased insulin production and increased insulin sensitivity in the Klotho mutant mouse, a novel animal model for human aging. *Metabolism.* 2000; 49:1118–1123. [PubMed: 11016890]
- Van Eijk KR, de Jong S, Boks MPM, Langeveld T, Colas F, Veldink JH, de Kovel CGF, Janson E, Strengman E, Langfelder P, Kahn RS, van den Berg LH, Horvath S, Ophoff RA (2012) Genetic analysis of DNA methylation and gene expression levels in whole blood of healthy human subjects. *BMC Genom.* 13, 636.
- Vanyushin BF, Nemirovsky LE, Klimenko VV, Vasiliev VK, Belozersky AN. The 5-methylcytosine in DNA of rats. Tissue and age specificity and the changes induced by hydrocortisone and other agents. *Gerontologia* 19: 138–152, 1973.
- Vaquero A, Scher M, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Serrano L, Reinberg D. SIRT1 regulates the histone methyl-transferase SUV39H1 during heterochromatin formation. *Nature* 450: 440–444, 2007.
- Vaquero A, Scher M, Lee D, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Reinberg D. Human SirT1 interacts with histone H1 and promotes formation of facultative heterochromatin. *Mol Cell* 16: 93–105, 2004.
- Vaziri H, Dessain SK, Ng Eaton E, Imai SI, Frye RA, Pandita TK, Guarente L, Weinberg RA. hSIR2(SIRT1) functions as an NADdependent p53 deacetylase. *Cell* 107: 149–159, 2001.
- Venter JC, et. al. The sequence of the human genome. *Science* 291: 1304–1351, 2001.
- Wagner JR, Busche S, Ge B, Kwan T, Pastinen T, Blanchette M (2014) The relationship between DNA methylation, genetic and expression inter-individual variation in untransformed human fibroblasts. *Genome Biol.* 15, R37.
- Wallace DC. Mitochondrial genetics: a paradigm for aging and degenerative diseases? *Science* 1992;256:628-32.

- Wang CM, Tsai SN, Yew TW, Kwan YW, Ngai SM. Identification of histone methylation multiplicities patterns in the brain of senescenceaccelerated prone mouse 8. *Biogerontology* 11: 87–102, 2010.
- Wang L, Wang X, Wang X, Jie P, Lu H, Zhang S, Lin X, Lam EK, Cui Y, Yu J, Jin H. Klotho is silenced through promoter hypermethylation in gastric cancer. *Am J Cancer Res.* 2011;1:111-119.
- Wang T, Pan Q, Lin L, Szulwach KE, Song C-X, He C, Wu H, Warren ST, Jin P, Duan R, Li X (2012) Genome-wide DNA hydroxymethylation changes are associated with neurodevelopmental genes in the developing human cerebellum. *Hum. Mol. Genet.* 21, 5500–5510.
- Wang Y, Sun Z. Current understanding of Klotho. *Ageing Res. Rev.* 2009; 8:43–51. [PubMed: 19022406]
- Wang YX. PPARs: diverse regulators in energy metabolism and metabolic diseases. *Cell. Res.* 2010; 20:124-137.(Pubmed: 20101262).
- Waterland RA, Michels KB. Epigenetic epidemiology of the developmental origins hypothesis. *Annu Rev Nutr* 2007; 27:363-388.
- Walter P, Blobel G. Signal recognition particle contains a 7S RNA essential for protein translocation across the endoplasmic reticulum. *Nature.* 1982; 299:691-698
- Weber M, Hellmann I, Stadler MB, Ramos L, Pääbo S, Rebhan M, Schübeler D (2007) Distribution, silencing potential and evolutionary impact of promoter DNA methylation in the human genome. *Nat. Genet.* 39, 457–466.
- Weidner CI, Lin Q, Koch CM, Eisele L, Beier F, Ziegler P, Bauerschlag DO, Jöckel KH, Erbel R, Mühleisen TW, Zenke M, Brummendorf TH, Wagner W (2014) Aging of blood can be tracked by DNA methylation changes at just three CpG sites. *Genome Biol.* 15, R24.
- Weindruch RH, Kristie JA, Cheney KE et al. Influence of controlled dietary restriction on immunologic function and aging. *Fed Proc* 1979; 38:2007-2016.
- Wellinger RJ, Sen D. The DNA structures at the ends of eukaryotic chromosomes. *Eur J Cancer* 1997; 33(5):735- 49.
- Whetstine JR, Nottke A, Lan F, Huarte M, Smolikov S, Chen Z, Spooner E, Li E, Zhang G, Colaiacovo M, Shi Y. Reversal of histone lysine trimethylation by the JMJD2 family of histone demethylases. *Cell* 125: 467–481, 2006.
- Wilson VL, Jones PA. DNA methylation decreases in aging but not in immortal cells. *Science Jun* 3; 220: 1055–1057, 1983.
- Wilson VL, Smith RA, Ma S, Cutler RG (1987) Genomic 5-methyldeoxycytidine decreases with age. *J. Biol. Chem.* 262, 9948–9951.
- Wolf I, Levanon-Cohen S, Bose S, Ligumsky H, Sredni B, Kanety H, Kuro-o M, Karlan B, Kaufman B, Koeffler HP, Rubinek T. Klotho: a tumor suppressor and a modulator of the IGF-1 and FGF pathways in human breast cancer. *Oncogene.* 2008; 27:7094-7105.
- Workman JL, Kingston RE. Alteration of nucleosome structure as a mechanism of transcriptional regulation. *Annu Rev Biochem* 67: 545– 579, 1998.
- Wree A, Kahraman A, Gerken G, Canbay A. Obesity affects the liver—the link between adipocytes and hepatocytes. *Digestion.* 2011; 83: 124–133. [PubMed: 21042023]

- Wu SC, Zhang Y. Active DNA demethylation: Many roads lead to Rome. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2010; Sep; 11:607-20.
- Xu X, DNA methylation and cognitive aging, *Oncotarget*, 2015 Vol. 6, No. 16, www.impactjournals.com/oncotarget/
- Yamagishi T, et al. Troglitazone improves endothelial function and augments renal Klotho mRNA expression in Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) rats with multiple atherogenic risk factors. *Hypertens. Res.* 2001; 24:705–709. [PubMed: 11768731]
- Yamamoto K, Imakiire A, Miyagawa N, Kasahara T. A report of two cases of Werner's syndrome and review of the literature. *J Orthop Surg* 2003;11: 224-33.
- Yahyaoğlu Recai, Yaşlanma ve Zaman Algısı Yüksek Lisans tezi 2013 T.C.İstanbul Arel Üniversitesi Sosyal Bilimler Enstitüsü Psikoloji Ana Bilim Dalı
- Yamane K, Toumazou C, Tsukada Y, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Wong J, Zhang Y. JHDM2A, a JmjC-containing H3K9 demethylase, facilitates transcription activation by androgen receptor. *Cell* 125: 483–495, 2006.
- Yamaza T, et al. Mesenchymal stem cell-mediated ectopic hematopoiesis alleviates aging-related phenotype in immunocompromised mice. *Blood.* 2009; 113:2595–2604. [PubMed: 19074727]
- Yang Y, Fu W, Chen J, Olashaw N, Zhang X, Nicosia SV, et al. SIRT1 sumoylation regulates its deacetylase activity and cellular response to genotoxic stress. *Nat Cell Biol* 2007; 9(11):1253- 1262.
- Yılmaz, *Drosophila melanogaster*'de Anasal Yaşın Yavru Döl Ömür Uzunluğu Üzerine Etkileri, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi, (2006) Ankara.
- Yoon YS, Park HS, Yun KE, Kim SB. Obesity and metabolic syndrome-related chronic kidney disease in nondiabetic, nonhypertensive adults. *Metabolism.* 2009; 58:1737–1742. [PubMed: 19615700]
- Yoshida K, Sugino T, Tahara H, et al. Telomerase activity in bladder carcinoma and its implication for noninvasive diagnosis by detection of exfoliated cancer cells in urine. *Cancer* 1997; 79:362-9.
- Zainal TA, Oberley TD, Allison DB, Szweda LI, Weindruch R. Caloric restriction of rhesus monkeys lowers oxidative damage in skeletal muscle. *FASEB J* 2000;14:1825-36.
- Zhang H, et al. Klotho is a target gene of PPAR- γ . *Kidney Int.* 2008; 74:732–739. [PubMed: 18547997]
- Zhang H, Li Y, Fan Y, Wu J, Zhao B, Guan Y, Chien S, Wang N. Klotho is a target gene of PPAR- γ . *Kidney Int.* 2008;74:732-739.
- Zhang R, Zheng F. PPAR- γ and aging: one link through Klotho? *Kidney Int.* 2008; 74:702–704. [PubMed: 18756295]
- Zhang Y, Reinberg D. Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone tails. *Genes Dev* 15: 2343–2360, 2001.
- Zheng P-S, Iwasaka T, Yamasaki F, et al. Telomerase activity in gynecologic tumors. *Gynecologic Oncology* 1997; 64:171-5.
- Ziller MJ, Gu H, McEuler F, Donaghey J, Tsai LTY, Kohlbacher O, De Jager PL, Rosen ED, Bennett DA, Bernstein BE, Gnirke A, Meissner A (2013) Charting a dynamic DNA methylation landscape of the human genome. *Nature* 500, 477–481.

8. EKLER

Ek A. Etik Kurul Kararı

T.C.
NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ MERAM TIP FAKÜLTESİ
İLAÇ VE TIBBİ CİHAZ DIŞI ARAŞTIRMALAR ETİK KURUL KARARI

Toplantı Sayısı:65

Toplantı Tarihi: 16.03.2018

Karar Sayısı:2018/1279:Fakültemiz Temel Tıp Bilimleri Bölümü Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim üyesi Prof. Dr. Mehmet GÜRBİLEK' in "Klotho Geninin Metilasyon Düzeyi İle Beslenme Alışkanlığı Arasındaki İlişisinin Araştırılması" başlıklı yüksek lisans tez çalışması ile ilgili 14.03.2018 tarihli düzeltme dilekçesi ve ekleri görüşüldü, Esra KARATAŞ' ın yüksek lisans tez çalışmasının Fakültemiz Temel Tıp Bilimleri Bölümü Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim üyesi Prof. Dr. Mehmet GÜRBİLEK' in sorumluluğunda bütçe desteğinin sağlandığına dair belgenin İlaç ve Tıbbi Cihaz Dışı Araştırmalar Etik Kuruluna sunulduktan sonra çalışmanın başlamasının uygun olduğuna oybirliği ile karar verilmiştir.

Not: Çalışma ile ilgili gerekli izin ve yasal sorumluluk araştırmacılara aittir.

Sorumlu Araştırmacı: Prof. Dr. Mehmet GÜRBİLEK

Yardımcı Araştırmacı: Esra KARATAŞ

ASLI GİBİDİR
16.03.2018

Prof. Dr. Saim AÇIKGÖZOĞLU
İlaç ve Tıbbi Cihaz Dışı Araştırmalar Etik Kurul Başkanı

GÖNÜLLÜ ONAM FORMU

Yaşlanma, zaman içerisinde canlımın çevre ile olan ilişkilerinde dengelerinin çevre lehine sonuçlandığı bir süreçtir. Yaşlanma olayı ortalama belirli bir süreç içerisinde ilerlese de, çevresel ve kalıtsal faktörlere bağlı olarak kimi bireyler daha hızlı, kimi bireyler ise daha geç yaşlanır. İnsanlar için yaşlanma sürecini etkileyen çevresel faktörlerin başında beslenme alışkanlığı gelmektedir. Genetik faktörler ise oldukça karmaşıktır. Genetik faktörler insan ömrünü yaklaşık %25 oranında etkileyebilmektedir. Bu da 60 yıl olan minimal yaşam limitinin 75 yıla çıkması anlamına gelmektedir. Araştırma sonuçları Klotho geninin, memelilerde yaşlılık sürecinde ve yaşlanma ile ilgili hastalıklarda önemli rol oynadığını göstermiştir. Klotho proteini seviyesi azalması ile yaşlılık benzeri fenotipler ortaya çıkar. Klotho geninin fazla eksprese edilmesi ile yaşam süreci %20-30 oranına artmaktadır. Klotho proteininin fazla miktarda sentez edilmesi anlamlı olarak oksidatif strese direnç kazandırarak yaşlanma sürecini yavaşlatmakta ve yaşam süresini uzatmaktadır. Biz bu çalışmamızda yaşam süresinin uzamasında etkili olan Klotho genini çalışacağız. Biz de bu amaçla "Klotho geninin metilasyon düzeyi ile beslenme alışkanlığı arasındaki ilişkisinin araştırılması" isimli çalışmayı planladık. Bizde bu amaçla sizden araştırmaya katılmanızı istiyoruz. Bu çalışmaya, karbonhidrat ağırlıklı beslenen bireyler ve protein ağırlıklı beslenen bireylerin dahil edilmesi düşünülmüştür. Siz de çalışmamız için uygun bir hastanız ve izniniz dahilinde çalışmamıza katılmanızı rica ediyoruz. Çalışmamızda, tanı anında biyokimyasal tahliller, besin tüketim sıklığı saptama formu verilerek size anket uygulanacaktır ve antropometrik ölçümlerinizi boy, kilo, bel, basen çevresi ölçümlerinizi alınacaktır, Kaliper ile koldan yağ kitlenizi tespit edilecektir. Bu işlemler girişimsel bir işlem değildir.

Çalışmadan çıkacak sonuçların beslenme alışkanlıklarına bağlı olarak Klotho geninin yaşlanmayla ilişkisi açısından faydalı bilgiler vereceğini ummaktayız.

Bu araştırmaya katılıp katılmama kararını vermeden önce, araştırmanın niçin yapıldığını, nasıl yapılacağını ve bu araştırmanın gönüllü katılımcılara getireceği olası faydaları bilmeniz gerekmektedir. Bu nedenle bu formun okunup anlaşılması büyük önem taşımaktadır. Aşağıdaki bilgileri dikkatlice okumak için zaman ayırınız. Eğer anlayamadığınız ve sizin için açık olmayan şeyler varsa, ya da daha fazla bilgi isterseniz bize sorunuz.

* Yapılacak çalışmanın size getireceği ek risk yoktur.

* Yapılacak muayene ve alınacak rutin kan için sizden herhangi bir masraf istenmeyecek, size bir ödeme yapılmayacaktır.

* Bu çalışmadan elde edilen bilgiler tamamen araştırma amacı ile kullanılacak ve kimlik bilgileriniz kesinlikle gizli tutulacaktır.

Araştırmaya katılmak tamamen gönüllülük esasına dayanmaktadır. Çalışmaya katılmama veya herhangi bir anda çalışmadan çıkma hakkına sahipsiniz. Her iki durumda da bir ceza veya hakkınız olan yararların kaybı kesinlikle söz konusu olmayacaktır.

Ben,, [gönüllümün adı,soyadı Kendi el yazısı ile] yukarıdaki metni okudum ve katılmam istenen çalışmanın kapsamını ve amacını, gönüllü olarak üzerime düşen sorumlulukları tamamen anladım. Çalışma hakkında soru sorma ve tartışma imkânı buldum ve tatmin edici yanıtlar aldım. Bana, çalışmanın muhtemel riskleri ve faydaları sözlü olarak da anlatıldı.

Bu koşullarda söz konusu Klinik Araştırmaya kendi rızamla, hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın katılmayı kabul ediyorum.

HASTA

Onam alımına şahitlik eden kişi

Araştırma Klinik Sorumlusu

Ad-Soyad:

Ad-Soyad:

Ad-Soyad:

Tarih:../../.....

Tarih:../../.....

Tarih:../../.....

İmza:

İmza:

İmza:

Ek C. Besin Tüketim Sıklığı Saptama Formu

BESİNLER	Her öğün	Her gün	Haftada 5-6	Haftada 3-4	Haftada 1-2	15 günde 1 / 1-3	Ayda bir	Seyrek	Hiç	Miktar g/cc
SÜT VE ÜRÜNLERİ										
Süt										
Tam süt (Dayanıklı-UHT)										
Tam süt (Pastörize)										
Tam süt (Sokak sütü)										
Yarım yağlı (%2 yağlı)										
Yağsız süt (Light-% 1 yağlı)										
Özel sütler (zenginleştirilmiş)										
Aromalı sütler										
Kefir										
Ayran										
Dondurma										
Yoğurt										
Tam yağlı										
Yarım yağlı										
Yağsız (light)										
Prebiyotik / probiyotik										
Peynir										
Tam yağlı										
Yarım yağlı										
Yağsız (light)										
Kaşar										
Krem peynir										
Tulum										
Çökelek (.....)*										
ET,YUMURTA, K.BAKLAGİL										
Kırmızı et										
Sığır										
Koyun										
Keçi										
Et Ürünleri (.....)*										
Sakatatlar (.....)*										
Tavuk										
Hindi										
Diğer kümes hayvanları										
At etleri										
Balık										
Yumurta										
Kurbaklagiller										
Yağlı tohumlar										

BESİNLER	Her öğün	Her gün	Haftada 5-6	Haftada 3-4	Haftada 1-2	15 günde 1 / 1-3	Ayda bir	Seyrek	Hiç	Miktar g/cc
TAZE SEBZE-MEYVE										
Yeşil yapraklı sebzeler										
Patates										
Kuru soğan										
Domates										
Diğer sebzeler										
Turunçgiller										
Kavun, karpuz										
Diğer meyveler										
Kuru meyveler										
EKMEK-TAHILLAR										
Beyaz ekme ve türleri										
Kepekli ekme ve türleri										
Diğer (.....)*										
Bazlama										
Yufka										
Pirinç										
Bulgur										
Makarna, erişte vb.										
Buğday unu										
Börek										
Kurabiye										
Kahvaltılık tahıl ürünleri (cornflakes vb.)										
Cips vb.										
İÇECEKLER										
Hazır meyve suları										
Kolalı içecekler										
Normal										
Light gazozlar										
Maden suları										
Kahve										
Çay										
Bitki çayları (.....)*										
Bira										
Şarap										
Rakı										
Viski, cin vb.										
Diğer (.....)*										

BESİNLER	Her öğün	Her gün	Haftada 5-6	Haftada 3-4	Haftada 1-2	15 günde 1 / 1-3	Ayda bir	Seyrek	Hiç	Miktar g/cc
YAĞ, ŞEKER, TATLI										
Zeytin yağı										
Diğer sıvı yağ (.....)*										
Margarin										
Yumuşak margarin(kase)										
Tereyağ										
Şeker										
Şekerleme, Lokum										
Çikolata										
Bal										
Reçel										
Pekmez										
Hazır Besinler										
Hazır Çorba										
DİĞERLERİ										
Hazır sebze yemeği										
Hazır köfte										
Hazır börek										
Hazır sarma										
Hazır salata										
Hazır meze										
Hazır pasta										
Dondurulmuş besin										
Pide, lahmacun										
Diğer (.....)*										
Hamur işi tatlılar										
Sütlü tatlılar										

* (.....) En çok ve en sık tüketilen besin çeşidi ve türü yazılmalıdır.

9. ÖZGEÇMİŞ

Konya'nın Selçuklu ilçesinde doğdum. Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü eğitimimi 2009-2013 tarihinde tamamladım. Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölüm'ünde eğitimime devam ederken Selçuk Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Çevre Mühendisliği Bölümü Çevre Teknolojisi Anabilim Dalı'nda yandal eğitimimi 2012-2014 tarihinde tamamladım. Eskişehir Anadolu Üniversitesi Eğitim Fakültesinde Pedagojik Formasyon eğitimimi 2014 tarihinde tamamladım. 2014 yılında Necmettin Erbakan Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimime başladım ve halen devam etmekteyim.