



T.C.

İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

**HİPPO YOLAĞININ AKSOLOTL KOL YENİLENMESİNDEKİ
ROLÜ**

SADIK BAY

BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Prof. Dr. Neslin EMEKLİ

İSTANBUL 2021

TEZ ONAYI

TEZ ONAY FORMU

Kurum : İstanbul Medipol Üniversitesi
Programın Seviyesi : Yüksek Lisans () Doktora (X)
Anabilim Dalı : Tıbbi Biyokimya
Tez Sahibi : Sadık BAY
Tez Başlığı : Hippo Yolağının Aksotl Kol Yenilenmesindeki Rolü
Sınav Yeri : İstanbul Medipol Üniversitesi Güney Yerleşkesi
Sınav Tarihi : 21.05.2021

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve nitelik yönünden Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman

Prof.Dr. Neslin EMEKLİ

Kurumu

İstanbul Medipol Üniversitesi

İmza

Sınav Jüri Üyeleri

Prof.Dr. Türkan YİĞİTBAŞI

İstanbul Medipol Üniversitesi

Doç. Dr. Sultan Sibel ERDEM

İstanbul Medipol Üniversitesi

Prof.Dr.Tuğba TUNALI AKBAY

Marmara Üniversitesi

Prof.Dr. Bedia ÇAKMAKOĞLU

İstanbul Üniversitesi

Yukarıdaki jüri kararıyla kabul edilen bu Doktora Tezi, Enstitü Yönetim Kurulu'nun/...../ tarih ve/..... - sayılı kararı ile şekil yönünden Tez Yazım Kılavuzuna uygun olduğu onaylanmıştır.

Prof.Dr. Neslin EMEKLİ

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdür Vekili

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

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

SADIK BAY

İTHAF

‘Şol gökleri kaldıranın,

Donatarak dolduranın,

Ol deyince olduranın,

Doksan dokuz adıyla...’

Bu tez çalışmasını, kendi çocuklarıma ve bütün çocuklara ithaf ediyorum.



TEŞEKKÜR

Bütün teşekkürlerin, minnettarlıkların, şükranların asıl sahibine, bütün bilgilerin asıl kaynağının sahibine ve O'nun en sevdiğine layık olmak dileğiyle...

Biyokimyayı bizlere sevdiren, her makul isteklerimizi yerine getirmeye çalışan, bilimle yatıp bilimle kalkan, tez çalışmamda bana her türlü imkanı sunan ve en önemlisi bizi insan yapan değerleri bize her seferinde hatırlatan kıymetli danışmanım Prof. Dr. Neslin EMEKLİ'ye; gerek ders dönemimizde gerek yeterlilik dönemimizde bizlere biyokimyayı daha fazla özümseten, bizlere sosyal bir varlık olduğumuzu hatırlatan, araştırmayı bize sevdiren, kendisine hep minnettar kalacağım sayın hocam Prof. Dr. Türkan YİĞİTBAŞI'na; yeterlilik jürimde ve tez izleme komitelerimde bana her türlü desteği sağlayan Prof. Dr. Bedia ÇAKMAKOĞLU'na; gerek proje sürecinde gerek tez sürecinde ve aksolotl çalışmalarımda bana öncülük eden ve projeme danışman olan sayın hocam Doç. Dr. Turan DEMİRCAN'a; kendisiyle bir çok ortak çalışma yaptığımız, akademik anlamda bana bir çok katkı sağlayan, tez şartlarımı sağlamamda bana destek veren hocam Dr. Öğr. Üye Nihal KARAKAŞ'a; akademik, insanı ve daha sayamayacağım bir çok alanda bana destek olan, kendisinin ebedi ve ezeli asistanı olmak istediğim, akademiye öğrendiğim çoğu bilgiye ve tecrübeye vesile olan, bizlere her anımızda destek olmaya çalışan pek kıymetli hocam Prof. Dr. Gürkan ÖZTÜRK'e sonsuz teşekkür ederim.

Hayvan tedariginde bizlere desteğini hiçbir zaman esirgemeyen Ali ŞENBAHÇE'ye ve MEDİTAM ekibine; tez çalışmamda bana çok yardımları dokunan Pelin TUĞLU'ya ve Sultan GÜL'e; Proteomiks konusunda beraber çalıştığımız Ecem YELKENCİ'ye, Elif ÖZBAY'a ve Mustafa Çağlar BEKER'e; SABİTA ekip arkadaşlarım (alfabetik sırayla) olan Ayşe Server SEZER'e, Cemil ÖZGÜL'e, Esra Nur YİĞİT'e, Gülsena BAYDAŞ'a, Mehmet Şerif AYDIN'a, Neşe AYŞİT'e, Olgu Enis TOK'a, Safiye SERDENGEÇTİ'ye, Sevginur BOSTAN'a, Şeyma ÇİMEN'e ve Tuba AKGÜL ÇAĞLAR'a; aynı ekipte olmasak da bana yardımları ve muhabbeti dokunan Emre VATANDAŞLAR'a; biyokimya ekibimiz (alfabetik sırayla) Çağrı ÇAKICI'ya, Feyza BAYRAMOĞLU'na, Ünsal Veli ÜSTÜNDAĞ'a ve Zeynep DOĞRU'ya; Bütün SABİTA ekibine teşekkür ederim.

Aynı anne babadan olmasak da kardeşlerim/dostlarım olan sayın Ozan TOPCU'ya ve Esad ESEOĞLU'na çok teşekkür ederim.

Zor zamanlarımda hep yanımda olan ve kendilerinden ebeden razı olduğum annem Neriman BAY'a, babam Bahtiyar BAY'a ve kardeşim Taha Emre BAY'a; hayatta nadir yaptığım doğrulardan biri olan ve bana hep sabreden kıymetli eşim Esmâ Nuray BAY'a; dünyadaki en kıymetli varlıklarım Muaz BAY'a ve Bera BAY'a (satırları yazdığım da henüz dünyaya gelmemiş olsa da) sonsuz sevgiler.

İsmi saymadığım, benim üzerimde emeği olan, ekmeğini yediğim suyunu içtiğim, vatan toprağımız için kendinden ödün veren, bizlere doğru yolu göstermeye çalışan herkese sonsuz teşekkürler...



İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	i
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANI	ii
İTHAF	iii
TEŞEKKÜR	iv
ŞEKİLLER VE RESİMLER LİSTESİ	ix
TABLolar LİSTESİ	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR	xiv
1. ÖZET	1
2. ABSTRACT	2
3. GİRİŞ VE AMAÇ	3
4. GENEL BİLGİLER	6
4.1. Hippo Sinyal Yolağı ve Moleküler Bileşenleri.....	6
4.1.1. YAP/TAZ Proteinlerinin Özellikleri.....	13
4.1.2. LATS 1/2 Proteinlerinin Özellikleri.....	18
4.2. Hippo Yolağı ve Rejenerasyon.....	20
4.3. Amfibilerde Hippo Yolağı.....	25
4.4. Rejenerasyon Yeteneğı Yüksek Bir Amfibi: Aksolotl.....	29
4.4.1. Aksolotl Hakkında Genel Bilgiler ve Uzun Hasarı Sonrası Blastema Oluşumu.....	29
4.4.2. Aksolotlda Metamorfoz.....	38
4.4.3. Aksolotlda Gen İnhibisyon Sistemleri.....	40
5. YÖNTEM VE GEREÇLER	44
5.1. Malzemeler.....	45
5.2. Cihazlar.....	48
5.3. Metamorfoz.....	48
5.4. Kol hasarı.....	49
5.5. Morfolino Dizaynı.....	49

5.6. Elektroporasyon.....	50
5.7. RNA İzolasyonu ve komplementer DNA sentezi.....	51
5.8. Kantitatif Gerçek Zamanlı-Polimeraz Zincir Reaksiyonu (QRT-PCR).....	55
5.9. İmmünohistokimya.....	58
5.10. Western Blot.....	60
5.11. Proteomiks.....	63
5.12. Bilgisayarlı Tomografi.....	65
5.13. İstatistik.....	66
6. BULGULAR	67
6.1. Metamorfoz Süreci ve Kol Kesimi.....	67
6.2. Morfolino Dizilerinin Sentezi.....	68
6.3. Morfolinoların <i>in vivo</i> ve <i>in vitro</i> Elektroporasyon Etkinlik Kontrolleri.....	73
6.4. Morfolinoların İnhibisyonlarını Tespit Etmek İçin Yapılan Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu.....	74
6.5. Kol Kesiminden 7 Gün Sonra Yapılan Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu Sonuçları.....	76
6.6. Kol Kesiminden 10 Gün Sonra Yapılan Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu Ve İmmünohistokimya Sonuçları.....	77
6.7. YAP Ve LATS Morfolino Enjekte Edilen Neotonik Ve Metamorfik Hayvanlardaki Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu, İmmünohistokimya, Western Blot Ve Proteomiks Sonuçları.....	81
6.7.1. Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu.....	81
6.7.2. İmmünohistokimya.....	90
6.7.3. Aksolotl Blastema Dokusunda Western Blot Denemeleri.....	102
6.7.4. YAP ve LATS mRNA İnhibisyonlu Gruplarda Proteomiks Sonuçları.....	102
6.8. Uzun Dönem İnhibisyonlu Neotonik Hayvanların Kol Görüntüleri.....	114
7. TARTIŞMA VE SONUÇ	119
8. KAYNAKLAR	128

9. ETİK KURUL ONAYI	142
10. ÖZGEÇMİŞ	144



ŞEKİLLER VE RESİMLER LİSTESİ

Şekil 4.1.1. Hippo sinyal yolağının görevleri.....	7
Şekil 4.1.2. Hippo yolağının türler arasında (meyve sineği (A), mayalarda (B), iplik kurtlarında (C) ve memelilerde (D)) korunması.....	8
Şekil 4.1.3. LATS inaktif ve aktif olduğu durumdaki Hippo sinyal yolağının bileşenleri ve lokalizasyonları.....	10
Şekil 4.1.4. Hippo sinyal yolağının mekanik olaylar tarafından regülasyonu.....	11
Şekil 4.1.5. Hippo yolağının tüm bileşenleri, yolakta gerçekleşen moleküler olaylar ve bu yolağın diğer sinyal yolları ile ilişkileri.	13
Şekil 4.1.1.1. Hippo yolağındaki YAP/TAZ proteinlerinin düzenleyici alanları.....	14
Şekil 4.1.1.2. YAP ve TAZ proteinleri, hücre altı lokalizasyonunu ve aktivitesini etkileyen mekanik uyarıların şematik gösterimleri.....	17
Şekil 4.1.2.1. LATS1/2'nin bağlanma alanları ve protein etkileşimi haritası.....	19
Şekil 4.2.1. Doku rejenerasyonu ve rejeneratif tıpta Hippo sinyal yolağı.....	21
Şekil 4.2.2. YAP/TAZ aktivasyonunun farklı organlarda etkileri ve yararları.....	25
Şekil 4.3.1. Organ büyüklüğü kontrolü ve rejenerasyonu.....	26
Şekil 4.3.2. Afrika Pençeli Kurbağasında (<i>Xenopus laevis</i>) kol ve kuyruk yenilenmesinde Yap proteininin oldukça önemli roller bulunmaktadır.....	28
Şekil 4.4.1.1. Axolotl ekstremitte blastema gelişimi.....	32
Şekil 4.4.1.2. Blastema'daki konum bilgilerinin stabilizasyonu sinir sinyali ile kontrol edilmektedir.....	35
Şekil 4.4.1.3. Patern (desen) oluşturan grid hücreleri, desen takip eden hücrelerin davranışını yönlendirmektedir.....	36
Şekil 4.4.2.1. Amfibilerde hipotalamo–hipofiz–böbreklerarası bez eksenini (solda) ve hipotalamo–hipofiz–tiroidal eksenini (ortada) gösteren diyagram.....	39
Şekil 4.4.2.2. Üstteki resim metamorfoza uğramamış aksolotlda (neotenik Aksolotl) kol yenilenmesini gösterirken; alttaki resim metamorfoz sonrası kol yenilenmesini göstermektedir.....	40
Şekil 4.4.3.1. Morfolino oligonükleotitlerin yapısı ve morfolinoların mRNA bloklaması.....	42
Şekil 5.1. Tez çalışmasının tamamlanmasında izlenen yöntem.....	44
Şekil 5.8.1. Kantitatif Gerçek Zamanlı-Polimeraz Zincir Reaksiyonu için yapılan adımların akış diagramı.....	56
Şekil 6.2.1. YAP ve LATS morfolino için yapılan biyoinformatik self-dimer analizlerinin sonuçları.....	72
Şekil 6.4.1. YAP ve LATS morfolino enjeksiyonu sonrası KGZ-PZR sonuçları.....	76
Şekil 6.5.1. Kol kesimi sonrası 7. günde alınan blastema dokularında YAP ve LATS ifade seviyelerinin grafikte gösterimi.....	76
Şekil 6.6.1. Kol kesimi sonrası 10. günde alınan blastema dokularında YAP ve LATS ifade seviyelerinin grafikte gösterimi.....	78

Şekil 6.7.1.1. 10. Günde YAP ve LATS mRNA inhibisyonları yapılan neotonik ve metamorfik deney gruplarındaki 16. Gün YAP ifade profilleri.....	82
Şekil 6.7.1.2. 10. Günde YAP ve LATS mRNA inhibisyonları yapılan neotonik deney gruplarındaki 16. Gün YAP ifade profilleri.....	83
Şekil 6.7.1.3. 10. Günde YAP ve LATS mRNA inhibisyonları yapılan metamorfik deney gruplarındaki 16. Gün YAP ifade profilleri.....	83
Şekil 6.7.1.4. 10. Günde YAP ve LATS mRNA inhibisyonları yapılan neotonik ve metamorfik deney gruplarındaki 16. Gün LATS ifade profilleri.	87
Şekil 6.7.1.5. 10. Günde YAP ve LATS mRNA inhibisyonları yapılan neotonik deney gruplarındaki 16. Gün LATS ifade profilleri.	87
Şekil 6.7.1.6. 10. Günde YAP ve LATS mRNA inhibisyonları yapılan metamorfik deney gruplarındaki 16. Gün LATS ifade profilleri.....	87
Şekil 6.7.4.1. Neotonik YAP morfolino verilen grupta kontrol grubuna göre anlamlı artan biyolojik süreçler (BP), moleküler fonksiyonlar (MF) ve hücrel bileşenler (CC).....	104
Şekil 6.7.4.2. Neotonik YAP morfolino verilen grupta kontrol grubuna göre anlamlı azalan biyolojik süreçler (BP), moleküler fonksiyonlar (MF) ve hücrel bileşenler (CC).....	105
Şekil 6.7.4.3. Neotonik LATS morfolino verilen grupta kontrol grubuna göre anlamlı artan biyolojik süreçler (BP), moleküler fonksiyonlar (MF) ve hücrel bileşenler (CC).....	107
Şekil 6.7.4.4. Neotonik LATS morfolino verilen grupta kontrol grubuna göre anlamlı azalan biyolojik süreçler (BP), moleküler fonksiyonlar (MF) ve hücrel bileşenler (CC).....	108
Şekil 6.7.4.5. Metamorfik YAP morfolino verilen grupta kontrol grubuna göre anlamlı artan biyolojik süreçler (BP), moleküler fonksiyonlar (MF) ve hücrel bileşenler (CC).....	109
Şekil 6.7.4.6. Metamorfik YAP morfolino verilen grupta kontrol grubuna göre anlamlı azalan biyolojik süreçler (BP), moleküler fonksiyonlar (MF) ve hücrel bileşenler (CC).....	111
Şekil 6.7.4.7. Neotonik LATS morfolino verilen grupta kontrol grubuna göre anlamlı artan biyolojik süreçler (BP), moleküler fonksiyonlar (MF) ve hücrel bileşenler (CC).....	112
Şekil 6.7.4.8. Neotonik LATS morfolino verilen grupta kontrol grubuna göre anlamlı azalan biyolojik süreçler (BP), moleküler fonksiyonlar (MF) ve hücrel bileşenler (CC).....	113
Resim 6.1.1. Aksolotl metamorfozu.....	67
Resim 6.1.2. Neotonik hayvanlarda kol hasarı öncesi (A) ve kol hasarı sonrası (B). Kesilen bölge siyah daire ile gösterilmiştir.....	68
Resim 6.1.3. Metamorfik hayvanlarda kol hasarı öncesi (A) ve kol hasarı sonrası (B). Kesilen bölge siyah daire ile gösterilmiştir.....	68

Resim 6.3.1. Neotonik aksolotl blastemasına enjekte edilen EGFP plazmidin 0. 3. Ve 7. gün görüntüleri.....	73
Resim 6.3.2. HEK293T hücrelerinde EGFP plazmid görüntüleri.....	74
Resim 6.4.1. Üretilen cDNA'larda YAP, LATS, GAPDH ve E1f1 α genlerine ait jel görüntüsü.....	76
Resim 6.6.1. Neotonik ve metamorfik hayvanlardaki blastema dokularında yapılan PCNA boyamaları.....	79
Resim 6.6.2. Neotonik ve metamorfik hayvanlardaki blastema dokularında yapılan YAP boyamaları.....	79
Resim 6.6.3. Neotonik ve metamorfik hayvanlardaki blastema dokularında yapılan fosfo-YAP boyamaları.....	80
Resim 6.6.4. Neotonik ve metamorfik hayvanlardaki blastema dokularında yapılan fosfo-LATS boyamaları.....	80
Resim 6.7.2.1. Neotonik ve metamorfik hayvanlarda 16. Günde yapılan PCNA (çoğalan hücre belirteci) boyamaları.....	92
Resim 6.7.2.2. Neotonik ve metamorfik hayvanlarda 16. Günde yapılan YAP boyamaları.....	95
Resim 6.7.2.3. Neotonik ve metamorfik hayvanlarda 16. Günde yapılan fosfo-YAP boyamaları.....	98
Resim 6.7.2.4. Neotonik ve metamorfik hayvanlarda 16. Günde yapılan fosfo-LATS boyamaları.....	101
Resim 6.7.3. GAPDH ve PCNA antikorları kullanılarak yapılan western blot deney bantları.....	102
Resim 6.8.1. Neotonik hayvanlarda kol kesiminden sonra uzun dönem aydınlık alan görüntüleri.....	115
Resim 6.8.2. Neotonik hayvanlarda kol kesiminden sonra 120. Gündeki tomografi görüntüleri.....	118

TABLolar LİSTESİ

Tablo 4.1.1.1. YAP/TAZ proteinlerinin aktivitesini kontrol eden; kinazlar, adaptör proteinleri ve miRNA'lar gibi çeşitli faktörlerin listesi.....	14
Tablo 4.1.1.2. YAP/TAZ proteinlerinin lokalizasyonunu ve aktivitesini kontrol eden transkripsiyon sonrası post-modifikasyonların listesi.....	15
Tablo 5.1. Tezde kullanılan deney grupları ve gruplarda yapılan teknik türleri	45
Tablo 5.1.1. Kullanılan sarf malzemeleri	45
Tablo 5.3.1. Holfreter's solüsyonunun hazırlanması için gerekli kimyasallar.....	49
Tablo 5.6.1. Elektroporasyon için uygulanan protokol. Literatürdeki mevcut elektroporasyon protokolü kullanılmıştır.....	50
Tablo 5.7.1. Deney gruplarında kullanılan RNA miktarları.....	54
Tablo 1.7.2. MyTaq DNA polimeraz kullanılarak yapılan Polimeraz zincir reaksiyonunda kullanılan karışım miktarları.....	55
Tablo 5.7.3. MyTaq DNA polimeraz kullanılarak yapılan Polimeraz zincir reaksiyonunda kullanılan ayarlar.....	55
Tablo 5.8.1. Örnek sulandırma katsayısı hazırlama tablosu.....	57
Tablo 5.8.2. Kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu için kullanılan malzemeler.....	57
Tablo 5.8.3. Kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu için kullanılan cihaz parametreleri.....	57
Tablo 5.9.1. Çalışmada kullanılan birincil ve ikincil antikörlerin isimleri katalog numaraları ve sulandırma katsayıları.....	58
Tablo 6.2.1. Aksolotl protein veri tabanından elde edilen YAP ve LATS protein sekansları.....	69
Tablo 6.2.2. Tezde inhibisyon için kullanılan YAP ve LATS proteinlerine karşı sentezlenmiş morfolino dizi bilgileri.....	70
Tablo 6.2.3. YAP morfolino için yapılan biyoinformatik analizlerin sonuçları.....	70
Tablo 6.2.4. LATS morfolino için yapılan biyoinformatik analizlerin sonuçları.....	71
Tablo 2.4.1. KGZ-PZR deneyleri için tasarlanan primer dizi bilgileri.....	74
Tablo 6.4.2. Morfolinoların mRNA düzeyindeki inhibisyonlarını tespit etmek için yapılan RNA izolasyonlarının konsantrasyon değerleri.....	75
Tablo 6.5.1. Kol kesimi sonrası 7. günde alınan blastema dokularında RNA izolasyonlarının konsantrasyon değerleri.....	77
Tablo 6.5.2. Kol kesimi sonrası 7. günde alınan blastema dokularında YAP ve LATS ifade seviyeleri.....	77
Tablo 6.6.1. Kol kesimi sonrası 10. günde alınan blastema dokularında RNA izolasyonlarının konsantrasyon değerleri.....	78
Tablo 6.6.2. Kol kesimi sonrası 10. günde alınan blastema dokularında YAP ve LATS ifade seviyeleri.....	78
Tablo 6.6.3. Neotonik ve metamorfik hayvanlarda kol kesiminden sonra 10. gün YAP, fosfo-YAP ve fosfo-LATS boyama sonuçları.....	81

Tablo 6.7.1.1. 10. Günde YAP ve LATS mRNA inhibisyonları yapılan (Morfolino (mo) enjeksiyonu yapılan)neotonik ve metamorfik deney gruplarındaki 16. Gün YAP ifade profillerinin istatistiksel olarak karşılaştırılması.....	83
Tablo 6.7.1.2. 10. Günde YAP ve LATS mRNA inhibisyonları yapılan neotonik ve metamorfik deney gruplarındaki 16. Gün YAP ifade profillerinin arasında istatistiksel olarak anlamlı fark çıkan gruplar ve anlamlılık derecesi.....	85
Tablo 6.7.1.3. 10. Günde YAP ve LATS mRNA inhibisyonları yapılan (Morfolino (mo) enjeksiyonu yapılan) neotonik ve metamorfik deney gruplarındaki 16. Gün LATS ifade profillerinin istatistiksel olarak karşılaştırılması.....	87
Tablo 6.7.1.4. 10. Günde YAP ve LATS mRNA inhibisyonları yapılan neotonik ve metamorfik deney gruplarındaki 16. Gün LATS ifade profillerinin arasında istatistiksel olarak anlamlı fark çıkan gruplar ve anlamlılık derecesi.....	90
Tablo 6.7.2.1. 16. Günde YAP proteinin neotonik ve metamorfik deney gruplarındaki (Kontrol, YAP Morfolino (MO) ve LATS MO) pozitiflik yüzdeleri.....	95
Tablo 6.7.2.2. 10. Günde YAP ve LATS mRNA inhibisyonları yapılan neotonik ve metamorfik deney gruplarındaki 16. Gün YAP protein boyamalarının arasında istatistiksel olarak anlamlı fark çıkan gruplar ve anlamlılık derecesi.....	95
Tablo 6.7.2.3. 16. Günde fosfo-YAP proteinin neotonik ve metamorfik deney gruplarındaki (Kontrol, YAP Morfolino (MO) ve LATS MO) pozitiflik yüzdeleri....	98
Tablo 6.7.2.4. 10. Günde YAP ve LATS mRNA inhibisyonları yapılan neotonik ve metamorfik deney gruplarındaki 16. Gün fosfo-YAP protein boyamalarının arasında istatistiksel olarak anlamlı fark çıkan gruplar ve anlamlılık derecesi.....	98
Tablo 6.7.2.5. 16. Günde fosfo-LATS proteinin neotonik ve metamorfik deney gruplarındaki (Kontrol, YAP Morfolino (MO) ve LATS MO) pozitiflik yüzdeleri.....	101
Tablo 6.7.2.6. 10. Günde YAP ve LATS mRNA inhibisyonları yapılan neotonik ve metamorfik deney gruplarındaki 16. Gün fosfo-LATS protein boyamalarının arasında istatistiksel olarak anlamlı fark çıkan gruplar ve anlamlılık derecesi.....	102

SİMGELER VE KISALTMALAR

YAP	: Yess assosiation protein
LATS	: Large Tumor Supressor Kinase
KGZ-PZR	: Kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu
GPCRs	: G-protein çift reseptörler
WNT	: Wingless/Ints
ALM	: Aksesuar uzuv modelinde (accessory limb model)
BMP	: Kemik morfogenetik proteinleri
EB	: Erken blastema
LB	: Geç blastema
TH	: Tiroid hormonları
TSH	: Tiroid stimüle edici hormon
HPT	: Hipotalamo-pineal-tiroid
MO	: Morfolino
PCNA	: Proliferating cell nuclear antigen- Çoğalma belirteci
PEI	: Polyethilenamine
FBS	: Fetal Bovine Serum
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle Medium
NFW	: Nuclease free water
PBS	: Fosfat Tampon Tuzu
PFA	: Paraformaldehid
PVDF	: Poliviniliden diflorid
RIPA	: Radyoimmünopresipitasyon Assay Tamponu
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat
TEMED	: N,N,N,N-tetrametiletildiamin
APS	: Ammonium persulfate

FASP	:Filter-aided sample preparation – Filtre-yardımlı örnek hazırlama
BP	: Biyolojik süreçler
MF	: Moleküler fonksiyonlar
CC	: Hücresel bileşenler
CCA	: Kolanjiyoma kanser hücreleri
SFK	: SRC kinaz ailesi



1. ÖZET

HİPPO YOLAĞININ AKSOLOTL KOL YENİLENMESİNDEKİ ROLÜ

Hippo yolağı farklılaşma, yenilenme, hücre göçü, organ büyümesi, apoptoz, hücre döngüsü gibi birçok hücresele olayda etkin rol oynamaktadır. Aksolotl canlılarda yenilenmeyi aydınlatmak için sık kullanılan bir modeldir. Bu çalışmada neotenik ve metamorfik aksolotlarda kol yenilenmesinde Hippo yolağında bulunan YAP ve LATS proteinlerinin durumu incelenmiştir. Çalışmada aksolotl kol yenilenmesinde metamorfik ve neotonik aksolotlarda kol hasarı yapılmış ve hasarın 10. gününde doku örnekleri toplanmıştır. Bu doku örneklerinde kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (KGZ-PZR) ve immunohistokimya yapılmıştır. Gen inhibisyonu yapılan grupta ise, metamorfik ve neotonik hayvanlarda kol hasarının 10. gününde morfolino sistemi kullanılarak YAP ve LATS proteinlerinin inhibisyonu incelenmiştir. 6 gün beklenildikten sonra dokular izole edilip: KGZ-PZR, immunohistokimya ve proteomik çalışması ile sonuçlar değerlendirilmiştir. Kol hasarının 10. gününde, neotonik hayvanlarda YAP mRNA miktarı metamorfik hayvanlara göre 72 kat fazlayken, neotonik hayvanlarda LATS mRNA miktarı metamorfik hayvanlara göre 87 kat fazla olmuştur. Bu değerler hasarın 16. gününde neotonik hayvanlarda YAP mRNA miktarı metamorfik hayvanlara göre 227 kat fazlayken, neotonik hayvanlarda LATS mRNA miktarı metamorfik hayvanlara göre çok daha fazla artış (849 kat) göstermiştir. İnhibisyon yapılan metamorfik hayvanlarda, inhibisyon sonrası YAP ve LATS miktarları kontrol grubuna göre artmıştır. İnhibisyon yapılan neotonik hayvanlarda LATS inhibisyonu sonrası YAP ve LATS mRNA miktarları kontrol grubuna göre azalırken, YAP inhibisyonu sonrası YAP ve LATS mRNA miktarları kontrol grubuna göre artmıştır. İmmunohistokimya sonuçları ise pozitif hücreler sayılarak elde edilmiştir. Yenilenme tamamlanınca bilgisayarlı tomografi kullanılarak kemik fotoğrafları çekilmiştir. Proteomiks sonuçlarına göre neotonik hayvanda YAP inhibisyonu sonrası yara iyileşmesi proteinleri anlamlı artış göstermiştir. Sonuç olarak Hippo yolağı aksolotl kol yenilenmesinde elzem yolaklardan biri olmaya adaydır.

Bu tez TÜBİTAK (1002 – 119Z976) tarafından desteklenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Aksolotl, Hippo Yolağı, Metamorfoz, Morfolino, Proteomiks

2. ABSTRACT

THE ROLE OF HIPPO PATHWAY IN AXOLOTL ARM REGENERATION

Axolotl is a unique model organism in terms of regeneration capacity. Considering the tasks of the Hippo pathway known in the literature, this pathway is expected to have an effective role in axolotl arm regeneration. Morpholino is mRNA inhibition system. It is one of the most frequently used techniques to illuminate regeneration in living things like axolotl. In this study, arm damage was performed for both metamorphic and neotenic axolotls. Tissue samples were collected on the 10th day after arm injury. Quantitative real-time Polymerase Chain Reaction (qRT-PCR) and immunohistochemistry were performed on these samples. In the gene-inhibited group, 10 days were waited after arm injury in metamorphic and neotenic animals, and inhibition of YAP and LATS proteins were performed on the 10th day using morpholino system. At 16 days after arm injury, tissues were isolated and qRT-PCR, immunohistochemistry and proteomics were performed. Yap decreased about 4 times and LATS decreased approximately 2 times in qRT-PCR analysis that shows the effectiveness of morpholino. On the 10th day after arm cut, while the amount of YAP mRNA in neotenic animals was 72 times higher than metamorphic animals; the amount of LATS mRNA in neotenic animals is 87 times higher than in metamorphic animals. These rates are on the 16th day; while the amount of YAP mRNA in neotenic animals was 227 times higher than metamorphic animals; the amount of LATS mRNA in neotenic animals is 849 times higher than in metamorphic animals. In inhibited neotenic animals, after LATS inhibition, the amount of YAP and LATS mRNA decreased compared to the control group. After YAP inhibition, the amount of YAP and LATS mRNA increased compared to control group. Immunohistochemistry results were obtained by counting positive cells. After the regeneration was completed, bones were visualized using computed tomography. According to proteomics results wound healing proteins after YAP inhibition showed significant increase in neotonic animal. As a result, Hippo pathway is essential pathway in axolotl arm regeneration.

This thesis was supported by TUBITAK (1002 – 119Z976)

Key Words: Hippo Pathway, axolotl, metamorphosis, morpholino, proteomics

3. GİRİŞ VE AMAÇ

Rejeneratif tıp moleküler tedavi ile doğal rejeneratif/onarım mekanizmalarının uyarılması veya laboratuvarlarda kültürlenmiş doku ve kök/progenitor hücrelerin transplantasyonu gibi hasarlı dokuların veya organların fonksiyonel rejenerasyonunu destekleyen tıbbi yaklaşımları ifade eder (1). Embriyonik gelişim sırasında yüksek olan YAP/TAZ aktivitesi doğumdan sonra bazal seviyeye inmektedir. Doku hasarı sırasında YAP/TAZ aktivitesinde geçici bir yükselme meydana gelmektedir (2). Bu nedenle rejeneratif tıbbın moleküler tedavisine yaklaşımda Hippo yolu önemli taşımaktadır. Pek çok hücresel işlevde görev alan Hippo yolu ilk defa meyve sineklerinde (*Drosophila melanogaster*) tanımlanmıştır (3). Hippo sinyal yolu birçok canlıda embriyonik ve post embriyonik gelişim dönemlerdeki organ büyümesini kontrol etmektedir. Bu süreçte sinyali takip eden kısa sürede ilgili protein post translasyonel modifikasyonla fosforillenir bu değişimden sonra Yorkie proteini çekirdek dışına çıkar hücre çoğalmasını tetikler, apoptozu inhibe eder (4-6). Hippo yolu diğer sinyal yolları ile de yakından ilişkilidir (7).

Vücudun organ ve dokularını oluşturan, bölünebilen, rejenere olabilen farklılaşmamış hücrelerin genel adı olan blastema hücreleri embriyonal veya rejenere olan organ ve dokularda bulunurlar (8). Hippo yolunun aksotollardaki durumu metamorfoz geçirmemiş (neotonik) ve metamorfoz geçirmiş (metamorfik) durumlardadır. Aksotoll rejenerasyon kapasitesi açısından eşsiz bir model organizmadır (9). Hippo yolunun aksotoll kol yenilenmesinde etkin rolü olduğu düşünülmektedir. mRNA inhibisyon sistemi olan morfolino tekniği aksotoll gibi canlılarda yenilenmeyi aydınlatmak için sıkça kullanılan tekniklerden biridir (10, 11).

Son çalışmalarda memeli hücrelerinde yenilenmenin iyi anlaşılması için Hippo yoluna yönelik çalışmalara ağırlık verilmeye başlanmıştır (12). Bunların arasında mekanik sinyallerin iletilmesi, hücre hacminin ayarlanması, hücre döngüsü, hücre göçü, farklılaşması (nöron ve adiposit farklılaşması), hücre kaderi karar mekanizması, organ ve uzuv rejenerasyonu da Hippo yolunun görevleri arasında yer almaktadır (7, 13-15).

LATS proteinlerinin fosforilasyonu takiben YAP/TAZ regülasyonunda görülen en önemli mekanizmalardan biri olduğu düşünülmektedir. Çünkü LATS proteinlerinden yoksun hücrelerin çoğunda Hippo yolunun bilinen birçok düzenleyici sinyaline yanıt olarak YAP/TAZ fosforilasyonunu ortadan kaldırmaktadır. LATS proteinlerinin etkisinde fosforilasyon gibi post translasyonel modifikasyonun dışında başka düzenleyiciler de vardır, ubiquitinasyon bunlardan biridir. LATS ubiquitinasyonu stres yanıtı oluşumunda ve farklılaşmada rol oynamaktadır (16).

Metamorfoz sürecinde yenilenmenin azaldığı bilindiğinden, düşük yenilenme seviyesinde Hippo yolağında değişiklik olup olmadığı net olarak anlaşılmamıştır. Hippo yolu bir kinaz kaskadından oluşur ve kaskaddaki kinazları inhibe etmek için YAP/TAZ'ı aktive etmek ideal bir yaklaşım kabul edilmektedir (12). Çeşitli inhibitörlerin Hippo yolunda etkin olduğu bildirilmiştir (2, 17). Hippo yolağının rejenerasyonun anlaşılması gen tedavisi için önem taşımaktadır (18). Son çalışmalar siRNA (small interfering RNA) veya mikroRNA aracılığı ile gen tedavisi hedeflemektedir (19).

Deri organizmayı dış lezyonlardan koruyan en önemli organlarımızdan biridir. Epidermis cildin homeostazını korumak için sürekli yenilenmektedir. Epidermal doku yenilenmesi ve yara iyileşmesi epidermal kök hücrelerine bağlıdır (20). YAP erken embriyonik epidermal progenitörlerde yüksek oranda eksprese edilmektedir ve ağırlıklı olarak nükleusta lokalize olmaktadır. YAP proteini progenitörlerin proliferatif kapasitesi ve epiderminin gelişimi için gereklidir (21). Yüksek YAP aktivitesi epidermal progenitörlerin ve yara iyileşmesinin farklılaşmasını da etkiler. YAP'ın silinmesi hücre büyümesinin azalmasına, keratinosit farklılaşmasının inhibisyonuna ve yara iyileşmesinde gecikmeye yol açmaktadır (22).

Benzer bilgiler kalbin büyümesi fizyolojik ve patolojik büyümesi için de geçerlidir (2). Kalp büyümesi fetal hayatta kardiyomiyositlerin çoğalmasına bağlıdır. İkinci büyüme ise doğumdan kısa bir süre sonra, kardiyomiyositlerin çoğalmayı durdurması ve kalp büyüklüğünün temel olarak kardiyomiyositlerin büyüklüğü tarafından kontrol edilmesidir. Kardiyomiyosit kaybı kalp yetmezliğine yol açan önemli bir patojenik mekanizmadır. Kalp rejeneratif olmayan bir organ olarak kabul edilmesine rağmen son zamanlarda bazı çalışmalar kalbin sınırlı olarak rejenerasyon yapabildiğini

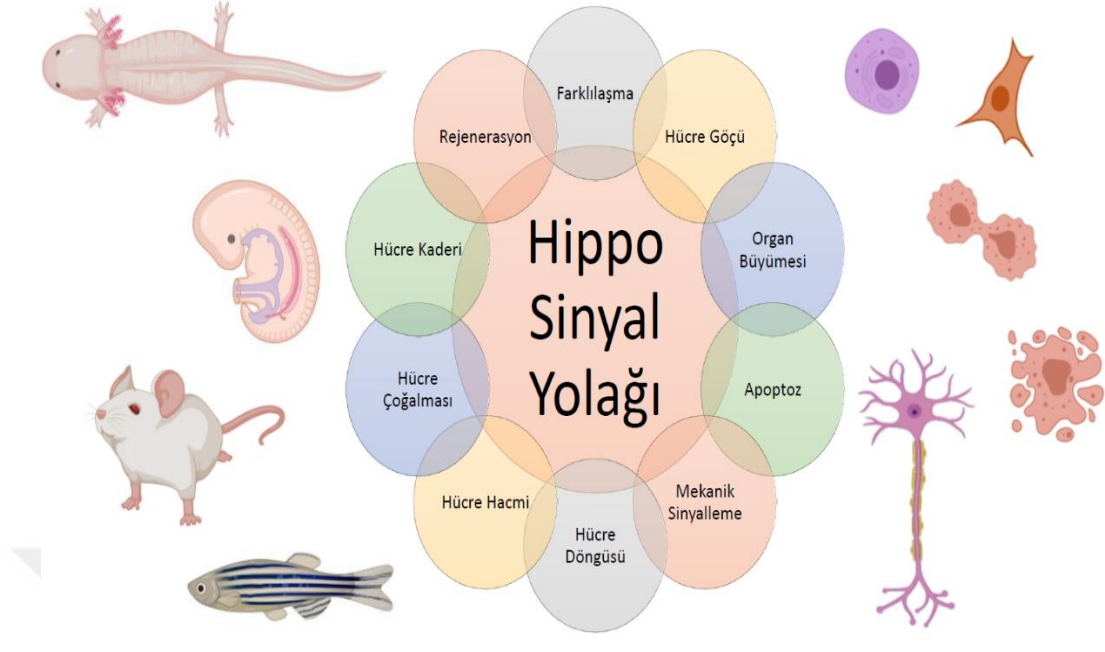
bildirmektedir (2). Son alışmalar YAP'ı yetişkinlerde kalp rejenerasyonunu teşvik etmek için aday protein olarak göstermektedir (7). YAP kardiyomiyosit apoptozunu azaltmak için IGF-1 ve Akt sinyalini uyarmaktadır. Ayrıca YAP, Fox O1 ve Pitx2 gibi kalpteki farklı transkripsiyonel faktörlere bağlanmaktadır ve de ayrıca antioksidan etki gösteren genlerin ekspresyonunu teşvik ederek kalbin korunmasını sağlamaktadır (2). Bunun gibi başka YAP'ın etkin olduğu çeşitli dokular örnek verilebilir.

Bu çalışmanın amacı neotenik ve metamorfik aksolotllarda kol yenilenmesinde Hippo yolağında bulunan fosfo -YAP ve fosfo-TAZ ve LATS proteinlerinin rollerinin belirlenmesidir. Kol hasarı sonrası YAP inhibisyonu yapılan neotenik aksolotlda yenilenme kapasitesindeki değişimleri görmek bu çalışmanın hipotezleri arasındadır. Ayrıca kol hasarı ve LATS inhibisyonu sonrası metamorfik aksolotlların orijinal kol yenilenmesindeki etki incelenecektir. Metamorfik aksolotlda fosfo-YAP ifadesinin neotenik aksolotldakine göre değişiminin incelenmesi yine çalışmamızın hipotezlerinden biridir. Araştırmamızda kullanacağımız teknikler bu amaçlarımıza yöneliktir.

4.GENEL BİLGİLER

4.1. Hippo Sinyal Yolağı ve Moleküler Bileşenleri

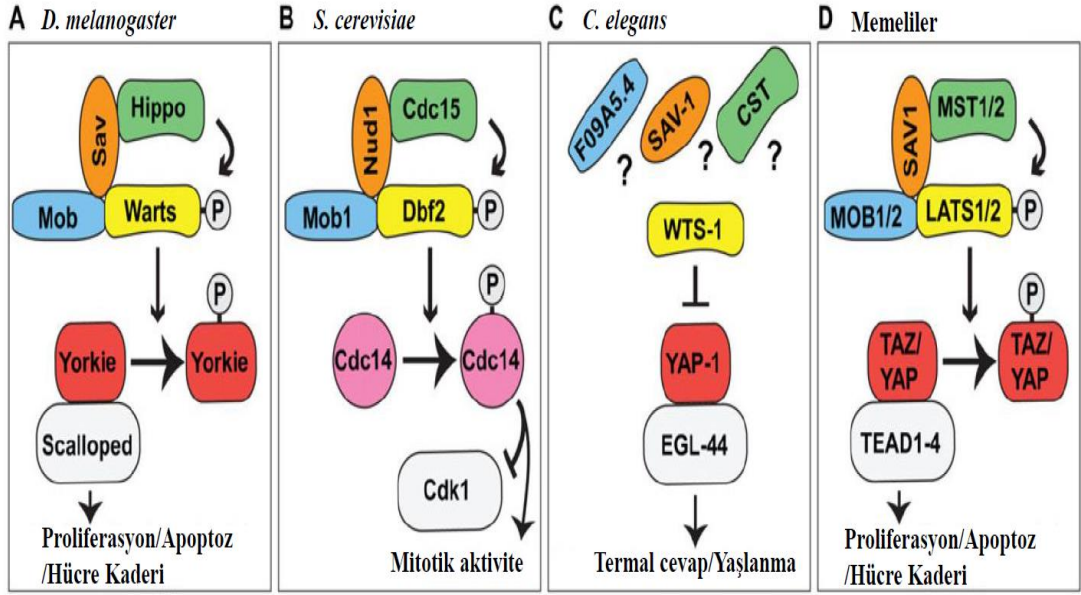
Hippo yolağı ilk olarak meyve sineklerinde (*Drosophila melanogaster*) tanımlanmıştır. Son çalışmaların odak noktaları memeli hücrelerinde bu yolağın fonksiyonlarına ve düzenlenmesine yönelmiştir. Bu yolakta birçok yeni düzenleyici mekanizma aydınlatılmaya çalışılmaktadır (3). Hippo sinyal yolağı, birçok canlıda, embriyonik ve post embriyonik gelişim dönemlerdeki organ büyümesini kontrol etmektedir. Bu yolak, diğer sinyal yolakları ile de yakından ilişkilidir (7). Hippo yolağı, organ büyümesi, hücre çoğalması ve apoptozun yanı sıra hücresel birçok olayda görev almaktadır. Bunların arasında; mekanik sinyallerin iletilmesi, Hücre hacminin ayarlanması, hücre döngüsü, hücre göçü, farklılaşma (nöron ve adiposit farklılaşması) hücre kaderi karar mekanizması, organ ve uzuv rejenerasyonu bulunmaktadır (7, 13-15). Hippo sinyal yolağının temel görevleri **Şekil 4.1.1**'de şematize edilmiştir. Uygun büyüklükteki doku ve organların oluşumunda hücre çoğalması, apoptoz ve farklılaşmanın koordineli ve dengeli olması gerekmektedir. Ayrıca hücre dışı değişikliklerle hücre iskeleti elemanlarındaki değişikliklerin de entegre olması da uygun büyüklüğün sağlanmasında önemli faktörlerdendir. Bu süreçleri de Hippo sinyal yolağının yönetiyor olması son dönemdeki çalışmalar ile birlikte bu yolağın önemini ortaya koymaktadır (12). Hippo sinyal yolağında görevli en önemli iki protein YAP (Yes-associated protein; YAP1) ve TAZ (transcriptional co-activator with a PDZ-binding domain; WW domain containing transcription regulator 1 ya da WWTR1) proteinleridir. Bu proteinlerin düzenleyici mekanizmaları, hücre iskeleti dinamiğini etkileyen hücre dışı uyarımlarla ilişkilendirilmektedir (23).



Şekil 4.1.1. Hippo sinyal yolağının görevlerinin şematik görüntüsü.

Hippo sinyal yolağı türler arasında korunmuş bir sinyal yolağıdır. Meyve sineklerinde aşırı büyümüş doku mutasyonlarının araştırılması sonucu korunmuş bir kinaz kaskadı tanımlanmıştır. Bu kaskatta Hippo kinaz, Wartz kinaz ve onların adaptör proteinleri olan Salvador ve Mob proteinleri bulunmuştur (12). Sinyallemenin aktivasyonunda Wartz kinaz transkripsiyonel regülatör olan Yorkie proteinini fosforillemektedir. Sinyallemenin aktivasyonundan sonra Yorkie proteini hücre çekirdeğinin dışına göç etmektedir (24). Nüklear Yorkie hücre çoğalmasını tetiklemekte ve apoptozu inhibe etmektedir. Nüklear Yorkie proteini bu olaylarda bir transkripsiyon faktörü olarak görev yapan Scalloped proteini ile ilişkilidir (4-6). Nüklear Yorkie proteini Scalloped proteini ile birlikte transkripsiyonel baskılayıcıların etkisini inhibe etmektedir. Bu da bazı genlerin ekspresyonlarının aktifleşmesine sebep olmaktadır (25). Nüklear Yorkie proteininin kontrol dışı aktivitesi hücrenin çok büyümesini indüklemektedir. Yeni nesil tekniklerle, meyve sineklerinde, hücre adezyonu, hücre polarizasyonu ve aktin hücre iskeletinin regülasyonu gibi Hippo sinyal yolağının yeni görevleri ortaya çıkmaktadır (26, 27). Hippo yolağı memelilerde de birçok hücresel olayda rol almaktadır. Bu olaylara örnek olarak; ökaryotik mayalarda (*Saccharomyces cerevisiae*) hücre döngüsü rolü, iplik kurtlarında (*Caenorhabditis elegans*) termal direnç rolü ve memelilerde hücre kaderi kontrolü verilebilir (12). Memelilerdeki

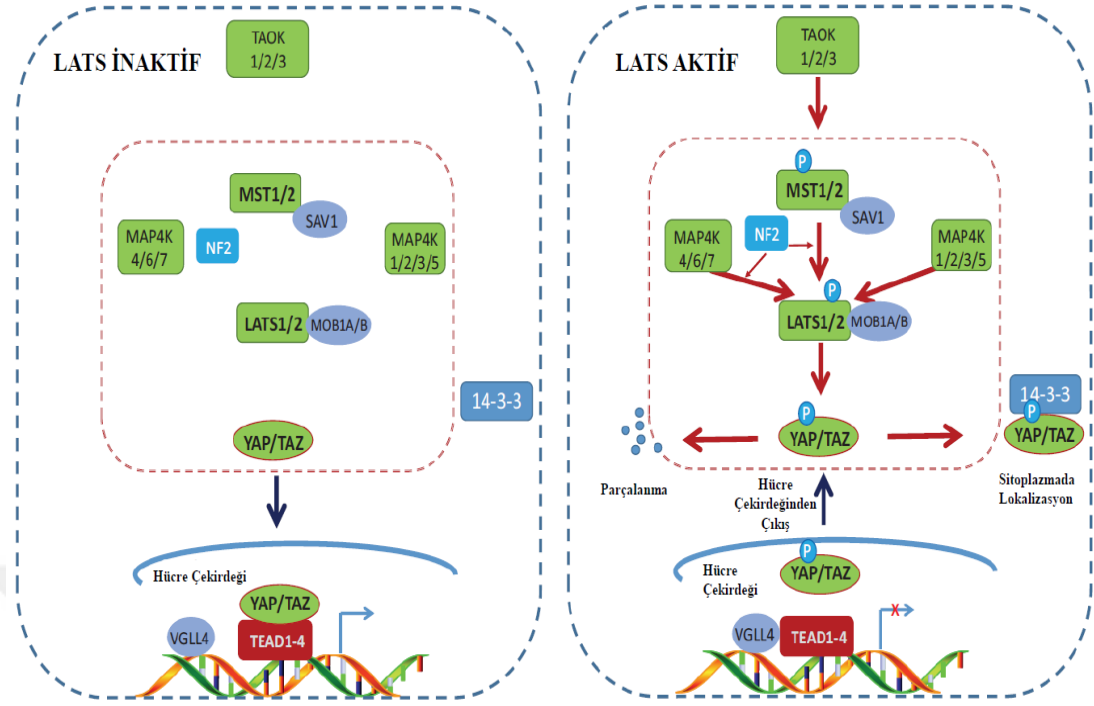
Hippo yolağı proteinleri, meyve sineklerinde ki proteinlere çok benzemektedir. Memelilerdeki YAP proteini, Yorike proteinin (meyve sineklerindeki) homologudur. YAP, memelilerde ilk olarak tanımlanan ikili triptofan rezidü içeren proteindir (28). TAZ proteini ise YAP proteininin paraloğudur. TAZ proteininin fosforilasyonu 14-3-3 proteinine bağlanmayı sağlar ve bu bağlanma ile proteinle sitoplazmada lokalize olurlar (29). Large tumor suppressor 1/2 kinaz (LATS 1 ve LATS 2) proteinlerinin fosforilasyonu da Hippo yolağı için kilit mekanizmalardan biridir. LATS 1 ve LATS 2 kinazlar da meyve sineklerindeki Warts kinazın homologudur. Mammalian Ste20-like (MST1 ve MST2) kinazlar (Meyve sineklerinde Hippo proteininin homologu), SAV1 (Meyve sineklerinde Salvador proteininin homologu) proteini ve MOB1A ve MOB1B (Meyve sineklerinde Mob proteininin homologu) korunmuş yolak proteinlerindedir. Türler arasında korunmuş bir sinyal yolağı olan Hippo sinyal yolağındaki proteinlerin fonksiyonellik ve adlandırma bakımından türler arasında ki karşılaştırmaları Şekil 4.1.2’de gösterilmiştir (12).



Şekil 4.1.2. Hippo yolağının türler arasında (meyve sineği (A), mayalarda (B), iplik kurtlarında (C) ve memelilerde (D)) korunması. Fonksiyonel olarak korunmuş faktörler aynı renkle gösterilmiştir. Yolak; mayalarda hücre bölünmesi, iplik kurtlarında termal cevabı ve yaşlanmayı, meyve sineklerinde ve memelilerde ise proliferasyon/apoptoz/hücre kaderi olaylarını idame ettirmektedir (12).

Memelilerde Hippo kinaz yolağı, MST1 ve MST2 proteinlerine fosfor bağlayan TAO kinazlar ile (TAO 1/2/3) başlar. Fosforlar MST1’e Treonine 183 ten bağlanırken;

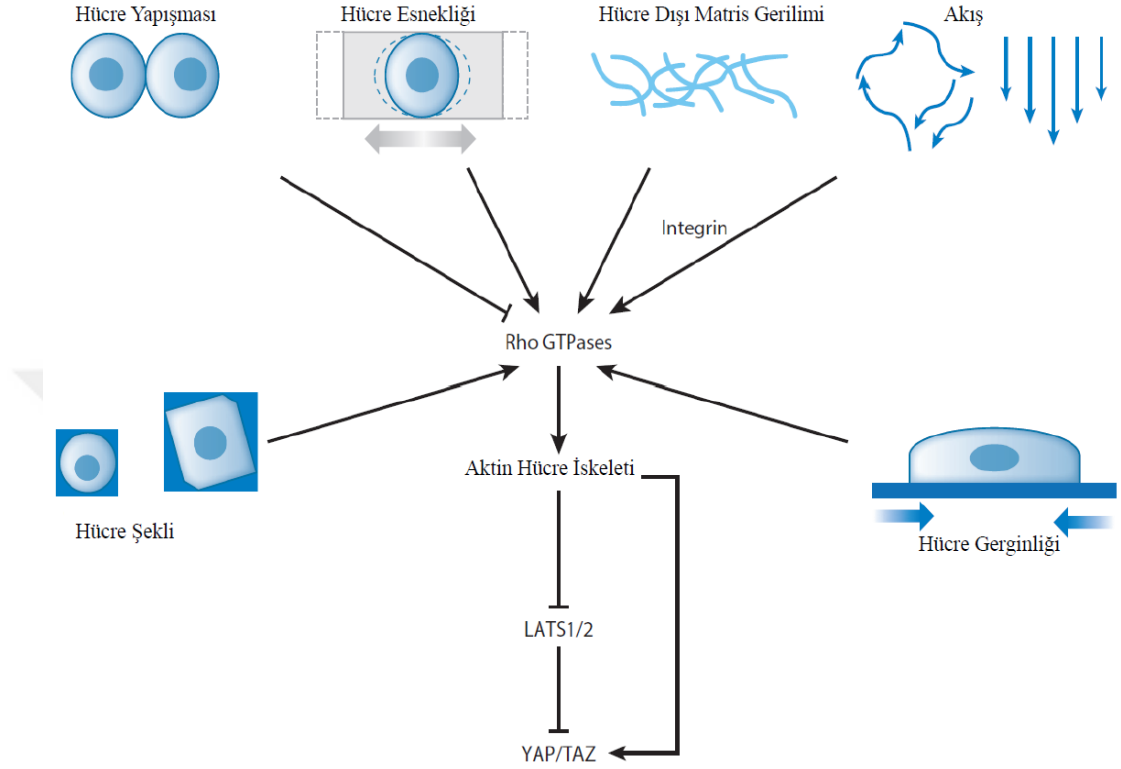
MST2'ye Treonine 180'den bağlanır. Bu bağlanmalar MST1 ve MST2 proteinlerini aktifleştirmektedir (30, 31). Aktif MST 1/2 proteinleri, SAV1 ve MOB1 A/B proteinlerini fosforlar (32, 33). Bu protein iskeletleri, LATS 1/2'nin fosforlanmasını sağlar (34, 35). NF2/Merlin proteinleri ise direkt olarak LATS 1/2 proteinleri ile etkileşim içindedirler ve MST 1/2-SAV1 kompleks proteinlerinin LATS 1/2 proteinlerinin fosforlanmasını sağlarlar (35). LATS 1/2 proteinleri otofosforilasyon yapar ve YAP ve TAZ proteinlerini fosforlayarak inaktif hale getirir (36). MST 1/2 proteinlerine paralel olarak, iki grup MAP4K proteinleri (MAP4K1/2/3/5 ve MAP4K4/6/7) de direkt olarak LATS 1/2 proteinlerini fosforlayabilir ve LATS 1/2 proteinlerini aktifleştirebilirler (16, 37). YAP ve TAZ proteinlerinin fosforlanması, bu proteinlerin 14-3-3 proteinine bağlanmasını sağlar ve bu bağlanma sonucunda YAP ve TAZ proteinleri sitoplazmayı terk eder (36). LATS proteinleri tarafından indüklenen YAP/TAZ fosforilasyonunu Casein kinaz 1 δ/ϵ tetikler ve bu tetikleme için SCF E3 ubiquitin ligaz gereklidir. SCF E3 ubiquitin ligaz, YAP ve TAZ proteinlerini ubiquitinleştirir ve degrade eder (38, 39). Buna ek olarak YAP proteini otofaji ile de degrade edilebilir (40). YAP ve TAZ proteinleri, transkripsiyonel ko-aktivatörlerdir. Bu proteinler hücre çekirdeğine girdiklerinde, TEAD1-4'e bağlanarak gen ekspresyonlarını düzenlerler. TEAD1-4, memelilerde, sekans-spesifik olarak Hippo yolağının transkripsiyonel olaylarını yönetmektedir (41). TEAD1-4 proteini hücre çekirdeğinde VGLL4'e bağlandığında transkripsiyonu baskılayıcı olarak görev yapmaktadır. YAP/TAZ ve TEAD1-4 proteinleri bağlandığında VGLL4 ve TEAD1-4 arasındaki bağlantı kopmakta ve TEAD-bağımlı gen transkripsiyonu aktif hale gelmektedir. Aktifleşen transkripsiyon ile doku büyümesi sağlanmaktadır ve apoptoz inhibe edilmektedir (25). LATS ve YAP/TAZ proteinleri Hippo yolağı için elzem proteinlerdir. LATS proteinlerinin aktif ve inaktif olduğu durumlarda Hippo sinyal yolağında bulunan proteinlerin durumu **Şekil 4.1.3**'te şematize edilmektedir (3).



Şekil 4.1.3. LATS inaktif ve aktif olduğu durumdaki Hippo sinyal yolğunun bileşenleri ve lokalizasyonları (3).

Hippo sinyal yolğunun aktivitesi, hücre membranındaki birçok sinyal yolu tarafından kontrol edilmektedir. Epidermal büyüme faktörü (EGF), transforme büyüme faktörü- β (TGF β) ya da WNT sinyal yolları gibi klasik sinyal iletim yollarının aksine; Hippo yolğunun özel reseptörlere ve hücre dışı ligandlara sahip olduğu görülmektedir. Hippo yolu, hücre yapışması, hücre morfolojisi ve hücre polaritesi gibi birçok fiziksel bileşenler tarafından düzenlenmektedir. Bu şekilde Hippo yolğunun aktivitesi, mekanik olaylara ve hücre-hücre ve hücre-hücre dışı matris (extracellular matrix-ECM) bağlantılarındaki değişikliklere veya kusurlara yanıt olarak modüle edilmektedir. Bu nedenle Hippo yolu, özel hücre dışı sinyal moleküllerine cevap vermek yerine dokusal ve hücre bütünlük için bir sensör oluşturur niteliktedir. Hücre dışı mekanik ortamın özellikleri Hippo yolu aktivitesinin düzenleyicilerindedir. Hücreler sert yüzeylerde büyüdüğünde veya sıvı stresine maruz kaldığında ortaya çıkan mekanik stresler, YAP/TAZ proteinlerinin hücre çekirdeğine translokasyonu tetiklenmektedir. Hücre-Hücre dışı matris yapışma alanlarındaki integrin kompleksleri, integrin sinyallemesine yanıt olarak aktin-miyozin hücre iskeletini değiştirmektedir (7). Hücre yapışması, hücre esnekliği, hücre

dışı matris gerginliği, hücre şekli, hücre dışı akış gibi birçok mekanik hücresel olay, LATS 1/2 ve YAP/TAZ proteinlerini Rho GTPase proteinleri üzerinden düzenlemektedir (Şekil 4.1.4) (42).

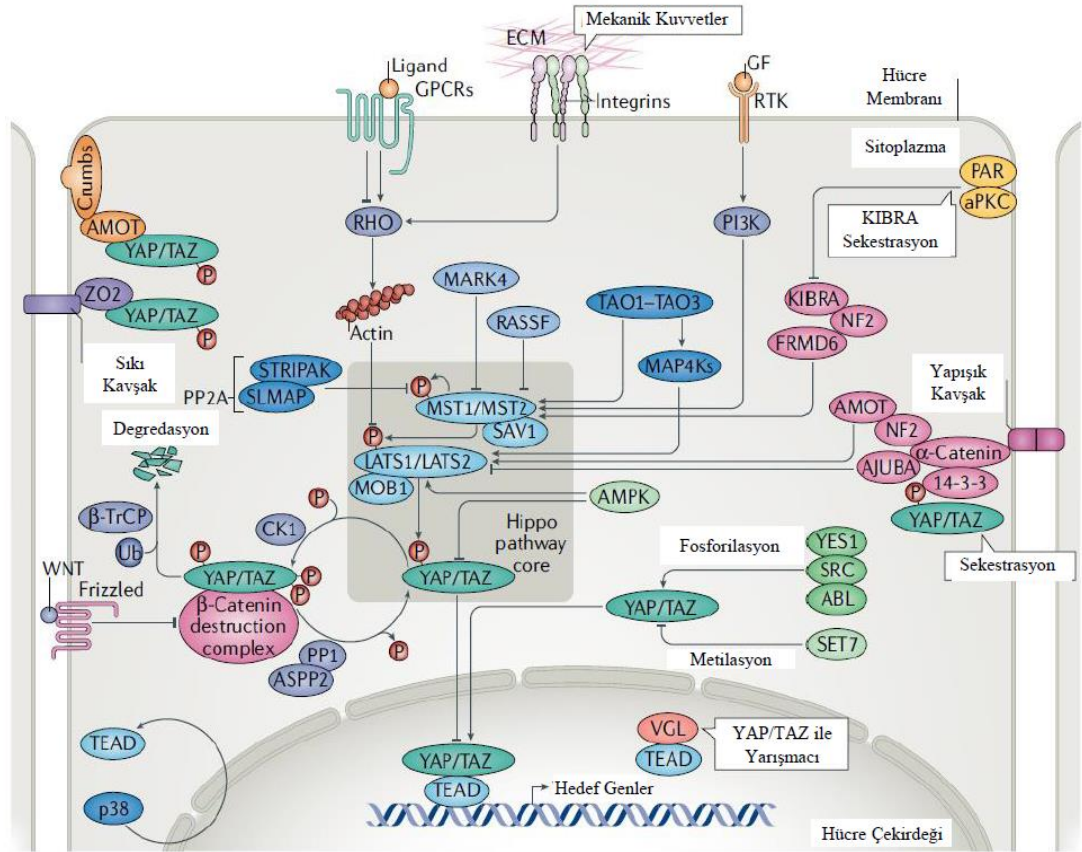


Şekil 4.1.4. Hippo sinyal yolağının mekanik olaylar tarafından regülasyonu. Hücre esnekliği, hücre dışı matris (ECM) gerginliği, hücre dışı akış, hücre şekli ve hücre gerginliği Rho GTPase proteinlerini aktive ederken; Hücre-hücre kontaktı Rho GTPase proteinlerini inhibe eder. Rho GTPase proteinleri, aktin proteinini aktive eder. Aktin ise LATS 1/2 proteinlerini; LATS 1/2 proteinleri de YAP/TAZ proteinlerini inhibe eder (42).

Hücre-hücre bağlantılarından yapışık kavşaklar (adherans junction) ve sıkı kavşaklar (tight junction), Hippo sinyal yolağının düzenlenmesinin ana merkezleridir. Bu hücre-hücre bileşimleri, Crumbs ve aPKC kompleksi gibi apikal-bazal hücre polaritesini oluşturan kompleksleri içermektedir. Hippo yolağı ile bu proteinlerin direk bağlantılarını; angiominin ailesi proteinlerini, E-cadherin ve onun adaptör proteini olan α -catenin ile 14-3-3 protein kompleksi, LIM proteinleri, NF2 proteini ve KIBRA proteini sağlamaktadır. Bu nedenle, hücre-hücre yapışmasının bozulması Hippo yolağının aktivitesi üzerinde güçlü etkilere sahip olabilmektedir (7).

Hippo sinyal yolağı, diğer sinyal yolakları ile de modüle edilmektedir. Bunlar G-protein çift reseptörler (G-protein coupled receptors(GPCRs)), WNT (Wingless/Ints) yolağı, SRC ailesi kinazlar, ABL kinaz ve PI3K yolağıdır. G-protein reseptörler, lipitler veya hormonlar tarafından aktive edilmektedir ve F-aktin üzerinden YAP/TAZ proteinlerinin aktivitesini düzenlemektedir. WNT yolağı, YAP/TAZ proteinlerini β -katenin (β -catenin) yıkım kompleksi ile doğrudan etkileşim halindedir ve yıkım kompleksinden bağımsız mekanizmalar yoluyla düzenlemektedir. SRC ailesi kinazlar ve ABL kinaz proteinleri, tirozin kalıntıları (residue) üzerinden YAP proteinini fosforile etmektedir ve YAP proteininin nükleer lokalizasyonunu sağlamaktadır (7). Bunlara ek olarak; kemik morfogenetik proteinleri (Bone morphogenetic proteins-BMPs) ile birlikte Notch ve Hedgehog (43) sinyal yolakları da YAP ve TAZ'ın aktivitelerini modüle etmektedir (44).

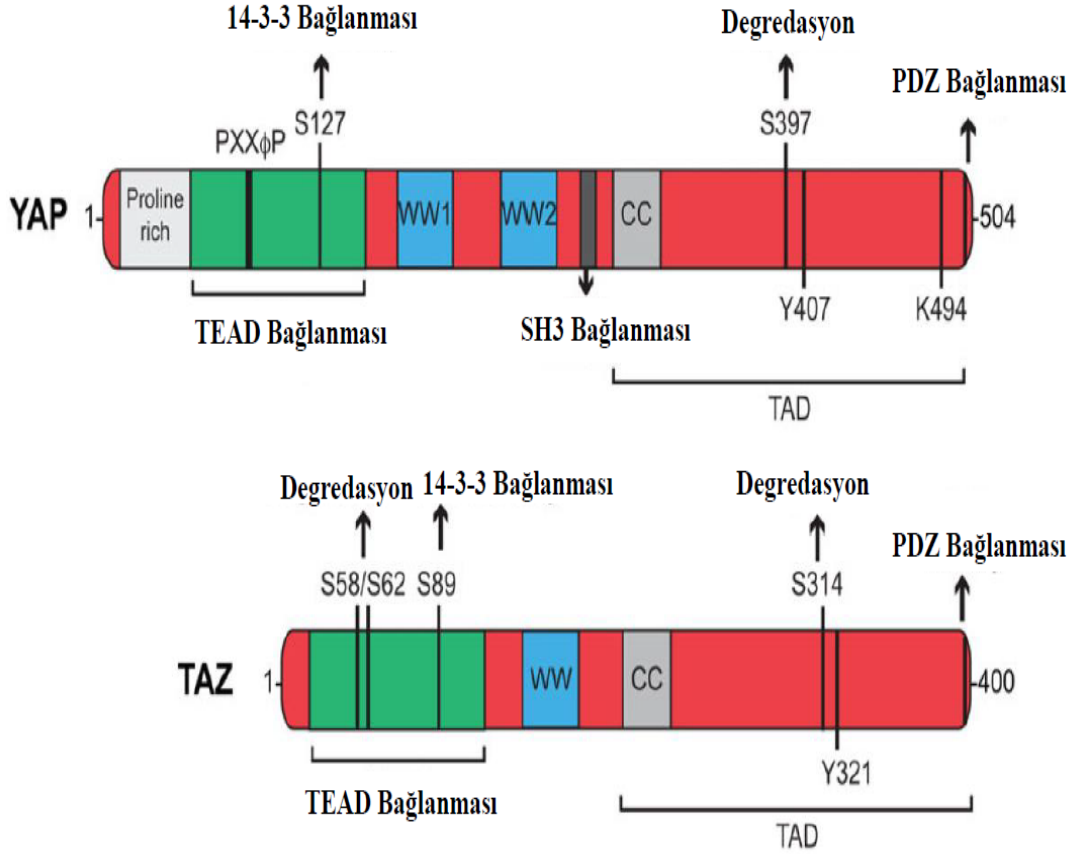
Özetle, Hippo yolağında kinazlar, transkripsiyon regülatörleri ve sinyal modülatörleri bulunmaktadır (45). Bu yolağın işlev gösteren son proteinleri, transkripsiyon regülatörleri olan Yap/Taz proteinleridir. Yap/Taz, Mst ve Lats proteinlerinin fosforilasyonu ile regüle edilmektedir. Fosforile Yap/Taz proteinleri sitoplazmada bulunmaktadır ve Yap/Taz proteinlerinin çekirdeğe transferi engellenmektedir. Fosforu kopartılan Yap/Taz proteinleri ise serbest hale gelmekte ve çekirdeğe göç edebilmektedir. Çekirdekte Tea DNA-bağlama bölgesine (Tead, Tea DNA-binding domain) bağlanarak hedef genlerin (örneğin Ctgf, Areg ve Survivin) transkripsiyonunu gerçekleştirmektedir. Stres durumunda ise Yap proteini p73 proteinine bağlanarak apoptozu indüklemektedir. Hücre bölünmesine ihtiyaç olmadığı durumlarda Yap/Taz, sitoplazmada tutularak hücre çoğalması engellenmektedir. Organizmanın hücre bölünmesine ihtiyaç duyduğu durumlarda ise Yap/Taz, çekirdeğe göç ederek hücre çoğalmasını artırmakta ve apoptozu azaltmaktadır (14). Hippo yolağındaki tüm bileşenler, yolakta gerçekleşen moleküler olaylar ve bu yolağın diğer sinyal yolakları ile ilişkileri **Şekil 4.1.5'**te özetlenmektedir (7).



Şekil 4.1.5.Hippo yolağının tüm bileşenleri, yolda gerçekleşen moleküler olaylar ve bu yolağın diğer sinyal yolları ile ilişkileri (7).

4.1.1. YAP/TAZ Proteinlerinin Özellikleri

TAZ/YAP proteinleri, omurgalılarda Hippo yolağı sinyallemesinin birincil efektör proteinleridir ve bu faktörler birçok düzenleyici özelliği ve yapısal alanı paylaşmaktadır. YAP/TAZ proteinlerinin düzenleyici alanları **Şekil 4.1.1.1**'da gösterilmektedir (12).



Şekil 4.1.1.1. Hippo yolağındaki YAP/TAZ proteinlerinin düzenleyici alanları. Öne çıkan alanlar arasında WW alanı (WW domain), coiled-coil alanı (coiled-coil domain), SH3-bağlanma alanı, TEAD transkripsiyon faktörü bağlanma alanı, transkripsiyonel aktivasyon alanı (transcriptional activation domain (TAD)) ve PDZ bağlanma motifi bulunmaktadır (12).

Kinazlar, adaptör proteinler ve miRNA'lar gibi çeşitli faktörler YAP/TAZ proteinlerinin aktivitesini kontrol etmektedir. Bu faktörlerin listesi **Tablo 4.1.1.1**'dedir (12).

Tablo 4.1.1.1. YAP/TAZ proteinlerinin aktivitesini kontrol eden; kinazlar, adaptör proteinler ve miRNA'lar gibi çeşitli faktörlerin listesi (12).

<p>Transkripsiyonel Düzenleyiciler</p> <p>ARC105 β-catenin MYC EGR1 GABP GLIS3 KLF5 MYOD NKX2.1 (TTF1) p53 p63 p73 PAX3/8 PML PPAR_γ RUNX1/2/3 SMAD1/2/3/4 TBX5 TEAD1/2/3/4 YBX1</p>	<p>Fosfoatazlar</p> <p>PP1 PP2A (STIPAK) PTPN14</p>	<p>G Protein Sinyallemesi</p> <p>Gα(12/13)-coupled receptors Gα(i/o)-coupled receptors Gα(q/11)-coupled receptors Gα(s)-coupled receptors</p>
<p>Kinazlar</p> <p>ABL1 AKT1 ATM CDK1 CK1_{α/δ} ERBB4 GSK3_β HIPK2 JNK1/2 LATS1/2 LKB1 MEK1 (MAP2K1) MARK1/2/3/4 MST1/2 NDR1/2 NEK1 PI3K PKA PKC_{α/ζ} ROCK1/2 SRC TAOK1 YES1</p>	<p>Adaptör Proteinler</p> <p>14-3-3 α-catenin AJUBA AMOT/AMOTL1/ AMOTL2 ASPP1/2 BMI1 CD44 CRB3 CTLA4 (CD152) DCHS1 E-cadherin CFL1/2 CFL1/2 FAT4 FRMD4A/6 GPC3 HSP90 IQGAP LFR LMD1 LN7C MASK1/2 MOB1A/B MPDZ NCK1/2 NF2 (Merlin) NHERF1/2 NPHP4 PALS1 PAR6B PATJ PKD2 RASSF1-6 SAV1 (WW45) SCRIB SHP2 SMAD7 TRIB2 WBP1/2 WTIP WWC1 (Kibra) ZO-1/2</p>	<p>Mikro RNA'lar</p> <p>miR-31 (<i>Lats2</i>) miR-93 (<i>Lats2</i>) miR-133b (<i>Mst2</i>) miR-135b (<i>Lats2</i>) miR-138 (<i>Mst1</i>) miR-141 (<i>Yap</i>) miR-195 (<i>Lats2</i>) miR-200a (<i>Yap</i>) miR-302a (<i>Lats2</i>) miR-372 (<i>Lats2</i>) miR-373 (<i>Lats2</i>) miR-375 (<i>Yap</i>) miR-483-3p (<i>Yap</i>)</p>
		<p>Ubikitin Ligazlar</p> <p>β-TrCP NEDD4 NEDD4L</p>
		<p>Kromatin Modültaörleri</p> <p>CBP CHD4 GATAD2/3 MBD3 MTA1/2/3 p300 SIRT1</p>
		<p>Rho GTPase Proteinleri</p> <p>CDC42 RAC1 RHOA</p>
		<p>Lizin Metiltransferaz</p> <p>SET-7</p>

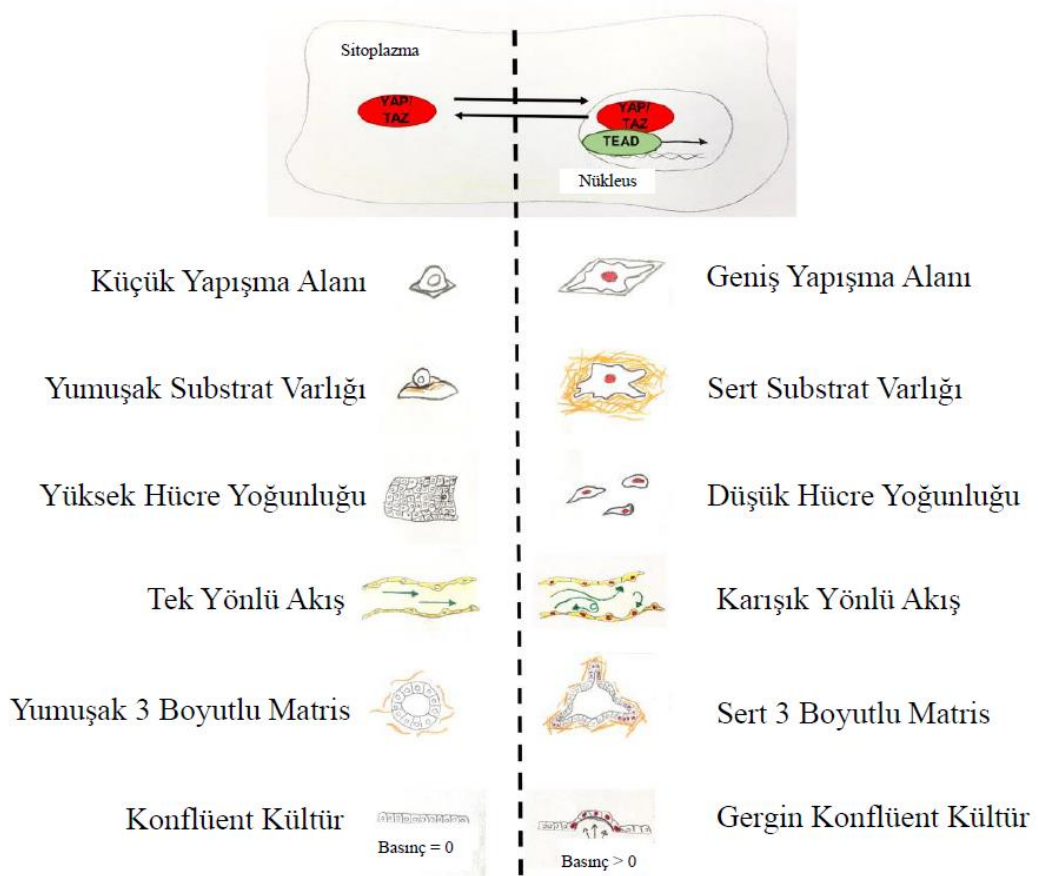
Transkripsiyon sonrası post-modifikasyonların YAP/TAZ proteinlerinin lokalizasyonunu ve aktivitesini kontrol ettiği bildirilmiştir (**Tablo 4.1.1.2**) (12).

Tablo 4.1.1.2. YAP/TAZ proteinlerinin lokalizasyonunu ve aktivitesini kontrol eden transkripsiyon sonrası post-modifikasyonların listesi (12).

Modifikasyon	Regüle Eden Enzim
YAP	
S61-p	LATS1/2
S109-p	LATS1/2
T119-p	CDK1
S127-p	LATS1/2
S164-p	LATS1/2
S289-p	CDK1
S367-p	CDK1
S397-p	LATS1/2
S400-p	CK1 ϵ/δ
S403-p	CK1 ϵ/δ
Y407-p	ABL/SRC/YES
K494-meth	SET-7
TAZ	
S58-p	GSK3 β
S62-p	GSK3 β
S66-p	LATS1/2
S89-p	LATS1/2
S117-p	LATS1/2
S311-p	LATS1/2
S314-p	NEK1/CK1 ϵ/δ
Y321-p	ABL

YAP veya TAZ protein sekansları içinde sinyal spesifikliğini sağlayan en belirgin alan (domain), 20-23 amino asitle ayrılmış iki triptofan kalıntısından oluşan WW alanıdır (46). YAP veya TAZ protein sekansları içindeki WW alanları, birçoğu YAP veya TAZ protein lokalizasyonunu ve aktivitesini kontrol eden, çeşitli proteinlerde bulunan bir PPxY motifini (prolin / prolin / herhangi bir amino asit / tirozin) tanır. Yaygın olarak incelenen insan TAZ izoformu bir WW alanına sahipken, insan YAP izoformu iki WW alanına sahiptir. Bununla birlikte, bir veya iki WW alanı içeren YAP veya TAZ protein izoformları da tanımlanmıştır (47, 48).

YAP ve TAZ proteinleri ayrıca PDZ alanlarıyla etkileşime aracılık eden bir C-terminal PDZ-bağlama motifini paylaşırlar. PDZ alanları, birçoğu transmembran veya hücre iskeleti ile ilişkili olan çeşitli proteinlerde bulunan 80-90 amino asit içeren, protein etkileşimli alanlardır (49). İşlevsel olarak PDZ bağlayıcı alanların YAP ve TAZ proteinlerinin lokalizasyonunu yönlendirdiği ileri sürülmektedir (50, 51). PDZ bağlanma alanına çok yakın olan YAP proteininde lizin 494'ün mono-metilasyonu YAP proteininin sitoplazmik tutulmasını destekler (52). YAP/TAZ proteinlerinin sitoplazmada ya da hücre çekirdeğinde bulunması; hücrelerde meydana gelen birçok olayın göstergesidir. Küçük yapışma alanında, yumuşak substrat varlığında, yüksek hücre yoğunluğunda, bir yönlü akışta, yumuşak 3 boyutlu matriste ve konflüent kültürde YAP/TAZ proteinleri sitoplazmada iken; geniş yapışma alanında, sert substrat varlığında, düşük hücre yoğunluğunda, karışık yönlü akışta, sert 3 boyutlu matriste ve gergin konflüent kültürde YAP/TAZ proteinleri hücre çekirdeğinde lokalize olmaktadır (Şekil 4.1.1.2) (15).



Şekil 4.1.1.2. YAP ve TAZ proteinlerinin hücre altı lokalizasyonunu ve aktivitesini etkileyen mekanik uyaranların şematik gösterimleri. YAP ve TAZ proteinleri, mekanik olarak aktive edildiğinde (kırmızı) çekirdeğe taşınmaktadır, burada gen ekspresyonunu düzenlemek için TEAD faktörleriyle etkileşime girmektedirler. **Şekil 4.1.1.2**, farklı matris, geometri ve fiziksel koşulların YAP ve TAZ lokalizasyonunu ve aktivitesini nasıl etkilediğini göstermektedir. Sol paneller YAP ve TAZ'ın sitoplazmada inhibe edildiği ve lokalize olduğu durumları gösterirken, sağ paneller YAP ve TAZ nükleer lokalizasyonunu teşvik eden koşulları göstermektedir. (Hücre çekirdeklerinin kırmızı renklendirilmesiyle gösterilir) (15).

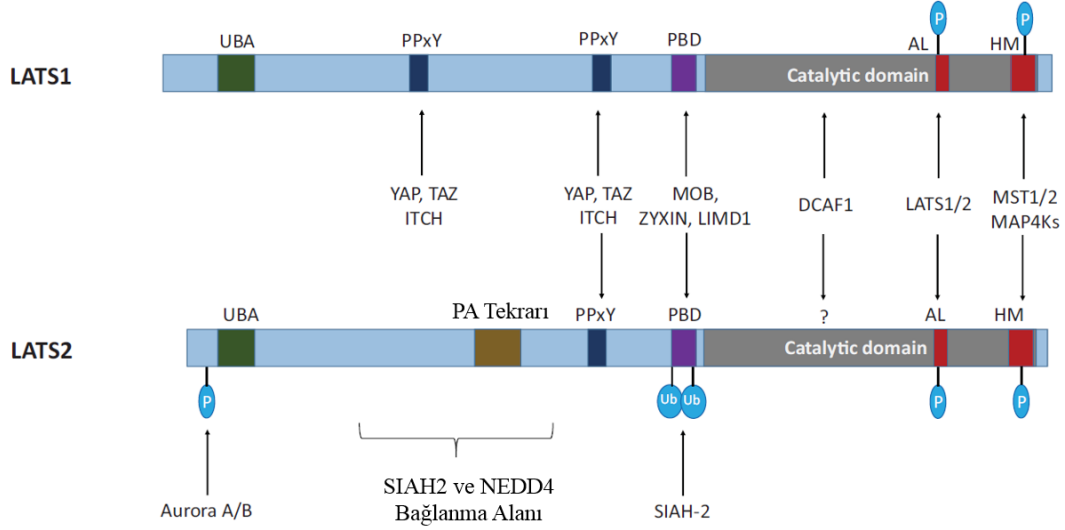
YAP ve TAZ proteinlerinin genişletilmiş C-ucu (C-Terminal), bir transkripsiyonel aktivasyon alanı oluşturmaktadır. Bu alanda c-ABL, SRC ve YES tarafından fosforile edilmiş korunmuş bir tirozin kalıntısı (insan TAZ'da Y321; insan YAP'da Y407) bulunmaktadır. Bu değişikliklerle kontrol edilen süreçler tam olarak anlaşılmasa da kanıtlar, YAP ve TAZ proteinlerinin transkripsiyonel rollerini düzenlediğini göstermektedir (12, 53). Son gözlemler, SRC kinazın, kanserle ilişkili fibroblastlarda YAP'ın transkripsiyon faktörlerine YAP bağlanmasını desteklediğini göstermektedir (54). Benzer şekilde, YAP'ın kolon kanseri hücrelerinde YES1 ile indüklenen tirozin

fosforilasyonu, birlikte apoptozu inhibe eden transkripsiyonel regülatörler olan β katenin ve transkripsiyon faktörü TBX5'e bağlanmasını indüklemektedir (55). Tersine, YAP'ın c-ABL aracılı fosforilasyonu, DNA hasarına yanıt olarak apoptozu teşvik eder (56). Son veriler, YAP'ın tirozin fosforilasyonunun artmış DNA hasarı ve epitelyal homeostaz kaybı ile ilişkili olduğunu göstermektedir, bu da inflamasyona bağlı yaralanma sonrası RASSF1A silinmiş dokuların kusurlu onarımına katkıda bulunmaktadır (57). YAP ve TAZ proteinlerinin N-terminal bölgesinde bulunan ortak bir alan, TEAD transkripsiyon faktörlerine bağlanmaya aracılık etmektedir. YAP'da bu etki alanı, bir Pxx Φ P motifi içeren genişletilmiş bir döngüye sahip iki kısa alfa helisinden oluşur (burada x, herhangi bir amino asittir ve Φ , bir hidrofobik kalıntıdır) (58, 59). Her ne kadar TEAD bağlayıcı alanın büyük bir kısmı YAP ve TAZ proteinlerinin arasında korunsa da TAZ proteini Pxx Φ P motifinden yoksundur. Dolayısıyla, son moleküler modelleme çalışmaları ve mutasyon analizi ile desteklenen YAP ve TAZ proteinlerinin TEAD transkripsiyon faktörlerine bağlanması arasındaki farklar ortaya çıkmaktadır (60). Ancak bu farklılıkların *in vivo* da farklı YAP ve TAZ proteinlerinin faaliyetlerine dönüşüp dönüşmediği henüz belirlenmemiştir. TAZ veya YAP'ın TEAD'lere bağlanmasını bozan nokta mutasyonları, proliferasyonu ve tümörün aşırı büyüme fenotiplerini teşvik etme yeteneklerini ortadan kaldırmaktadır ve bu da TEAD aktivitesinin kontrolünün tarif edilen YAP ve TAZ proteinlerinin fonksiyonlarının çoğu için çok önemli olduğunu ortaya çıkarmaktadır (12). YAP ve TAZ proteinlerindeki TEAD bağlama bölgesi, 14-3-3 proteinin bağlanması için gereken bölgeye çok yakın bölgede bulunmaktadır. 14-3-3 bağlanması, sitoplazmik sekestrasyonu teşvik etmektedir ve Hippo yolunun YAP ve TAZ proteinlerinin lokalizasyonunu ve aktivitesini kontrol etmektedir (61). 14-3-3 bağlanması, LATS 1/2 kinaz aracılı fosforilasyonla indüklenmektedir. Fosforinin bir alanin ile ikame edilmesi, nükleer YAP ve TAZ proteinlerinin lokalizasyonunu ve aktivitesini artırmaktadır ve hücrel aşırı büyüme fenotiplerini hem *in vitro* hem de *in vivo* yönlendirmektedir (12).

4.1.2. LATS 1/2 Proteinlerinin Özellikleri

LATS 1/2 proteinlerine bağlı fosforilasyon, memelilerde YAP/TAZ regülasyonunda görülen en önemli mekanizmalardan biri olduğu düşünülmektedir. Çünkü LATS1/2

proteinlerinden yoksun hücrelerin çoğunda, Hippo yolunun bilinen birçok düzenleyici sinyaline yanıt olarak YAP/TAZ fosforilasyonunu ortadan kaldırmaktadır (16). LATS 1/2 proteinlerinin aktiviteleri fosforilasyonun ötesinde çeşitli yollarla düzenlenmektedir (Şekil 4.1.2.1) (3).



Şekil 4.1.2.1 LATS1/2'nin bağlanma alanları ve protein etkileşimi haritası. LATS1/2'nin kinaz aktivitesi, öncelikle hidrofobik motif fosforilasyonu ve ardından LATS1/2'nin aktivasyon döngüsünün otofosforilasyonu yoluyla MST1/2 ve MAP4K proteinleri tarafından düzenlenmektedir. Kinazların N terminallerinde varsayılan ubiquitin ile ilişkili bir alan (Ubiquitin Binding Area-UBA) bulunmaktadır ve ITCH, SIAH-2, NEDD4 ve DCAF1 gibi birkaç E3 ubiquitin ligazının LATS1/2 protein stabilitesini düzenlediği bilinmektedir. MOB, ZYXIN, LIMD1'in protein bağlama alanı (Protein Binding Area PBD) ile bağlanması LATS1/2 kinaz aktivitesini veya bulunabilirliğini de düzenleyebilmektedir. YAP ve TAZ, LATS1/2'nin PPxY motifleri ile LATS1/2 ile etkileşime girmektedir. Aurora A / B fosforile LATS2'yi kinazlar ve hücre altı lokasyonlarını etkilemektedir. (PA tekrarı) Prolin-alanin kalıntısı tekrarı; (AL) aktivasyon döngüsü; (HM) hidrofobik motif (3).

Translasyon sonrası LATS 1/2 proteinlerinin düzenleme mekanizmalarından biri ubiquitinasyondur. WW alanı içeren HECT sınıfı E3 ubiquitin ligazı olan ITCH, LATS1'i ubiquitinatlar, hücre büyümesini ve hücrenin hayatta kalmasını teşvik etmektedir (62, 63). NF2 eksikliği olan tümör hücrelerinde aktive edilen bir başka E3 ubiquitin ligazı olan CRL4 (DCAF1), çekirdekte ubiquitinasyon yoluyla LATS1 ve LATS2'yi inhibe etmektedir (64). LATS 1/2'nin ubiquitinasyonu stres yanıtı oluşumunda ve farklılaşmada rol oynamaktadır. Örneğin, hipoksi ile aktifleştirilen bir E3 ubiquitin ligazı olan SIAH2, LATS2'nin stabilitesini bozmakta ve YAP aktivasyonunu ve tümör

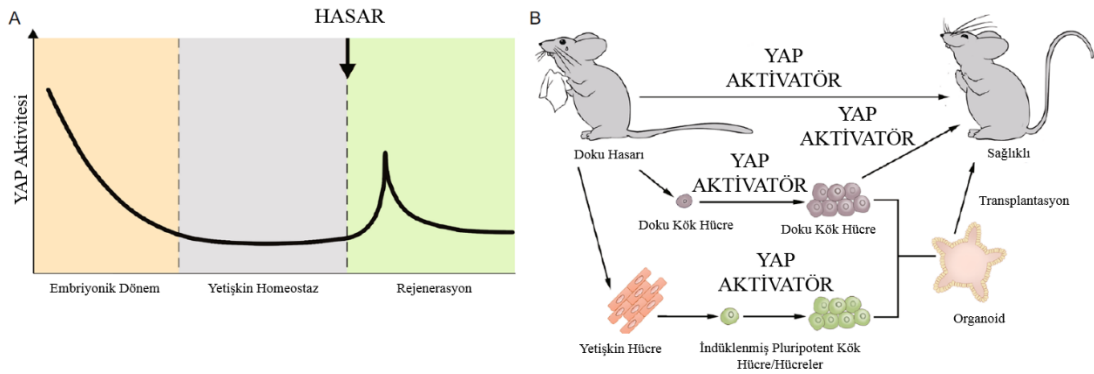
oluşumunu arttırmaktadır (65). Başka bir E3 HECT ubikuitin ligazı olan NEDD4 hem LATS2 hem de SAV1'i ubikitinatlamaktadır. Böylece YAP'ı aktive ederek bağırsak kök hücresinin kendini yenilemesini arttırmak için harekete geçirmektedir (66).

LATS proteinleri ayrıca transkripsiyonel seviyede düzenlenmektedir. LATS2, YAP/TAZ'ın doğrudan hedef genidir ve YAP/TAZ aktivasyonu sonucunda LATS2 mRNA seviyesi artmaktadır (67, 68). LATS2 mRNA seviyesinin artmasındaki regülasyon, Hippo yolunun homeostazını korumaktadır ve YAP/TAZ'ın aşırı aktivasyonunu önlemek için negatif bir geri besleme döngüsü oluşturmaktadır. Ek olarak LATS 1/2 proteinleri, aurora kinaz aracılı veya PKA aracılı fosforilasyon veya ARHGEF7, ZYXIN, AMOT ve LIMD1 ile fiziksel etkileşim yoluyla düzenlenmektedir. LATS 1/2 proteinlerinin bu diferansiyel düzenlemeleri, hücre sağ kalımını ve büyümesini modüle etmek için MST1/2 ve MAP4K aracılı protein fosforilasyonu ile birlikte ek kontrol katmanları olarak işlev görmektedir (3).

4.2. Hippo Yolağı ve Rejenerasyon

Rejeneratif tıp, moleküler tedavi ile doğal rejeneratif/onarım mekanizmalarının uyarılması veya laboratuvarlarda kültürlenmiş doku ve kök/progenitör hücrelerin transplantasyonu gibi hasarlı dokuların veya organların fonksiyonel rejenerasyonunu destekleyen tıbbi yaklaşımları ifade etmektedir (1). YAP/TAZ aktivitesi, embriyonik gelişim sırasında genellikle yüksektir, ancak doğumdan sonra bazal seviyeye düşmektedir. Doku hasarı sırasında YAP / TAZ aktivitesi hemen geçici bir şekilde yeniden aktif hale gelmektedir ve YAP/TAZ'ın geçici aktivasyonu, doku rejenerasyonunu kolaylaştırmak için progenitörlerin genişlemesini veya olgun hücrelerin farklılaşmasını teşvik edebilmektedir (**Şekil 4.2.1A**). Hippo yolu bir kinaz kaskadından oluşur ve kaskaddaki kinazları inhibe etmek için YAP/TAZ'ı aktive etmek, ideal bir yaklaşımı temsil etmektedir. Hippo yolu kinaz inhibitörlerinin sistematik veya lokal verilmesi prensip olarak bu rejeneratif programı indükleyebilmektedir (**Şekil 4.2.1B**) (2). MST1/2, MAP4K ve LATS1/2 inhibitörleri rejenerasyonun teşvik edilmesinde etkili olmaktadır (2, 17). Gen tedavisi, rejeneratif tıpta etkili bir yaklaşımdır (18) ve, viral veya viral serbest yaklaşımlarla yolak bileşenlerini veya YAP hedef genlerini hedefleyen siRNA (small interfering RNA) veya mikroRNA taklitlerini tanıtarak doku rejenerasyonuna fayda sağlayabilmektedir

(19). Alternatif bir yaklaşım ise doku rejenerasyonunu kolaylaştırmak için hasarlı dokulara makromoleküllerin verilmesi olarak değerlendirilmektedir. Bazı YAP/TAZ hedefleme genleri salgı proteinlerini (secretory proteins) kodlar ve bu proteinler rejeneratif potansiyele sahip olabilmektedir. Bu bağlamda, YAP hedeflerinin Epiregulin ve CTGF'nin sırasıyla fare bağırsak ve zebra balığı omuriliğinde doku onarımını desteklediği gösterilmiştir (69, 70). Rejeneratif sürecin moleküler bir yaklaşım kullanılarak *in vivo* yeniden programlanmasına aracılık etmesine ek olarak, *in vitro* genişletilmiş progenitörlerin, organoidlerin veya dokuların transplantasyonu ile de rejenerasyon teşvik edilebilmektedir (**Şekil 4.2.1B**) (2). YAP/TAZ proteinlerinin geçici aktivasyonu, farklılaştırılmış meme, nöral ve pankreas hücrelerini progenitör hücre durumuna etkili bir şekilde dönüştürebilmektedir ve bu hücreler organoidler oluşturabilecek ve transplantasyon için kullanılabilir durumda gelebilmektedir (71). Hippo yolunun hücre plastisitesindeki önemi göz önüne alındığında, YAP/TAZ'ın yeni ve spesifik aktivatörleri doku rejenerasyonunu teşvik etmek için güçlü bir araç olabilecektir. Hippo alanı büyük ölçüde kanseri tedavi etmek için YAP/TAZ inhibitörleri geliştirmeye odaklanırken (72), rejeneratif tıp için YAP/TAZ aktivatörlerinin geliştirilmesi de aynı derecede önemli olabilecektir.



Şekil 4.2.1. Doku rejenerasyonu ve rejeneratif tıpta Hippo sinyal yolağı. (A) YAP/TAZ aktivitesi doğumdan sonra bazal seviyeye düşürülmektedir ve doku yaralanmalarından sonra hızlıca geçici bir şekilde yeniden aktif hale gelmektedir. (B) Rejeneratif tıpta YAP/TAZ aktivasyonunun potansiyeli. YAP/TAZ aktivatörleri veya efektörleri (küçük veya makro moleküller) *in vivo* olarak doku rejeneratif programı doğrudan indüklemektedir; ayrıca YAP/TAZ aktivasyonu, dokuda yerleşik kök hücrelerin veya indüklenmiş kök hücrelerin *in vitro* genişlemesini teşvik edebilmektedir ve bu da doku rejenerasyonunu kolaylaştırmak için yaralanma bölgelerine geri gönderilebilir.

Bağırsak epitelyumu, hızlı bir döngüye uğramaktadır ve çoğu farklılaşmış hücre bir haftadan daha kısa bir sürede yenileriyle değiştirilmektedir (73). Bu kendi kendini yenileme kabiliyeti bağırsak kök hücrelerine bağımlıdır. Bu hücreler, Lgr5 (GPCR5 içeren lösin açısından zengin) proteinini ifade etmektedirler (74). YAP, genellikle Lgr5 ifade eden yetişkin bağırsak kök hücrelerinde ifade edilmektedir ve bu da Hippo yolağının bağırsak kök hücre fonksiyonunun düzenlenmesinde rol oynadığını göstermektedir. YAP proteinin aşırı ekspresyonu, Lats1/2'nin baskılanması, Mst1/2'nin silinmesi veya Sav1'in spesifik olarak bağırsakta silinmesi, bağırsak kök hücrelerin genişlemesine ve kusurlu hücre farklılaşmasına yol açmaktadır. Yap ve Taz'ın koşullu nakavtına sahip fareler, görünür bir anormallik göstermemektedir. Bu nedenle, yetişkin bağırsakta YAP'ın normal doku homeostazı için kesinlikle gerekli olmadığını ve yüksek YAP aktivitesinin esas olarak olgunlaşmamış hücrelerin birikmesi nedeniyle hiperplazi fenotipi ile sonuçlandığını göstermektedir (2). YAP için bağırsak rejenerasyonunda inhibe edici bir rol gözlemlenmiştir (74). Ek olarak, bağırsak epitel hücreleri sürekli olarak yerleşik bağışıklık hücreleri ile iletişim kurmaktadır ve bağışıklık tepkisinde Hippo yolunun rolü ortaya çıkmaktadır (75).

Hippo sinyal yolağı, karaciğer gelişimini ve tümör oluşumunu kontrol etmede çok önemli bir düzenleyicidir. YAP safra epitel hücrelerinin proliferasyonunu tetiklemek için TGF- β sinyalini düzenlemektedir ve hepatosit farklılaşmasını inhibe etmek için Hnf4 α ekspresyonunu azaltmaktadır (76). YAP proteininin yalnızca karaciğerde silinmesi, safra epitel hücrelerinin kaybına yol açmaktadır ve karaciğer safra kanallarını geliştirememektedir (76, 77). Öte yandan, hepatosit farklılaşması sırasında YAP aktivitesi azalmaktadır ve olgun hepatositlerin YAP ifadesi ve nükleer birikimi düşmektedir (78, 79). YAP aktivitesi, rejenerasyon sırasında karaciğer hücresi kaderini de etkilemektedir (79). YAP'ın koşullu aktivasyonu, karaciğer aşırı büyümesine ve kansere yol açmaktadır (80).

Deri, organizmayı dış lezyonlardan koruyan en önemli organdır. Epidermis cilt homeostazını korumak için sürekli olarak yenilenmektedir. Epidermal doku da yenilenme ve yara iyileşmesi esas olarak epidermal kök hücrelerine bağlıdır (20). YAP, erken embriyonik epidermal progenitörlerde yüksek oranda eksprese edilmektedir ve ağırlıklı olarak nükleusta lokalize olmaktadır. YAP proteini,

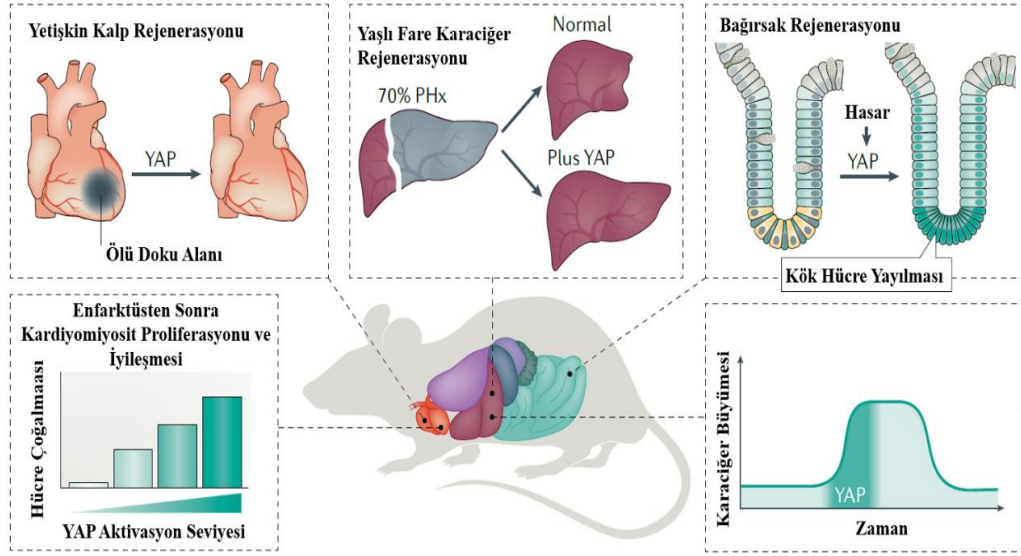
progenitörlerin proliferatif kapasitesi ve epidermin gelişimi için gerekmektedir (21). Yüksek YAP aktivitesi, epidermal progenitörlerin ve yara iyileşmesinin farklılaşmasını da etkilemektedir. YAP'ın silinmesi hücre büyümesinin azalmasına, keratinosit farklılaşmasının inhibisyonuna ve yara iyileşmesinde gecikmeye yol açmaktadır (22).

Kalp büyümesi sınırlı büyüklüğe kadar çıkmaktadır. Bu aşamalar faza ayrılmaktadır. Bunlardan ilki; fetal kalp büyümesidir ve esas olarak kardiyomiyositlerin çoğalmasına bağlıdır. İkincisi ise; doğumdan kısa bir süre sonra, kardiyomiyositlerin çoğalmayı durdurması ve kalp büyüklüğünün temel olarak kardiyomiyositlerin büyüklüğü tarafından kontrol edilmesidir. Kardiyomiyosit kaybı, kalp yetmezliğine yol açan önemli bir patojenik mekanizmadır. Bununla birlikte, diğer organların aksine, kalp rejeneratif olmayan bir organ olarak kabul edilmektedir. Son zamanlarda, bazı çalışmalar kardiyomiyositlerin de sınırlı rejeneratif kapasiteyi koruduğunu ve kardiyak rejenerasyona katkıda bulunabilecek kardiyak progenitörlerin farklı gelişim aşamalarında da tespit edildiğini bildirmektedir (2). Memeli kardiyomiyositlerinin proliferasyonunun uzun süredir embriyonik aşamalarla sınırlı olduğu ve doğumdan sonra rejenerasyon kapasitelerinin çok az olduğu veya hiç olmadığı düşünülmektedir. Bununla birlikte, son zamanlarda sadece embriyonik değil, aynı zamanda yenidoğan fare kalplerinin miyokard enfarktüsünden sonra kalp kası hasarını yeniden onarabildiği keşfedilmiştir ancak bu yetenek giderek azalır 7. günde kaybolmaktadır (81). Son bulgular YAP'ı yetişkinlerde kalp rejenerasyonunu teşvik etmek için birincil aday olarak göstermektedir (7). YAP aktivitesi, birden fazla mekanizma ile kalp rejenerasyonunu teşvik edebilmektedir. Gen ifade profili analizleri, YAP'ın hücre proliferasyonu, DNA sentezi ve hücre iskeletinin yeniden şekillenmesi ile ilgili genlerin ekspresyonunu indüklediğini göstermektedir. YAP, kardiyomiyosit apoptozunu azaltmak için IGF-1 ve Akt sinyalini uyarılmaktadır. Ayrıca YAP, FoxO1 ve Pitx2 gibi kalpteki farklı transkripsiyonel faktörlere bağlanmaktadır ve antioksidan cevap içeren genlerin ekspresyonunu teşvik etmektedir (2).

Nöral kök hücreler (82) kendini yenileyebilmektedir ve memelilerde, hem fetal hem de yetişkin sinir sisteminde bulunan çoklu nöronal ve glial soylar üretebilmektedir. Hücre döngüsü kesin nörojenezini sağlamak için NKH'lerde sıkı bir şekilde koordine

edilmektedir (83). Son bulgular, Hippo sinyalizasyonunun, NKH proliferasyonunu, hücre kaderinin belirlenmesini, farklılaşmayı ve olgunlaşmayı kontrol etmede önemli bir rol oynadığını göstermektedir. YAP, seçici olarak NKH'lerde ve astrositlerde eksprese edilmektedir, ancak nöronlarda ifade edilmemektedir. Astrositlerde YAP, astrositik çoğalma için gereklidir. Yapının NKH'lerde veya astrositte silinmesi, astroglionenezin bozulmasına ve neokortikal nörodejenerasyonun artmasına neden olmaktadır (84). YAP aktivasyonu, siklin D1 gibi köklülük (stemness) genlerinin yukarı regülasyonundan kaynaklanan nöral progenitör hücre popülasyonunun azalmış nöronal farklılaşmasına ve genişlemesine yol açmaktadır. Aksine, YAP veya TEAD'lerin nöral tüpteki baskısı, hücre ölümü, hücre döngüsü çıkışı ve nöronal hücrelerin farklılaşmasında önemli bir artışa neden olmaktadır (85). Ayrıca, YAP/TAZ periferik sinirlerin morfogenezi için de önemlidir. Schwann hücrelerinde YAP/TAZ'ın spesifik olarak silinmesi, hücre çoğalmasının azalmasına, radyal ayıklamanın bozulmasına ve kusurlu miyelinizasyona yol açmaktadır (86).

Özetle, Hippo sinyal yolağı deri, bağırsak, kalp, karaciğer ve sinir sistemi organlarının yenilenmesinde önemli roller üstlenmektedir (**Şekil 4.2.2**). Hasarlanmış insan organlarında Hippo yolağı iç mekanizmaları uyarılarak hasarlı organ tamiri mümkün olabilir (7). Farklı model sistemlerde yapılan çalışmalar Hippo yolağının organ yenilenmesindeki rolünün çeşitli canlılarda korunmuş bir özellik olduğunu göstermiştir (14).

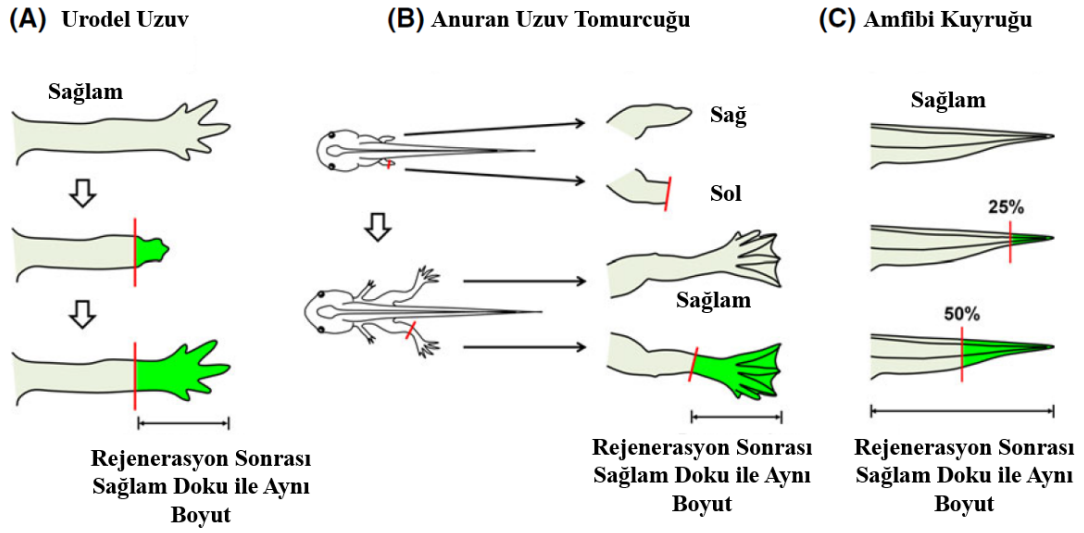


Şekil 4.2.2. YAP/TAZ aktivasyonunun farklı organlarda etkileri ve yararları. YAP ve TAZ'ın deneysel aktivasyonu, birçok organda doza bağlı bir şekilde hücre proliferasyonunu indüklemektedir. Bu artan proliferasyon, karaciğer gibi dokuların güçlü bir şekilde aşırı büyümesini sağlayabilmektedir. İlginç bir şekilde, bu fenotiplerin geri dönüşümlü olduğu görülmekle birlikte, YAP etkisiz hale getirildiğinde sadece 2 hafta içinde hücre ölümünü indükleyerek doğru boyuta geldiği görülmektedir. Özellikle, YAP/TAZ aktivasyonuna yanıt olarak artan proliferasyon, doku rejenerasyonunu desteklemektedir. Kalpte YAP aktivasyonu miyokard enfarktüsü sonrası kardiyomiyosit proliferasyonunu ve rejenerasyonunu desteklemektedir. Yaşlı farelerin karaciğerinde YAP aktivasyonu, parsiyel hepatektomi (PHx) sonrası rejenerasyon potansiyelini geri kazandırmaktadır. Bağırsakta YAP aktivasyonu, kök hücre genişlemesine ve yaralanma sonrası rejenerasyona neden olmaktadır (7).

4.3. Amfibilerde Hippo Yolağı

Rejenerasyon kabiliyeti çok hücreli organizmalarda önemli ve temel bir özelliktir. Tüm canlı organizmalar sürekli olarak potansiyel yaralanma risklerine maruz kalırlar ve hepsinin bir dereceye kadar rejenerasyon kabiliyeti bulunmaktadır. Rejenerasyon kabiliyeti çok hücreli organizmalar çeşitlendikçe oldukça farklılık göstermeye başlar (14). Memelilerin aksine amfibiler, daha yüksek organ ve doku yenileme kabiliyetine sahiptir (87). Bu canlılar kornea, lens, retina, kalp, omurilik, beyin, kuyruk ve kol gibi bir çok organlarını, erişkin dönemde dahil, tamamen yenileyebilmektedir (88). Organ rejenerasyonunda yeniden farklılaşma, aktif hücre proliferasyonu ve sinyal merkezi oluşumu gibi karakteristik olaylar türler arasında karşılaştırılabilir. Bu karakteristik olaylara ek olarak, bir diğer ilgi çekici olay ise boyut kontrolüdür. Urodellerin ekstremite rejenerasyonunda, rejenerare ekstremite orijinal olanla tamamen

aynı şekli ve boyutu göstermektedir (Şekil 4.3.1A). *Xenopus laevis*'in kol ve kuyruk rejenerasyonunda, uzuv tomurcuğunun rejenerasyonu gelişim ile aynı anda ilerlese de rejenerasyonu kontralateral sağlam uzuv gelişimine yetişmektedir, bu da ilerleyen aşamalarda sağlam uzuvdakilerle aynı şekil ve boyutta sonuçlanmaktadır (Şekil 4.3.1B ve Şekil 4.3.1C). Rejeneratif türler, orijinal olanla aynı büyüklükteki bir organı yeniden oluşturabilmektedir ve boyut rekonstrüksiyonu, yaralanma sonrası kalan dokularla uyumlu etkileşim ile elde edilmektedir (14). Çeşitli kurbağa türlerinde ve aksolotllarda, yenilenen bölge eski şekil ve büyüklüğe geri ulaşmaktadır. Yani hasardan sonra organlar orijinal boyutuna dönmektedir (8, 89, 90).

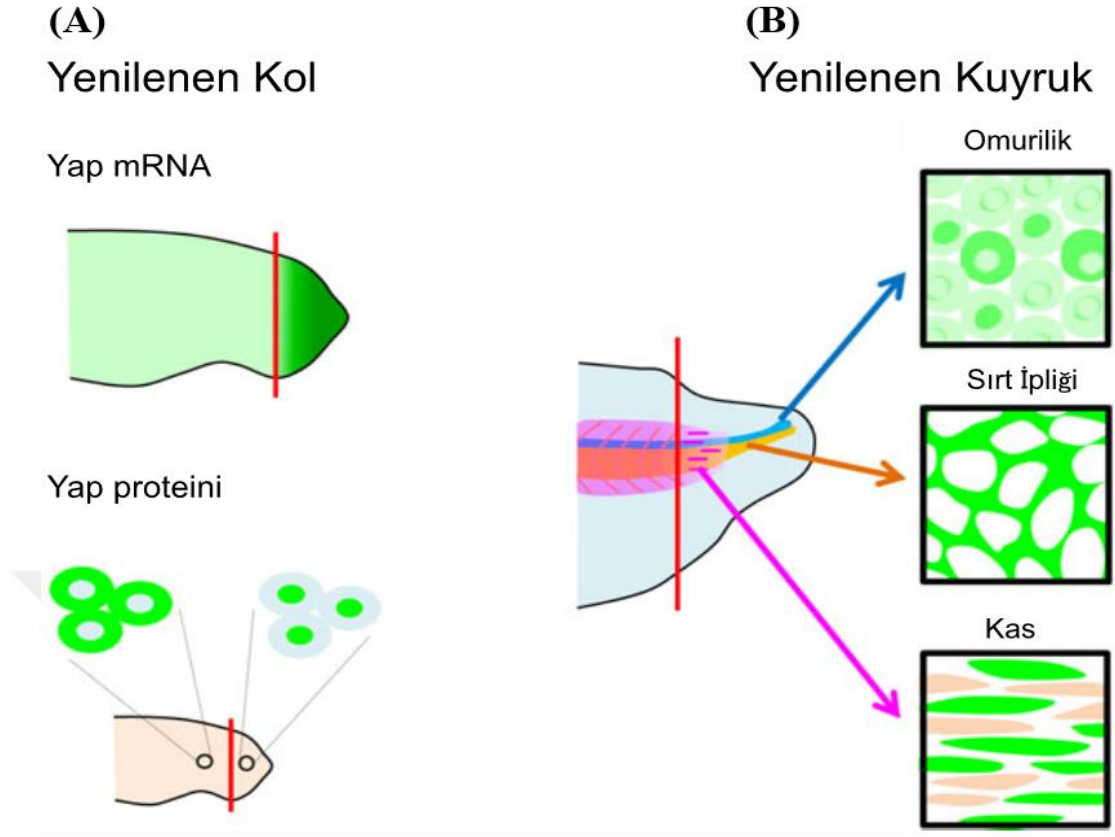


Şekil 4.3.1. Organ büyüklüğü kontrolü ve rejenerasyonu. (A) Urodeller, yetişkin aşamada bile yaralanma sonrası eksik bir uzuvu tamamen yeniden oluşturabilmektedir. Yenileyici bir uzuv, orijinaliyle aynı boyutta ve aynı şekilde büyümektedir. (B) Anuranlar bir uzuv tomurcuğunu sadece larva aşamasında yeniden üretebilir ve bu nedenle uzuv tomurcuğu rejenerasyonu, uzuv gelişimi ile eşzamanlı olarak ilerlemektedir. Bununla birlikte, uzuv tomurcuğu rejenerasyonu sağlam uzuv gelişimi ile yakalanmaktadır ve sağlam uzuvdakilerle aynı boyut ve şekle sahip bir uzuv yeniden üretilmektedir. (C) Amputasyon düzlemi derinleştikçe amfibi kuyruğu daha hızlı yenilenmektedir (14).

Xenopus laevis'te uzuv tomurcuğu ve kuyruğunun yenilenmesinde Hippo yolunun işlevi ortaya çıkarılmıştır (91, 92) (Şekil 4.3.2A). Amfibilerdeki kuyruğun organ büyüklüğü, basitleştirme için proksimal-distal eksen boyunca uzunluğu ile temsil edilebilmektedir, çünkü kuyruk, amfibilerde basit bir konik şekle sahip tekrarlayan bir yapıdır (Şekil 4.3.1C). *Xenopus laevis* kuyruk rejenerasyonunda, uygun boyut

kontrolü için YAP ve Tead4 gerekmektedir, çünkü YAP veya Tead4 fonksiyon kaybı, rejenere kuyruğun boyutunu kısaltmaktadır (91).

Amfibilerde omurilik rejenerasyonunda, kuyruk amputasyonundan sonra sadece aksogenez (akson yeniden büyüme) değil, aynı zamanda nörogenez (nöral kök hücre veya progenitör yeniden üretimi) de meydana gelmektedir (93). Bazı çalışmalar, Hippo yolunun nöral progenitör popülasyonunu düzenleyerek organ boyutuna katkıda bulunduğunu ileri sürmektedir (**Şekil 4.3.2B**). YAP, rejenere edici notokordda yüksek oranda fosforile edilmektedir (91) (**Şekil 4.3.2B**). Her ne kadar notokordta YAP'ın nükleer translokasyonu inhibe edilmiş olsa da, translokasyona uğramayan sitoplazmik YAP proteinleri bazı fonksiyonlara sahip olabilmektedir (94). Hippo yolunun sitoplazmik fonksiyonu, notokord boyutunu artırmak için hücre şişmesi (cell swelling) ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir. *Xenopus laevis*'in kaslarında, YAP, satellit hücrelerine dağıtılan rejenere fare kaslarından farklı olarak, rejenere kuyruktaki satellit hücrelerinden ziyade farklılaşmış miyositlere düzensiz olarak dağıtılmaktadır (91) (**Şekil 4.3.2B**). Omurilik, notokord ve kaslar gibi artan doku boyutlarının, Hippo yolunun kontrolü altında rejenere kuyruğuna uyumlu bir şekilde entegre edildiği düşünülmektedir. **Özetle**, Kurbağa kuyruk yenilenmesinde aktif YAP proteini, omurilik notokord ve kasta da ifade edilmiştir. Buna ilaveten, kurbağa kol yenilenmesinde YAP proteininin, blastema dokusunda çekirdeğe yerleşmiş şekilde, yani aktif halde bulunduğu gösterilmiştir. Bu çalışmaya ait özet bilgiler **Şekil 4.3.2'** de şematize edilmiştir (14).



Şekil 4.3.2. Afrika Pençeli Kurbağasında (*Xenopus laevis*) kol ve kuyruk yenilenmesinde YAP proteininin oldukça önemli roller bulunmaktadır. Kol yenilenmesi sırasında YAP transkripti (Koyu yeşil) yüksek regüledir. Blastema dokusunda, YAP proteini çekirdeğe yerleşmiştir. Kuyruk yenilenmesinde, YAP proteininin ifadesi omurilikte, sırt ipliğinde (notokorta) ve kas hücrelerinde belirlenmiştir (14).

Hippo yolağının organ gelişiminde ve kanser hücrelerinde karmaşık bir sinyal ağı oluşturduğu da bilinmektedir (95). Sinyal ağı organ rejenerasyonunda rol oynayabilmektedir. Hippo yolu, Wnt sinyali ile yakından ilişkilidir. Yap transkripsiyonu kolorektal karsinom hücrelerinde Wnt yolunda beta-katenin ve TCF kompleksi tarafından düzenlenmektedir (96). Öte yandan Yap, kalp gelişimindeki hücre çekirdeğinde beta-katenin ile iş birliği yapmaktadır (97). Wnt sinyalinin sitoplazmik YAP tarafından düzenlenmesi hakkındaki bu raporlara göre, Hippo ve Wnt yolları birbiriyle çok yönlü etkileşime girmektedir. *Xenopus laevis* kuyruk rejenerasyonunda, Wnt sinyalinin engellenmesi, kuyruk rejenerasyonunu ciddi şekilde bozmaktadır ve sürecin sonunda yara iyileşmesine neden olmaktadır (91, 98). Wnt inhibisyonundan farklı olarak, YAP veya Tead inhibisyonu sadece kısaltılmış kuyruk

rejenerasyonuna neden olmaktadır ve rejenere tomurcuk oluşumunu durdurmamaktadır (91). Bu sonuçlar, Wnt sinyalinin kuyruk rejenerasyonunda Hippo sinyallemesinin başlamadan önce erken aşamada etki ettiğini göstermektedir. YAP'ın medulloblastomdaki Shh sinyallemesi ile düzenlendiği de bildirilmektedir (99). *Xenopus laevis* kuyruğu rejenerasyonu ile ilgili olarak, ölmekte olan hücrelerin elzem hücreleri desteklemek ve organ büyümesini indüklemek için Wnt gibi sinyal ligandlarını serbest bıraktığı fikri öne sürülmektedir. Bu rapora ek olarak, YAP'ın fonksiyonel inhibisyonu, *Xenopus laevis*'te yenilenen uzuv tomurcuğunda Shh ifadesini azaltmaktadır (92). Bu sonuç, Hippo ve Shh sinyal iletiminin karşılıklı etkileşiminin çalıştığını göstermektedir. Ayrıca medulloblastomdaki YAP'ın fonksiyonel analizi, YAP'ın otonom pozitif geri bildirimini YAP transkripsiyonunu düzenlediğini göstermektedir (99). Hippo yolunun rejenerasyondaki organ büyüklüğünden sorumlu tek mekanizma olmadığı, ancak birkaç sinyal yolunun uygun bir organ büyüklüğüne sahip rejenerasyon için sinyalleme ağını düzenlediği düşünülmektedir (14). YAP, çoğalmaya tek bir hücrede değil, bir hücre popülasyonunda toplu olarak aracılık etmektedir. Semender ekstremitte rejenerasyonunda Agr ailesi proteinlerinden biri olan Ag proteini, sinir kılıfı ve epidermal bez hücrelerinden salgılanmaktadır ve blastemadaki Prod1 proteini ile etkileşime girmektedir. Ag proteini, denervasyonun neden olduğu blastemadaki hücre çoğalmasının azalmasını telafi edebilmektedir. Bu da YAP'ın yenilenen blastemadaki hücre popülasyonunun çoğalmasına aracılık ettiğini göstermektedir (100).

4.4. Rejenerasyon Yeteneği Yüksek Bir Amfibi: Aksolotl

4.4.1. Aksolotl Hakkında Genel Bilgiler ve Uzuv Hasarı Sonrası Blastema Oluşumu

Rejeneratif kapasite kaybı yaşlanmanın normal bir parçasıdır. Bununla birlikte, aksolotl (*Ambystoma mexicanum*) gibi bazı organizmalar yaşamları boyunca rejeneratif kapasiteyi korumaktadırlar. Ayrıca, bu organizmada yaşa bağlı hastalıkların gelişimi nadirdir (101). Aksolotl, yaygın olarak semender olarak adlandırılan kuyruklu bir amfidir. Semenderler üç büyük amfibi grubundan birini temsil etmektedirler. Bu gruplar 200 milyondan fazla yıldır bağımsız olarak gelişmektedir ve birbirlerinden oldukça farklıdırlar. Dolayısıyla, bu grupların hiçbirindeki tek bir tür “tipik” amfibi

bakış açısı sağlamaz. Aksolotl, Ambystomatidae familyasındaki kaplan salamander tür kompleksinin bir üyesidir. Kaplan semenderleri, Kuzey Amerika'nın karasal ve tatlı su sucul habitat türlerinde yaygın olarak bulunan birkaç tür ve alttürden oluşan yeni geliştirilmiş bir gruptur (102). Aksolotlların, bir zamanlar bugünkü Mexico City'nin doğal yaşam alanını belirleyen büyük göl sistemlerini kolonize eden metamorfik kaplan semender atalarından geldiği düşünülmektedir (103).

Aksolotllar laboratuvarında kolaylıkla yetiştirilebilmektedirler. Aynı zamanda, aksolotlar neoteniktir, yani kanonik amfibi yaşam döngüsünün son aşamasına girmeden büyümektedirler ve cinsel olarak olgunlaşmaktadırlar; kalıcı olarak suculdurlar ve bu yaşam tarzını desteklemek için harici solungaçlar ve diğer vücutsal ekipmanlarla donatılmışlardır (104). Son yıllarda aksolotl model organizma olarak kullanılarak, çeşitli laboratuvarlarda transgenез (105) ve genom düzenleme çalışmaları (106) başarıyla tamamlanmaktadır. Genomik entegrasyon ile sonuçlanan retroviral enfeksiyon, embriyolarda ve larva ve erişkin uzuvlarında da gösterilmektedir (107, 108). Genom mühendisliği, aksolotlarda gen-işlev ilişkisini çalışmak bakımından önemli bir araç haline gelmektedir. Aksolotldaki uzuv geliştirme literatürü, rejenerasyonla ilgili çeşitli alanlar için (hücresel yeniden programlama, kök hücre biyolojisi, diğerleri arasında) verimli olabilecek ipuçları ve başlangıç noktaları sağlayabilecektir (106).

Aksolotl, organ ve dokularını tamamen yenileyebilen çok az sayıdaki omurgalı canlılardan bir tanesidir (109). Aksolotllardaki bu yenilenme kapasitesini açıklamak için bazı hipotezler ortaya atılmıştır. Bunlar içinden en ikna edici olanı, aksolotlların metamorfozlarını tamamlayamadıkları ve embriyonik ya da larval dönem benzeri karakteristiklere sahip olduğu için yüksek yenilenme kapasitesine sahip olduğudur (110). Rejeneratif kapasite farkını açıklamak için başka bir hipotez, urodellerin amniyotlardan daha basit bir adaptif bağışıklık sistemine sahip olduğu ve bu nedenle rejenerasyon yeteneklerinin zayıf bir enflamatuar yanıtı bağlı olduğu gözlemine dayanmaktadır (111). Tükenmiş bir bağışıklık tepkisini artan rejeneratif kapasite ile ilişkilendiren tetrapod (dört üyeliler) türleri üzerindeki gözlemler bu hipotezle tutarlıdır. Bununla birlikte, amfibiler ve sürüngenler üzerinde çelişkili görünen diğer

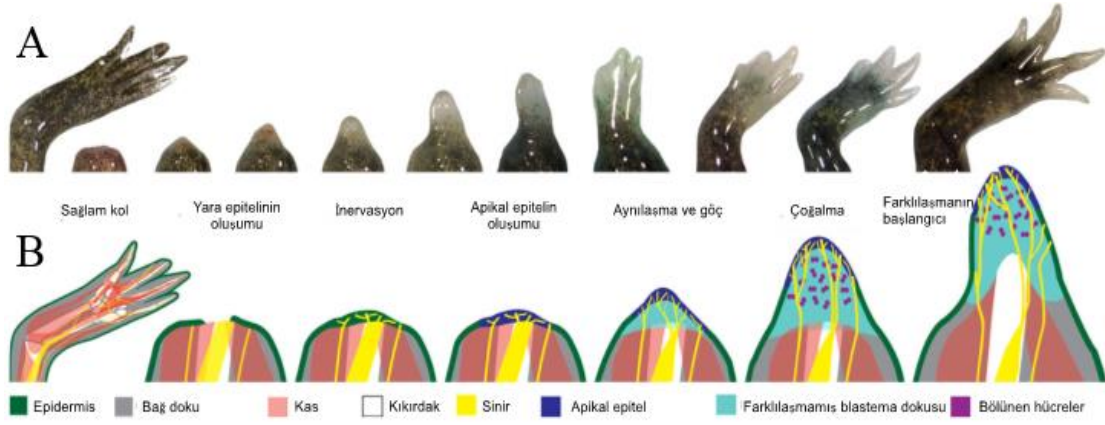
gözlemler, bağışıklık sisteminin rejeneratif yanıtta olumlu bir rol oynadığını göstermektedir (112).

Aksolotl rejenerasyonu çalışmalarının çoğu uzuv (kol) ve daha az ölçüde kuyruğa odaklanmaktadır, ancak vücudun diğer birçok kısmı, örneğin göz, beyin ve iç organlar gibi yapılarında benzersiz rejenerasyon kabiliyetine sahip olduğu bilinmektedir (8). Diğer omurgalılarda eksik parçaların yerini yeni yapıların alabilmesine rağmen, çoğu durumda yeni yapılar orijinaliyle aynı değildir. Örneğin, kertenkeleler kuyruklarını yenilediğinde, yeni yapı orijinaliyle aynı işleve hizmet etmektedir, ancak farklı mekanizmalar ile gelişmektedir ve yapısı orijinalin basitleştirilmiş bir versiyonudur (113).

Aksolotl kol (ya da uzuv) hasarından sonra hasar bölgesinde farklılaşmış hücrelerden dedifferensiye olmuş kök hücre grubu ve öncül (progenitor) hücrelerin de bulunduğu hücre popülasyonları birikir. Bu yapı '**blastema**' olarak isimlendirilmektedir. Blastemanın oluşumu, epimorfik rejenerasyon süreci yoluyla kayıp yapıların başarılı bir şekilde rejenerasyonuna yol açan kritik bir olaydır. Blastema oluşumu benzersiz bir süreç gibi görünse de blastema oluşuktan sonra embriyogenez sırasında uzvu oluşturan uzuv tomurcuğunun tüm davranışlarını göstermektedir. Blastema formasyonu; yeterli bir sinir kaynağı, uzuv gelişiminde olduğu gibi bir yara epitelyumu ve farklı konumsal kimlikleri kodlayan bağ dokusu kökenli hücreleri gerektirmektedir (**Şekil 4.4.1.1**). Sinir ve yara epitelyumu arasındaki sinyalleşme, büyük ölçüde uzuv tomurcuğunun farklılaşmamış hücrelerine eşdeğer olan rejenerasyon yetkin hücrelerini toplamak için işlev görmektedir. Pozisyonel bilgiye sahip blastema hücreleri, rejenere dokuların doğru yerde yeniden düzenleme yapmasını sağlamak ve yapı oluşumunu kontrol etmek için birbirleriyle ve hasar bölgesinde kalan hücrelerle etkileşime girmektedirler. Bu erken olaylar doğru başlatıldığında ve doğru bir şekilde düzenlendiğinde, blastema oluşmaktadır (**Şekil 4.4.1.1**). Geç tomurcuk evresinde, uzuvda yeniden düzenleme yapmak için gerekli tüm hücreler ve bilgiler, ektopik bir bölgeye aşılındığında blastema bir ektopik uzuv haline gelmektedir (8).

Bir semenderde uzuv yenilenmesi, yara iyileşmesine yol açan yaralanma ile başlatılmaktadır. Pro-rejeneratif sinyallere yanıt olarak, yaranın içindeki ve

çevresindeki hücreler, büyüyen uzuv yapılarının yerini almak için büyüyen ve patern oluşumuna gösteren bir blastema oluşturmak üzere toplanmaktadırlar (114).



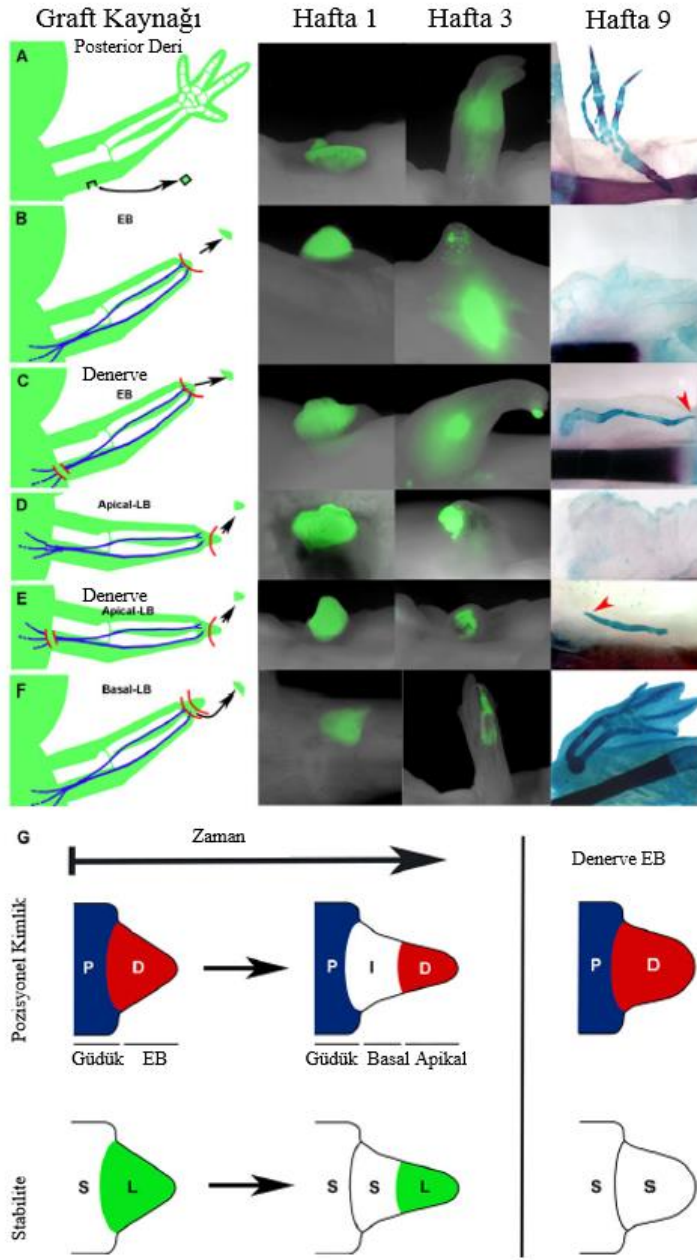
Şekil 4.4.1.1. Axolotl ekstremitesinde blastema gelişimi. (A) Sağlam bir uzuv (solda) ve amputasyondan 1, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 21, 25 ve 31 gün sonra (arka arkaya sağa doğru gösterilmektedir) uzuv blastema gelişiminin zaman akışının canlı görüntüleri. (B) Rejeneratif süreçteki temel adımlar blastema gelişimi sırasında vurgulanmaktadır. Doku bileşenleri belirli renklerle gösterilmektedir. Sağlam uzuv, epidermis, bağ dokusu, kıkırdak, kas ve sinir dokusu dahil olmak üzere, fonksiyonel yapılar oluşturmak için belirli bir şekilde organize edilen çoklu dokulardan oluşmaktadır. Bir amputasyonu takip eden saatler içinde, bir yara epitelyumu uzuvun kesik kenarını örtmektedir. Birkaç gün içinde, bu yara epitelyumu innerve olur ve apikal epitelyal kapak (Apical Epitelium Cap-AEC) olarak bilinen özel bir sinyal merkezi haline gelmektedir. AEC, alttaki güdük (stump) dokusunda farklılaşmayı indüklemektedir ve AEC'nin altında biriken hücreleri kendine çekmektedir. Konumsal etkileşimlerin “farklılaşma ve göç” aşamasında gerçekleşmesi muhtemeldir, çünkü yetersiz konumsal eşitsizlik varsa blastema sınırlı bir süre büyümeye devam edecek, ancak uzuv yapıları oluşturamayacaktır. Gelişimin sonraki aşamalarında, blastemanın bazal bölgesindeki (güdüğe en yakın) hücreler farklılaşmaya başlarken, blastemanın apikal ucundaki hücreler çoğalmış ve farklılaşmamış bir durumda kalmaktadırlar. Zamanla, blastema hücreleri kademeli olarak ekstremite dokularına bazalden blastemanın apikal bölgelerine doğru ayrılmaktadır (8).

Her ne kadar nihai rejenerasyon için rejeneratif yara iyileşmesi gerekli olsa da tek başına blastema oluşumu için yeterli değildir. Bu, en doğrudan, yeni bir uzuv oluşturabilen bir blastemanın geliştirilmesi için gerekli sinyalleşme için *in vivo* bir fonksiyon artırımı (gain-of function) deneyi olan aksesuar uzuv modelinde (accessory limb model-ALM) gösterilmiştir. Bu tahlilde, amputasyona bağlı bir blastemaya eşdeğer bir ektopik blastema, küçük bir tam kalınlıkta deri yarası yapılarak ve brakial siniri yara bölgesine cerrahi olarak saptırarak kol tarafında indüklenmektedir. Sinir

sapmazsa yara, skar oluşumu olmadan iyileşmektedir ve normal cilt mimarisi restore edilmektedir, ancak blastema oluşmamaktadır. Bu, blastema formasyonunun eşik seviyeli bir sinir sinyali gerektirdiğini, amputasyon durumunda uzvun kopmuş sinirleri tarafından sağlandığını, ancak sapmış bir sinir olmadan ALM deri yarası durumunda bulunmadığını göstermektedir. Bu nedenle, sinyalleme yollarının diferansiyel regülasyonunu ve hücrelerin bir blastema oluşturmak üzere indüklenen ve bir blastema oluşturma kabiliyetine sahip olan fakat bunu yapmaya teşvik edilmemiştir. Bu nedenle ALM, blastema oluşumu ve daha sonra bir uzuv *de novo* rejenerasyonuna yol açan hem deri hem de hücre dışı matrisin sinyallerinden ve yara epitelinden gelen sinyalin gerekli olduğunu açıkça ortaya koymuştur (114, 115). Bununla birlikte, blastemanın oluşup oluşmamasından bağımsız olarak, yaralanma sonrası yara iyileşmesine yol açan bir dizi olay daha vardır. Yara yüzeyi, hızlı bir şekilde yara çevresi etrafındaki keratinositlerden türetilen bir epitel ile kaplanmaktadır (116). Yara yüzeyi boyunca göç eden hücrelerden ziyade, bu epitel doku tabakası, çevredeki hücreler su aldıkça ve hacim olarak genişledikçe arkadan itilmektedir (117). Birkaç gün boyunca hem güdük dokularında hem de yara epitelinde, bir blastemanın başlangıç görünümünden ve blastema hücre proliferasyonunun başlamasından önce bir dizi değişiklik meydana gelmektedir. Yara epitelinde, sinir sinyallerine yanıt olarak apikal epitelyal kapağı oluşturmaya teşvik edilmektedir ve bu geçiş, bazal keratinositlerin proliferatif olmaması ve bağ dokusu fibroblastlarının oluşmasına yol açan sinyaller üretmeye başlaması ile ilişkilendirilmektedir (8). Güdük içindeki hücreler ayrıca, gen ekspresyonundaki değişiklikler ve blastemayı oluşturmak üzere yara bölgesine göç etme yeteneği dahil blastema oluşumundan önce değişikliklere uğramaktadır (114). Güdük içindeki hücrelerin yanıtı, yara yapıldığında meydana gelen hasarın derecesine bağlıdır. Bir amputasyon durumunda, güdük hücrelerinin tepkisinin çoğu, meydana gelen kapsamlı hasar ile ilişkilidir. İnflamasyon ve nekroz gibi oluşan bu cevapların birçoğu da memelilerde benzer yaralanmalarda gözlenmektedir, ancak blastema oluşumunu indüklemek için yeterli değildir. Yine de bu yanıtların bazıları blastema oluşumu için gerekli görünmektedir; örneğin, makrofajlardan gelen enflamatuar sinyaller inhibe edilirse ekstremite rejenerasyonu denerve bacaklarda gözlemlenene benzer şekilde inhibe edilmektedir (118). Uzun yıllar boyunca ileri sürüldüğü gibi, bu olaylar dizisi, sinirler ve uzuv tomurcuklarının apikal epitelyal kapak/apikal

ektodermal sırt bölgeleri işlevsel olarak eşdeğer bir apikal epitelyal kapak oluşumunu indükleyen yeni oluşturulmuş yara epiteli arasındaki etkileşime bağlı gibi görünmektedir (8).

Kesilmiş bir uzuv yarasının iyileşmesi ile ilişkili yara iyileşmesi olaylarının çoğu blastema oluşumu için gerekli değildir. Blastema oluşumu için yeterli olan sinyalleşme mekanizmalarından, sinir ile ilişkili olanlar en belirgin olanıdır, bu da sinir sinyalleşmesinin rejenerasyon için gerekli olduğunu gösteren klasik çalışmalarla tutarlıdır. Rejenerasyonun sinir sistemi bakımından bir eşik seviyesinin üzerinde sinyal gerektirdiği bilinmektedir. Bu sinyalleşme seviyesi hem ilk blastema oluşumu hem de rejenerasyonun erken ve orta aşamalarında blastemanın büyümesi ve gelişmesi için gereklidir. Ek olarak, sinir tipinden ziyade (örneğin, duyusallığa karşı motor), rejenerasyonda önemli olan sinirlerin niceliğidir. Sinirler tarafından üretilen ve blastema oluşumu ve rejenerasyonu için gerekli olan “nörotrofik faktör” olarak bir dizi faktör önerilmekte ve araştırılmaktadır. Nöropeptitler, organik moleküller, siklik nükleotitler, büyüme faktörleri ve hatta biyoelektrik sinyaller dahil olmak üzere birçok potansiyel aday araştırılmaktadır. Örneğin, uzuv gelişiminde olduğu gibi, FGF sinyalleşmesi uzuv rejenerasyonu sırasında önemlidir ve sinir sinyali ile ilişkilidir. Ayrıca sinyalleme pozisyon bilgisi için de oldukça elzemdir. Birçok araştırma, sinirin eksik yapının desenini tam olarak belirlememiş blastema hücrelerinde pozisyon plastisitesini korumak için gerekli olduğunu düşündürmektedir (**Şekil 4.4.1.2**) (8). FGF sinyalleşmesinin yanı sıra kemik morfogenetik proteinleri (BMP) ve RA (retionik asid) sinyalleri de uzuv yenilenmesinde elzemdir (119).

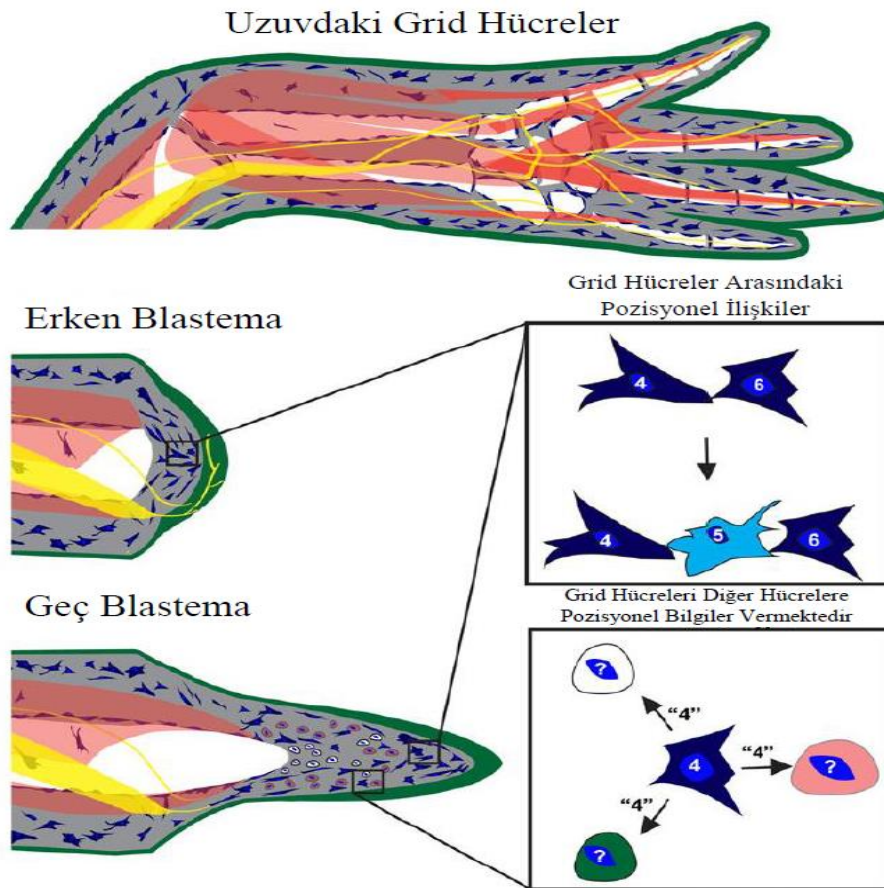


Şekil 4.4.1.2. Blastema'daki konum bilgilerinin stabilizasyonu sinir sinyali ile kontrol edilmektedir. (A) - (F) Graft hücrelerin kökenini (solda), aşılardan 1 ve 3 hafta sonra aşılansmış hücrelerin canlı görüntülerini (ortada) ve bütün yenilenen iskelet elemanlarını (sağda) açıklayan çizimler verilmiştir ve farklı blastema dokuları bir aksesuar uzuv modeline (ALM) aşılansığında büyüme yanıtı gösterilmiştir. (A) Ektopik uzuvlar arka cilt sapmış bir sinir ile ön yerleşimli bir yara bölgesine aşılansığında ALM'de üretilmektedir. (B) Erken blastema (EB) grafları, bir ALM'ye aşılansığında ektopik uzuvların oluşumuna neden olmaz; bununla birlikte, bir EB'nin denerve edilmesinden 3 gün sonra aşılansması, segmentlere ayrılmış ancak eksik bir rejenerat oluşumuna neden olmaktadır (C). (D) Geç

blastema'nın (Late-Blastema-LB) apikal ucunun grafları ektopik uzuvların oluşumuna neden olmamaktadır. (E) Denerve edilmiş EB'lere benzer şekilde denerve edilmiş apikal-LB'ler, segmentlere ayrılmaktadır ancak eksik rejeneratların oluşumunu indüklemektedir. (F) LB'nin bazal bölgesinin grafları, tamamen desenli ön/arka ve dorsal/ventral yapılaraya sahip ekstremite rejeneratlarının oluşumuyla sonuçlanmaktadır. (G) Mevcut model, EB ve apikal LB'deki konum bilgilerinin değişken veya plastik olması, konum bilgilerinin güdük ve bazal LB'de stabilize edilmesidir. Sinirlerden sinyaller çıkarılırsa, kararsız/plastik blastema hücrelerindeki konum bilgisi, eksik yapıların tam paterni araya

girmeden önce erken stabilize olmaktadır ve eksik bir rejenerasyona neden olmaktadır (bakınız C ve E). P, proksimal; D, distal; I, ara; S, Stabil; L, Labil (8, 115).

Ekstremitte rejenerasyonunun başlangıcında, güdük içindeki çoklu dokulardan gelen hücreler, farklılaşmış doku tiplerinin belirgin morfolojik özelliklerini kaybetmekte ve blastema hücreleri mezenkimal özelliklerini kazanmaktadır. Blastemaya katkıda bulunan güdük hücreleri, amputasyon düzleminde 1 mm'den daha küçük dokulardan kaynaklanmaktadır. Bir zamanlar farklı dokuların güdük içindeki nispi bollukları ile orantılı olarak blastemaya hücreler kattığı düşünülmesine rağmen, artık pozisyon belleğini tutan (bağ dokusundan türetilmiş) hücrelerin blastemaya orantılı olarak daha fazla hücre kattığı bilinmektedir. Konum hafızasına sahip olan ve hücreleri tutan bu hücreler, eksik uzuv yapılarının modelini oluşturan hücrelerdir (Şekil 4.4.1.3). Diğer hücre tipleri (örneğin, kas ve Schwann hücreleri) konumsal belleğe sahip değildir (8).



Şekil 4.4.1.3. Patern (desen) oluşturan grid hücreleri, desen takip eden hücrelerin davranışını yönlendirmektedir. Konum belleğini (koyu mavi) tutan hücreler, sağlam uzuvdaki tüm yapıları

hizalayan bağ dokularında bulunmaktadır. Uzuv kesildiğinde, AEC'nin altında birikmek ve etkileşmek (erken blastema) için uzuv üzerindeki farklı konumlardaki dokulardan grid hücreleri toplanmaktadır. Farklı konum bilgisine sahip grid hücreleri (ör. 4 ve 6), eksik konum bilgisine (yani 5) sahip hücrelere cevap üretmektedirler. Gelişimin daha sonraki aşamalarında (geç blastema), blastemanın bazal bölgesi farklılaşmaya başlamaktadır ve grid hücreleri, diğer desen takip eden hücre tiplerinin (örn. Kas, epitel ve Schwann hücreleri) davranışını yönlendirmek için konumsal ipuçları sağlamaktadır. Aynı zamanda, rejenerasyondaki daha uzak yapıların paternini üretmek için blastema'nın apikal ucunda konumsal etkileşimler oluşmaya devam etmektedir (8).

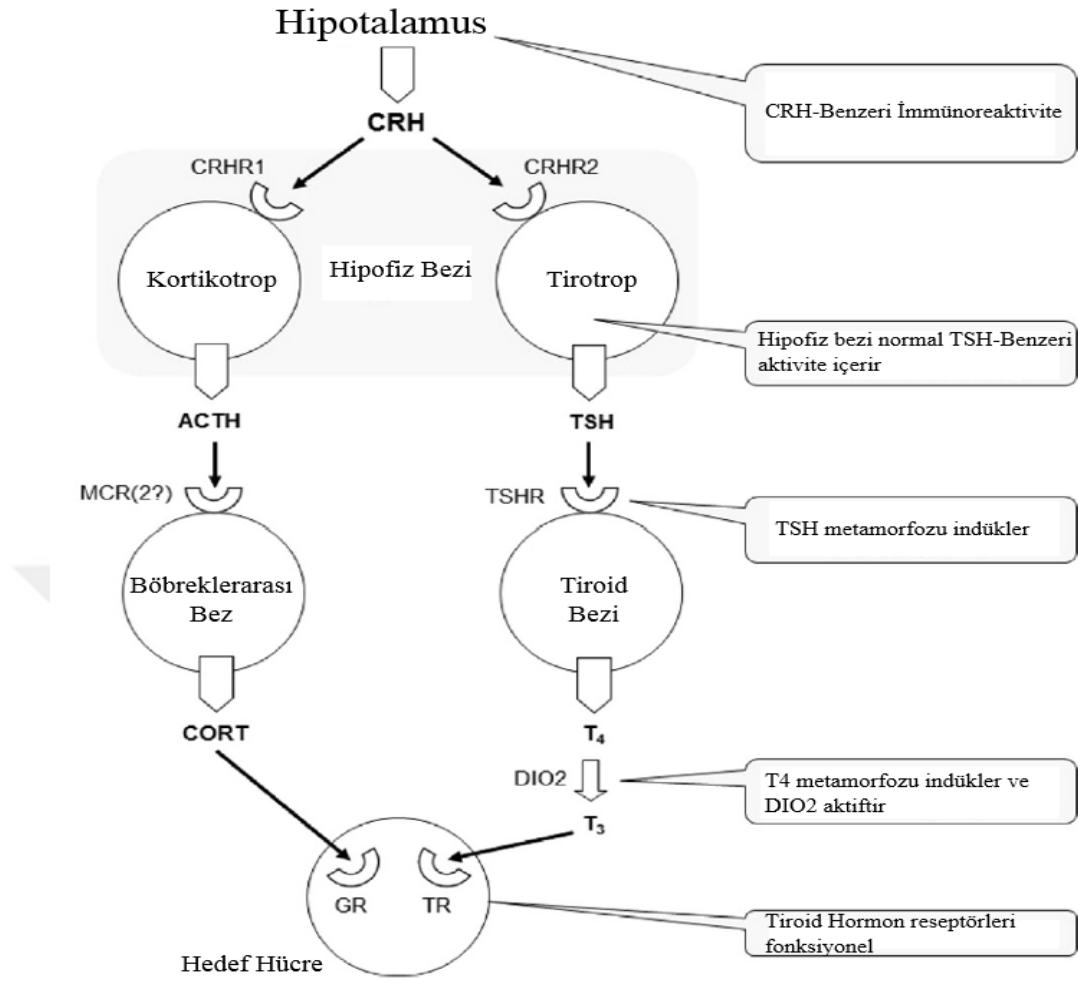
Aksolotl ekstremite rejenerasyonunda pozisyona özgü genler ile hücre orijini arasındaki ilişki araştırılmaktadır. Blastemanın yenilenmesinde Shh, Lmx1b ve Shox2 ifadesi araştırılmıştır. Shh, ön-arka eksen düzenlemek için bir blastemanın arka bölgesinden ve bir uzuv tomurcuğundan salgılanmaktadır. Lmx1b, gelişmekte olan bir uzuvdaki dorsal kimliği düzenlemektedir. Shox2, gelişen bir uzuv tomurcuğunun arka kısmında ifade edilmektedir. Shh ve Lmx1b yeniden ifadelerinin kökenleriyle tutarlı olduğu ortaya çıkarılmıştır. Posterior cilt, blastemaya Shh ifade eden hücreler sağlamaktadır ve Lmx1b pozitif hücreler dorsal deriden türetilmektedir. Proximodistal eksen ile ilgili olarak, Shox2 distaldan türetilmiş hücrelerde yeniden aktifleştirilebilmektedir, bu da proksodistal değerlerin esnek olduğunu göstermektedir. Çalışmadaki sonuçlar, orijinal hücre konumunun, yenilenen bir blastemada konumsal eksenlerin yeniden oluşturulmasını güçlü bir şekilde etkilediğini göstermektedir (120).

Özetle, Kol ve kuyruk gibi organlar blastema oluşmasıyla yenilenmektedir. Hücrelerin farklılaşması ve yenilenecek uzvun şekli bu yapının üzerinden belirlenmektedir. Kolun orijinal boyutuna ulaşarak yenilenmesi, (kesim yeri, hayvanın yaşı vb. kimi özellikler yüzünden farklılıklar göstermekle beraber) 1-2 ay sürmektedir. Blastema oluşumunda belirli günler çok önemlidir. Oluşum sırasında sırasıyla epitel oluşumu, sinirsel inervasyon, apikal epitel oluşumu, aynışma (dedifferentiation), çoğalma ve orijinal hale dönüşüm olayları gerçekleşmektedir. Blastema oluşumunda gen manipülasyonları için genellikle 7.-14. günler arası seçilmektedir. Aksolotl kol blastema gelişiminde epidermis, bağ dokusu, kas, kıkırdak, sinir farklılaşmamış blastema ve bölünen hücreler önemlidir (8).

4.4.2. Aksolotlda Metamorfoz

Son yıllarda aksolotl, evrimsel biyoloji, gelişimsel biyoloji ve rejeneratif biyoloji çalışmaları için popüler bir model organizmadır (103) ve 32 Gb (gigabaz çifti) genomunun yayınlanması bu model organizmanın kullanılabilirliğini artmaktadır (121). Aksolotlun kendine özgü yaşam döngüsü, amfibi metamorfozunun endokrin kontrolü çalışmalarında da kullanılmasına yol açmıştır. Birçok semender, suda yaşayan bir larvadan karasal bir yetişkine geçtiklerinde metamorfoza maruz kalırken, aksolotl kendiliğinden metamorfoz geçirmez ve ömrü boyunca sudaki bir yaşam tarzını korumaktadır. Hayvan, yetişkinlerde, cinsel olgunluğa sahip evresinde, paedomorfoz olarak bilinen dış solungaçlar ve yüksek kuyruk yüzgeci gibi genç dönem özelliklerini göstermektedir. Paedomorfoz, semenderlerin farklı soylarında birçok kez gelişmiştir, ancak altta yatan yakın nedenler türler arasında değişebilmektedir. Amfibilerde metamorfozun başarıyla tamamlanması tiroid hormonlarına (TH) bağımlıdır. Tiroid hormonları, gelişimsel süreçlerin altında yatan gen ekspresyon programlarını aktive etmektedir ve sonuçta metamorfozun karakteristik morfolojik, fizyolojik ve davranışsal değişikliklerine yol açmaktadır. 1913 yılında, Laufberger aksolotllarda metamorfozu ilk kez gerçekleştirmiştir. Daha sonra, çok sayıda başka çalışma, aksolotl metamorfozunu indüklemek için TH enjeksiyonunu veya yaşam sularına hormon eklenmesi yöntemlerini kullanmaktadır (9).

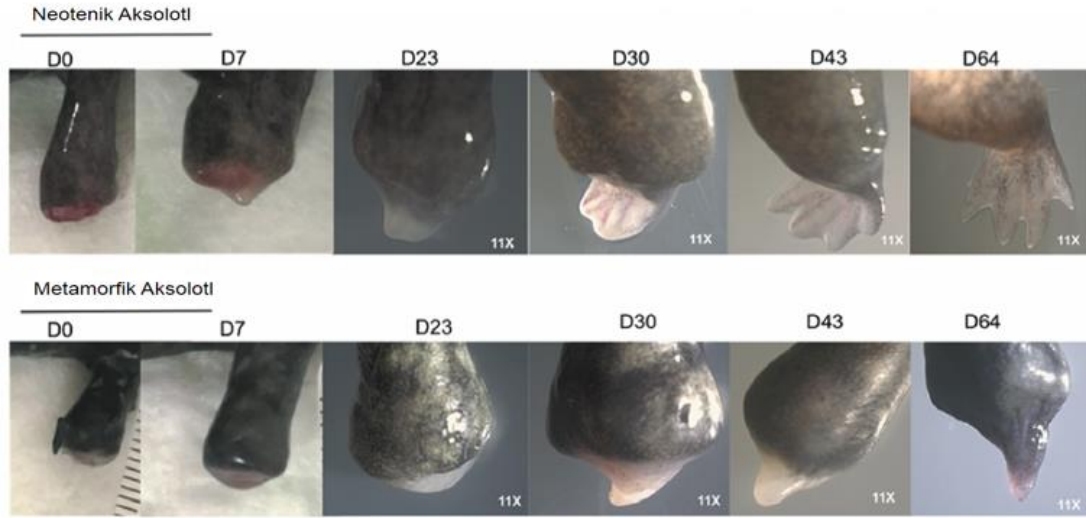
Aksolotl metamorfozu, memeli TSH (tiroid stimüle edici hormon) enjeksiyonuyla indüklenebilmektedir. TSH tedavisinin başkalaşım sağlayabildiği gerçeği, aksolotl içindeki HPT (hipotalamo-pineal-tiroid) ekseninin hipofiz seviyesinin “altında” işlevsel olması gerektiği anlamına gelmektedir (**Şekil 4.4.2.1**). Bu da, (i) tiroidal TSH reseptörlerinin TSH bağlanması ve sinyal iletimi yapabildiği; (ii) tiroid bezi, metamorfozu indüklemek için yeterli miktarda tiroksin (3,5,3', 5p-tetraiyodotironin, T4) üretebildiği, depolayabildiği ve serbest bırakabildiği; (iii) TH'ler dolaşım boyunca etkili bir şekilde taşınabildiği; (iv) T4, 3,5,3'-triiyodotironin (T3) 'e, deiodinasyon yoluyla kolayca aktive edildiği ve (v) hedef hücreler fonksiyonel TH reseptörlerine (TR'ler) ve taşıyıcılara sahip olduğu anlamlarına gelmektedir (9).



Şekil 4.4.2.1. Amfibilerde hipotalamo–hipofiz–böbrekleri bez eksenini (solda) ve hipotalamo–hipofiz–tiroidal eksenini (ortada) gösteren diyagram. Sağdaki etiketler, aksotl ile ilgili metamorfoz süreçlerini göstermektedir. ACTH, adrenokortikotropik hormon; CORT, kortikosteron; CRH, kortikotropin-salğılatıcı hormon; CRHR1, tip 1 CRH reseptör; CRHR2, tip 2 CRH reseptör; DIO2, tip 2 deiodinaz; GR, glukokortikoid reseptör; MCR2, tip 2 melanokortin reseptör; T3, 3,5,3' triiodotrionin; T4, tiroksin; TSH, tiroid-stimüle edici hormon; TSHR, tirotropin reseptör; TR, tiroid hormon reseptörü (9).

Aksotl, vücut büyüklüğü ve metamorfozun rejenerasyonu nasıl etkilediğini test etmek için ideal bir model organizmadır. Vücut büyüklüğü yetişkin aksotllarda rejenerasyonu etkilememektedir, ancak metamorfoz rejenerasyon oranında iki kat azalmaya neden olmaktadır ve aynı zamanda uzuvda şekil bozukluğuna yol açmaktadır. Metamorfik blastema hücreleri düşük proliferatif oranlara sahiptir. Ayrıca metamorfoza indüklenmiş aksotllarda yenilenme kapasitesinin ve başarısının metamorfoz öncesi duruma göre önemli bir azalma gösterdiği görülmüştür (Şekil

4.4.2.2). Metamorfozdan sonra, S-fazındaki blastema hücre sayısının azaldığı gösterilmiştir. Ayrıca metamorfoz sonrasında, yenilenme sürecinde kol rejenerasyonunun durduğu ya da etkinliğinin azaldığı gösterilmiştir (122).



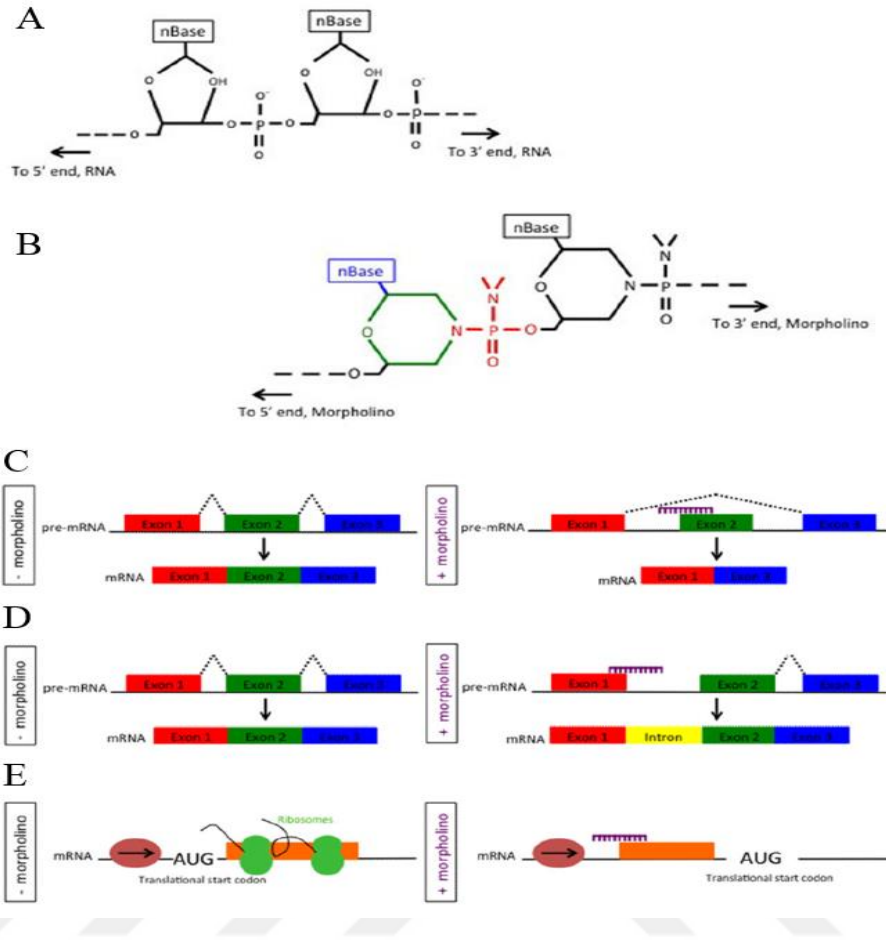
Şekil 4.4.2.2. Üstteki resim metamorfoza uğramamış aksolotlda (neotenic Aksolotl) kol yenilenmesini gösterirken; alttaki resim metamorfoz sonrası kol yenilenmesini göstermektedir. Metamorfik aksolotldaki rejenerasyon kaybı 64 güne kadar takip edilmiştir (123).

4.4.3. Aksolotlda Gen İnhibisyon Sistemleri

Aksolotllar genetik manipülasyon için kapsamlı bilgi sunduklarından dolayı yaygın olarak kullanılmaktadır. Bir semender türü olan aksolotl, uzuvlarını, kuyruklarını ve solungaçlarını iz bırakmadan yenileyebilmektedir. Bu karmaşık yapıların rejenerasyonu, çoğalmış dediferansiye hücreler ve önceden var olan progenitör ve kök hücrelerin bir kütlesi olan bir blastema oluşumu ile gerçekleşmektedir. Uzuv blastemanın transkripsiyonel profili, bugüne kadar büyük ölçüde karakterize olmayan uzun aday gen listelerini üretmiştir (124). Transkriptomik, fonksiyonel genomik, viral ve transgenез yaklaşımlarını kullanan çalışmalar rejenerasyon için gerekli olan birtakım genleri ortaya çıkarmıştır. Bu yöntemler, aksolotlda rejenerasyonu kontrol eden önemli gen düzenleyici ağların daha fazla araştırılması için sağlam bir temel sağlamaktadır. Transgenез (canlı bir organizmaya transgen adı verilen eksojen bir genin sokulması) sistemdeki son ilerlemenin önemli bir yönü olmuştur ve şimdiye kadar I-Sce1 ve transgenlerin sokulması için transpozon bazlı yöntemlere dayanmaktadır. Bu yöntemler, rejenerasyon sırasında kas uydu hücrelerinin genetik kaderini incelemek, omurilikte hücre döngüsünü bloke etmek ve beyaz mutant

aksolotlarda pigment hücresi kusurlarını incelemek için kullanılmıştır (125). Aksolotlda organ yenilenmesini aydınlatmak için son yıllarda birçok gen inhibisyon tekniği kullanılmaktadır. Bunlardan bazıları CRISPR/Cas9 sistemi (125), siRNA inhibisyon sistemi (126) ve morfolino sistemidir (10, 11, 127). Bu teknikler maliyet, kolaylık ve etkinlik açısından birlikte değerlendirildiğinde ve CRISPR/Cas9 sisteminin son yıllarda *in vivo* limitasyonlarının çokça çalışıldığı göz önüne alındığında en ideal tekniğin **morfolino sistemi** olduğu düşünülmektedir (128). Morfolino sistemi kullanılarak yapılan inhibisyonlar sonucunda aksolotl kol ve kuyruk yenilenmesinde görev alan bazı proteinler belirlenmiştir (10, 11).

Morfolinolar (Morfolino oligo-MO), transkripsiyon başlangıç bölgesinde veya mRNA'ların ek yerlerinde kısa sekansları (yaklaşık 25 nükleotit) tanıyan ve bağlayan ve böylece mRNA'nın translasyonunu veya uygun bir şekilde eklenmesini bloke eden nükleotit analoglarıdır (129). Morfolino oligonükleotitlerin yapısı ve morfolinoların mRNA bloklaması **Şekil 4.4.3.1**'de gösterilmektedir (130).



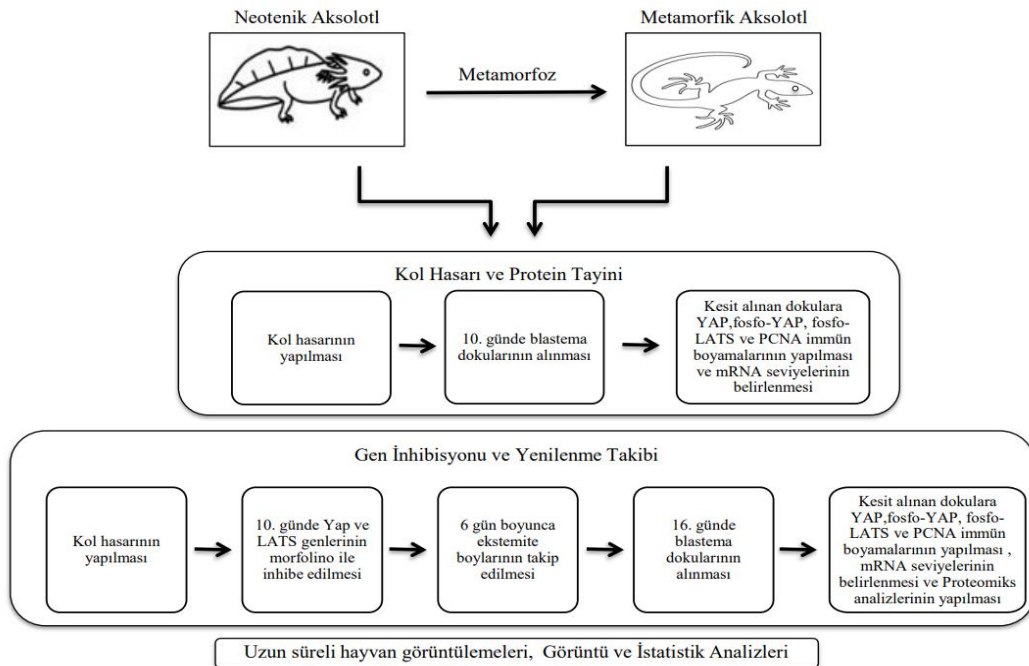
Şekil 4.4.3.1. Morfolino oligonükleotitlerin yapısı ve morfolinoların mRNA bloklaması. (A) RNA oligonükleotid. (B) Morfolino oligonükleotid. Yeşil halka, (A) 'da gösterilen riboz halkalarının yerini alan 6 üyeli morfolino halkasını (B) temsil eder. İyonik olmayan fosfodiadidat bağlantıları (B, kırmızı), (A) 'daki fosfodiester bağının yerini alır. NBase (mavi) dört standart bazdan herhangi biri olabilir (Adenin, Sitosin, Guanin veya Timin). (C) Uç birleştirme (Splice)-bloke eden Morfolino Oligo (MO). MO olmadan, mRNA'nın normal birleşme meydana gelir. MO (mor), anormal şekilde eklenmiş bir ürün (ekson silme) ile sonuçlanan ek yeri akseptör (splice acceptor) bölgesini hedefler. (D) İntron inklüzyonunun oluşturulması. (E) Çeviri engelleme MO. MO, çeviri başlangıç bölgesinin bir dizisini (5') hedefler ve çeviri başlatma kompleksinin ilerlemesini engeller (130).

MO'lar çeşitli model organizmalarda, özellikle kurbağa *Xenopus laevis*'te, tavukta, aksolotlda, zebra balığında, deniz kestanesinde ve deniz anemonu *Nematostella* da gen inhibisyon çalışmaları için kullanılmaktadır. MO'lar mRNA moleküllerinin translasyonel başlangıç bölgesine bağlanır ve böylece bölge bloke edilir; ayrıca mRNA birleştirme işlemine müdahale etmek veya mRNA'ları mikroRNA aracılı kayıplardan korumak için tasarlanabilirler. Tüm sekans temelli müdahale araçlarında olduğu gibi, MO'lar prensip olarak hedef dışı etkilere eğilimlidir. Sistem için genel

olarak iyi çalışan yeterli kontrol kriterleri oluşturulmuştur. Gen düzenleme nükleazları, gelişimsel biyolojide devrim yaratmayı vaat eder, ancak en azından şimdilik birçok uygulamada MO'ların yerini alamamaktadır. İdeal bir senaryo, mümkünse, MO'ların diğer genetik araçlarla (mutantlar, CRISPR, baskın negatif reaktifler, vb.) birlikte kullanımını içermektedir. İki veya daha fazla farklı yaklaşım kullanarak aynı sonucu elde etmek, bilim için ne kadar iyi yapılırsa yapılsın, herhangi bir yaklaşımdan çok daha iyidir. MO'lar, birçok benzersiz avantaja sahiptir (131). Kararlılık, nükleaz direnci, etkinlik, uzun süreli aktivite, suda çözünürlük, düşük toksisite ve eşsiz özgüllük özelliklerini birleştiren başka gen yıkma reaktifi (siRNA, PNA, mPNA, S-DNA ve LNA dahil) yoktur. Tüm bunları sadece Morfolino oligoları sağlamaktadır. Morfolinolar, RNAi, siRNA ve fosforotioat esaslı oligolardan çok daha iyi özgüllük sağlamaktadır ve katastrofik hedef dışı antisens etki olasılığını büyük ölçüde azaltmaktadır. Argonaute-bağımlı RNAi veya RNase-H-bağımlı antisens tarafından kullanılan katalitik proteinler, RNA için gen ekspresyonunun 7 tamamlayıcılık bazından daha az bir bazda modüle edilmesine izin verirken, bir Morfolino'nun gen ekspresyonunu düşürmek için hedefi ile birlikte yaklaşık 15 tamamlayıcılığa ihtiyacı vardır. Tipik olarak sentezlenen 25 baz Morfolinolar öylesine etkilidir ki, translasyonu bloke eden Morfolinolar genellikle gen ekspresyonunu Western blot tarafından saptanamayan seviyelere düşürmektedir. Morfolinonun eşsiz özgüllüğü, embriyolarda kullanım için son derece düşük toksisiteye sebep olurken, hedef dışı gen modülasyonu, siRNA'yı çoğu embriyonik sistemde kullanılamaz hale getirmektedir (132).

5. YÖNTEM VE GEREÇLER

Hippo yolağının işlevselliğinin incelenmesi için yapılan tezde Aksotl gibi yenilenme kapasitesi yüksek olan ve metamorfoza uğrayabilen bir canlının kullanılmasındaki amaç, rejenerasyon yeteneğinin metamorfoz ile değişmesi ve neotenik ve metamorfik aksotloların birbirleriyle karşılaştırılabilecek olmasıdır. Tezde, neotenik ve metamorfik hayvanlara kol hasar modeli yapılmıştır. 10 gün sonra blastema dokusu alınarak YAP ve LATS proteinlerinin mRNA seviyeleri belirlenmiştir. Aynı gün alınan dokularda fosfo-YAP, fosfo-LATS, YAP immün boyamaları yapılmıştır. Metamorfik ve neotenik aksotloların bir kısmında ise hasar modelinden sonra morfolino sistemi kullanılarak YAP ve LATS RNA'larının yıkılması ve proteine dönmesinin inhibisyonu yapılmıştır. İnhibisyon sonrası 6 gün beklenilmiştir. Hem metamorfik hem neotenik aksotlolarından 6 gün sonra alınan dokularda; mRNA seviyeleri belirlenmiştir, fosfo-YAP, fosfo-LATS, YAP immün boyamaları ile beraber proteomiks analizleri de yapılmıştır. Ayrıca bu proteinlerin doku lokalizasyonları ve pozitiflik oranları belirlenmiştir. Hippo yolağı çoğalma süreçlerini de yönettiği için tüm deney gruplarında çoğalma belirteci olarak PCNA (proliferating cell nuclear antigen) antikoru kullanılmıştır. Teze ait deney akış şeması **Şekil 5.1**'dedir. Deney grupları **Tablo 5.1**'dedir.



Şekil 5.1. Tez çalışmasının tamamlanmasında izlenen yöntem

Tablo 5.1. Tezde kullanılan deney grupları ve gruplarda yapılan teknik türleri

	Gün 7 (morfolino yok)	Gün 10 (morfolino yok)	Gün 16 (YAP morfolino, LATS morfolino ve kontrol grupları)
Neotonik Aksolotl	Gerçek zamanlı kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu	Gerçek zamanlı kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu ve immün boyama	Gerçek zamanlı kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu, immün boyama ve proteomiks
Metamorfik Aksolotl	Gerçek zamanlı kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu	Gerçek zamanlı kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu ve immün boyama	Gerçek zamanlı kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu, immün boyama ve proteomiks

5.1. Malzemeler

Çalışmamızda kullanılan sarf maddeleri marka ve katalog numaraları ile birlikte tablo 5.1.1.' de gösterilmektedir.

Tablo 5.1.1. Kullanılan sarf malzemeleri

Sarf Malzemeler	Firma Adı	Katalog Numarası
T3 - 3,3',5-Triiodo-L-thyronine	Sigma	T2877
T4 - 3,5,3', 5p-tetraiyodotironin	Abdi İbrahim	Levotiron (150 mcg)
NaCl	Sigma	S9888
NaHCO ₃	Sigma	S6014
KCl	Sigma	P9541
MgSO ₄ .7H ₂ O	Sigma	M2773
CaCl ₂ .2H ₂ O	Sigma	C7902
Benzocaine	Sigma	E1501

PBS (Phosphate Buffer Saline)	PanBiotech	P04-36500
GFP plazmid	Addgene	11150
Polyethilenamine (PEI)	Sigma	408727
Fetal Bovine Serum (FBS)	ThermoFisher Scientific	16140071
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	ThermoFisher Scientific	41965039
RNAzap	ThermoScientific	AM9780
RNA izolasyon kiti (Total RNA Purification Kit)	Norgen	37500
Trizol	İnvitrogen	15596018
Kloroform	Sigma	288306
Etanol	Merck	100986
NFW (nuclease free water)	Qiagen	129115
Komplementer DNA sentez kiti (ProtoScript First Strand cDNA Synthesis Kit)	NEB	E6300S
MyTaq DNA polimeraz	Bioline	BIO21105
Agaroz	Merck	A4719
SensiFAST™ SYBR® No-ROX Kit	Bioline	BIO-98005
Üzeri yapışkan kaplama (Microseal B Adhesive Sealer)	BIO RAD	MSB-1001
Pozitif şarjlı lamlara (Superfrost Plus)	ThermoScientific	J1800AMNZ
Antikor sulandırma solüsyonu (Antibody Diluent Reagent)	Life Technologies	003118
Fosfo-YAP birincil antikor	Cell Signalling Technology	4911
Fosfo-LATS birincil antikor	Cell Signalling Technology	8654
YAP birincil antikor	Cell Signalling Technology	4912
PCNA birincil antikor	Millipore	MABE288
GAPDH birincil antikor	Sigma	G8795
Keçi-anti Tavşan İkicil Antikor Alexa Flour 594 Plus	Invitrogen	
Keçi-anti Fare İkicil Antikor Alexa Flour 633 Plus	Invitrogen	A11037
Doku dondurma sıvısı (Tissue Freezing Medium)	Leica	14020108926
PAP PEN	Invitrogen	008877

PFA	Sigma	158127
Bloklama solüsyonu	ThermoFisher	37520
Kaplama solüsyonu (Mounting Medium)	Sigma	C9368
Triton TX-100	Sigma	T8787
H ₂ O ₂	Sigma	H1009
RIPA (5X RIPA Buffer With Protease Inhibitor Coctail Reagent)	MyBioSource	MBS169028
Akrilamid/BisAkrilamid	Ambion	AM9022
APS	Sigma	A3678
TEMED	Biofroxx	8027ML100
Trizmabase	Sigma	T1503-500G
HCl	Merck	109057
NaOH	Merck	106462
4X Laemli Yükleme Tamponu	BIO-RAD	1610747
Protein Belirteci	BIO-RAD	1610374
Glisin	Sigma	G8898
NaCl	Sigma	S9888
MetOH	Merck	100837
SDS	Sigma	L3771
10 µl pipet ucu	Gilson	F161631
200 µl pipet ucu	Gilson	F161931
1000 µl pipet ucu	Gilson	F161670
15 ml falkon	Nest	NST-601051
50 ml falkon	Nest	NST-602002
PVDF membran	GVS	1214429
FilterPaper	BIO-RAD	1703932
ECL	BIO-RAD	1705061
A/G Sefaroz boncuklar	GE Healthcare	17-0618-01
Beta merkaptoetanol	BIO-RAD	1610710
ComassiveBrillant Blue	Merck	115444
Aseton	Merck	100014
Yağsız Süt Tozu	AppliChem	A0830,0500
BSA	Bioshop	ALB001.100
Tavuk serumu	ThermoFisher	16110082
Anti-Rabbit IgG, HRP- linked Antibody	Cell Signalling Technology	7074
Anti-Mouse IgG, HRP conjugated Antibody	GenDEPOT	W3903
FASP (Filter-aided sample preperation – Filtre- yardımlı örnek hazırlama)	Abcam	ab270519

5.2. Cihazlar

Çalışmalarda kullanılan cihazlar: diseksiyon Mikroskobu (Zeiss - StereoV8), ışık mikroskobu AxioZoom V16 (Zeiss), konfokal mikroskobu (Zeiss, LSM800 Confocal), elektroporasyon cihazı (NEPA21 Type II Electroporator), mikrosantrifüj (ThermoFisher Scientific – MicroRL 21R), ısıtma kalıbı (Heat block – Hangzhou Miu Instruments), vorteks (Daihan Scientific – VM-10), NanoDrop (NanoDrop One – ThermoFisher Scientific), PZR Thermal Cyler (BioRad – T100) cihazı, qRT-PCR CFX Connect-Real Time System (BIO RAD) cihazı, kemilüminisans cihazı (ChemiDoc MP Imaging System (Bio-Rad)), doku kesim için Cryostat CM1950 (Leica), protein konsantrasyonları ölçüm cihazı (Qubit 2.0 (Thermo Fisher Scientific)), kütle spektrometresi için SYNAPT2-Si (Waters) ve ACQUITY UPLC (Waters) sistemleri, bilgisayarlı tomografi U-CT (MiLabs).

5.3. Metamorfoz

Tezde kullanılan aksolotllar, İstanbul Medipol Üniversitesi Tıbbi Araştırma Merkezi'nden temin edilmiştir. Yapılan güç analizine (power analysis) göre, tez süresince 48 adet vahşi tip (wild type) aksolotl (*Ambystoma mexicanum*) kullanılmıştır. Bu aksolotllardan 12 tanesi neotenik formda kullanılırken, diğer 36 tanesi ise metamorfoza indüklenmiştir. Aksolotllar doğumlarından 1 ay sonra ayrı ayrı kaplara alınmıştır. Deneyler sürecinde neotenik ve metamorfik aksolotllar 18 °C'de tutulmuştur. Bu çalışma için gerekli izin ve onay İstanbul Medipol Üniversitesi hayvan deneyleri yerel etik kurulundan (İMÜ-HADYEK) alınmıştır. Tezde aksolotl metamorfozu için 25 nM T3 (3,3',5-Triodo-L-thyronine – Sigma) kullanılmıştır. T3 distile su ile hazırlanıp aksolotl kaplarına konulur. 4 hafta sonra T3 konsantrasyonu 5 nM'a düşürülür. T3, 4-6 hafta arasında haftada 1 kere verilir. T3 kullanımı sonrası meydana gelen hayvan ölümleri nedeniyle T4 (3,5,3',5p-tetraiyodotironin- (Levotiron (150 mcg) – Abdi İbrahim)) kullanılarak da metamorfoz yapılmıştır. Levotiron (T4) 25 mM olacak şekilde distile suda çözündürülür. Haftada 2 ya da 3 kez hayvan başına 25 nM olacak şekilde hayvanların suyuna (1 litre) hormon eklemeleri yapılır. T4 uygulaması da T3 uygulaması gibidir. T4 ile yapılan metamorfoz 3-4 ay sürmektedir. Bütün uygulamalarda distile su ile Holtfreter's solüsyonu (içindeki kimyasallar **Tablo 5.3.1'**dedir) karıştırılmıştır (133). Bütün uygulamalarda; deri dökülmeleri, solungaç

çekilmesi ve kuyruk kalınlığı takibi yapılmıştır. Metamorfoz olduktan sonra (solungaçlar tamamen çekildikten sonra) aksolotlların suları 250-500 mililitre civarına düşürülmelidir.

Tablo 5.3.1. Holfreter's solüsyonunun hazırlanması için gerekli kimyasallar. Tabloda verilen değerler 1136 litre solüsyonun hazırlanması için gereken miktarlardır.

Sarf Malzemeler	Miktar	Firma Adı	Katalog Numarası
NaCl	1589.7 gram	Sigma	S9888
NaHCO ₃	90.8 gram	Sigma	S6014
KCl	22.7 gram	Sigma	P9541
MgSO ₄ .7H ₂ O	181.7 gram	Sigma	M2773
CaCl ₂ .2H ₂ O	90.8 gram	Sigma	C7902

5.4. Kol hasarı

Metamorfik ve neotonik aksolotllarda, hasar modeli oluşturmak için oluşturulan yöntemlerden biri de kol kesilmesidir. Öncelikle hayvanlar bayıltılmak için, suda çözdürülmüş %0.03 Benzocaine (Sigma – E1501) içerisine konulur. Anestezi kontrolü için cımbızlarla hayvanın kolları sıkıştırılır. Hayvanlar diseksiyon mikroskobuna alınır (Zeiss - StereoV8) ve neşter yardımıyla ön kol yarısından kesilir. Bu noktada hayvanın ön kolunun 1/3'lük kısmı da kesilebilir. Bu tezde kullanılan hayvanlarda ön kolun yarısı kesilmiştir. Ön kol ölçümü yapılırken parmak uzunlukları ihmal edilir. Kemik ve kemik kalıntılarının uzaklaştırılması için kemikler kırılır. Kol kesiminden sonra kanama meydana geldiği için, kol pamukla silinir. Hayvanlar temiz suyun bulunduğu kaplara geri bırakılır (134).

5.5. Morfolino Dizaynı

Morfolino mRNA seviyesinde bloklama yapabilen kimyasal bir inhibisyon yöntemidir. Morfolino dizaynı için öncelikle, YAP ve LATS proteinlerinin sekans bilgileri axolotl-omics (<https://www.axolotl-omics.org/blast>) sitesinden alınmıştır. Morfolino dizaynı ve sentezi GeneTools tarafından yapılmıştır. Şirketten gelen sekans bilgileri dört farklı biyoinformatik araçla kontrol edilmiştir. Bunlar:

- 1) https://www.gene-tools.com/choosing_the_optimal_target
- 2) <http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html>

- 3) <https://www.eurofinsgenomics.eu/en/ecom/tools/oligo-analysis.aspx>
 4) <https://www.genscript.com/tools/oligo-primer-calculation>

Etkinlik kontrolü sonrası morfolino sentezi yine GeneTools tarafından yapılmıştır. 2 µl morfolino blastemalara Hamilton enjektörü (SGE 025RN, 25 GA 50MM) vasıtasıyla enjekte edilmiştir. 1 mM morfolino elde etmek için, morfolino tozları 2 X PBS (Phosphate Buffer Saline, PanBiotech- P04-36500) ile sulandırılmıştır. Enjeksiyondan önce morfolinolar 500 µM olarak hazırlanmıştır.

5.6. Elektroporasyon

Morfolinolar enjeksiyon yapıldıktan sonra, kimyasalın dokuların içine nüfuz edebilmesi için por açma ve transfer amaçlı elektroporasyon yapılmaktadır. Aksolotl çalışmalarında elektroporasyon sıkça kullanılmaktadır. Aksolotllar, %0.03 Benzocaine kullanılarak anestezi altına alınır. Sonrasında hayvanlar elektroporasyon işlemi için soğuk PBS içine alınır. Elektroporasyon için NEPA21 Type II Electroporator kullanılmıştır. Por açmak ve transfer yapmak için kullanılan ayarlar **Tablo 5.6.1**'dedir.

Tablo 5.6.1. Elektroporasyon için uygulanan protokol. Literatürdeki mevcut elektroporasyon protokolü kullanılmıştır.

Voltaj (V)	Vuruş uzunluğu (milisaniye)	Vuruş aralığı (milisaniye)	Vuruş sayısı	Azalma oranı (%)	Kutupsallık
POR AÇMA İÇİN VURUŞ					
150	5	10	3	0	+
TRANSFER VURUŞU					
50	50	950	5	0	+

Elektroporasyon etkinliğinin belirlenmesi için elektroporasyon protokolü *in vivo* olarak uygulanmıştır. Bu amaçla GFP plazmidi (Addgene – 11150) aksolotl blastema

dokusuna Hamilton enjektörü ile enjekte edilmiştir. Enjeksiyon sonrası yukarıda ayarları bulunan elektroporasyon protokolü dokulara uygulanmıştır. Plazmid verilen dokuların enjeksiyon öncesi ve enjeksiyondan sonraki 4. ve 7. gününde AxioZoom V16 (Zeiss) mikroskobu kullanılarak floresan fotoğrafları çekilmiştir. Kullanılan plazmidin etkinliği için de HEK293T hücrelerine Polyethilenamine (PEI, Sigma – 408727) kullanılarak plazmid transfekte edilmiştir. Kullanılan PEI 10 miligram/mililitre olacak şekilde distile su ile hazırlanmış ve 0.22 µm filtrelerden geçirilmiştir. PEI ile transfeksiyon protokolü aşağıdaki gibidir:

1. %80 oranında petriyi doldurmuş olan hücreler, 1:4 oranında yeni cam petriye ekildi.
2. Ertesi gün %60 yoğunluğa ulaşan petri seçildi.
3. Hücrelere taze %2 Fetal Bovine Serum (FBS, ThermoFisher Scientific – 16140071) eklendi ve 2 saat inkübasyona bırakıldı
4. 520 µl Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, ThermoFisher Scientific – 41965039) , 5 µgram plazmid DNA'sı ve 30 µl PEI aynı tüpe konuldu ve yavaşça karıştırıldı.
5. Hazırlanan karışım hücrelerin üzerine yavaşça konuldu ve 4 saat inkübe edildi.
6. PEI, plazmid DNA'sı ve DMEM içeren besi yeri, %2 FBS içeren yeni DMEM ile değiştirildi. Ertesi gün FBS oranı %10'a çıkarıldı.
7. 72 saat sonra konfokal mikroskobunda (Zeiss, LSM800 Confocal) görüntüleme yapıldı.

5.7. RNA İzolasyonu ve komplementer DNA sentezi

Kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu ile örneklerde ki mRNA seviyeleri belirlenmektedir. Bu reaksiyon öncesinde dokulardan total RNA izolasyonu yapılmaktadır. RNA izolasyonundan sonra, RNA zincirleri komplementer DNA' ya çevrilmektedir. Total RNA izolasyonu için Trizol yöntemi kullanılmıştır. Çalışmanın ilerleyen aşamalarında RNA izolasyon kiti (Norgen- Total RNA Purification Kit – 37500) temin edildiği için çalışmaya bu kit ile devam edilmiştir. Trizol kullanılarak yapılan RNA izolasyon protokolü:

- 1) Dokular önce sıvı azota alınır, sonrasında -80 °C'de muhafaza edilir.

- 2) Deneye başlamadan önce RNAzap (ThermoScientific – AM9780) ile kullanılacak malzemeler ve laboratuvar alanı temizlenmelidir.
- 3) Santrifüj +4 derecede olmalı; ısıtma kalıbı (Heat block – Hangzhou Miu Instruments) 60 dereceye ayarlanmalı, sıvı azot, buz, 5 ml’lik enjektör, havan, bisturi, cımbız, tüpler (2 ml’lik ependorf-3 adet) ve solüsyonlar hazır tutulmalıdır.
- 4) Havana bir miktar sıvı azot alınır ve dokular yavaşça ezilerek toz haline getirilir.
- 5) Sıvı azotta soğutulan bisturi ile kapağı delinerek sıvı azotta soğutulan ependorfa örnekler alınır. Tüp sıvı azota tekrar alınır ve sıvı azotta bir süre bekletilir.
- 6) Örneklerin bulunduğu tüplere yeni kapaklar takılır (delik kapakların yerine). 1 ml Trizol (İnvitrogen-15596018) eklenir (50-100 mg doku başına).
- 7) Örnekler 5 saniye vortekslendikten (Daihan Scientific – VM-10) sonra 2 dakika oda sıcaklığında inkübe edilir. Enjektör ile mekanik parçalama için al-ver (tritürasyon) yapılır ve 2 dakika oda sıcaklığında bekletilir.
- 8) Trizol miktarının 1/5’i kadar (200 μ l) kloroform (Sigma – 288306) (oda sıcaklığında) eklenir. Ardından 15 saniye vorteks yapılır. Bu aşamada faz ayrımı görülmektedir. Faz ayrımı görülmezse yukarı-aşağı yapılabilir. 2-3 dakika inkübasyona bırakılır. Üst fazda RNA bulunmaktadır.
- 9) 15 dakika 14000 G’de (ThermoFisher Scientific – MicroRL 21R) (4 derecede) santrifüj edilir.
- 10) Üst faz yeni tüpe alınır.
- 11) Trizol miktarının 1/2 si kadar (yani 500 μ l) isopropanol (Sigma - I9516) eklenir. 15 dakika oda sıcaklığında inkübe edilir.
- 12) İnkübasyon sonrasında 15000 G’de 10 dakika santrifüj edilir. Süpernatant atılır.
- 13) Trizol miktarı kadar (1 ml) etanol (Merck - 100986 - %75 absolute etanol) eklenir. Hemen 8000 G’de 5 dakika santrifüj yapılır. Bu aşamada kesinlikle vortex yapılmaz.
- 14) Santrifüj sonrası üst faz atılır ve pellet bölgesi işaretlenir. Çünkü etanol uçtuğunda pellet görünmesi zordur. 5 dakika havada kuruması sağlanır. Tüpler

ters bırakılır. Etanolün ve suyun tamamen uçması istenmez çünkü sonraki adımda RNA çözülmesini zorlaştırır. Varsa büyük damlalar pipetle alınır.

- 15) 10 µl (örneğe göre 25 µl) NFW (Qiagen - 129115 - nuclease free water) ile çözünür ve direk buza alınır.
- 16) Örnekler sıcaklık kalıbında 60 derecede 10 dakika inkübe edilir. Ardından direkt buza alınır ve NanoDropta (NanoDrop One – ThermoFisher Scientific) ölçüm yapılır.
- 17) RNA'lar birkaç gün içerisinde kullanılacaksa -20 °C'de saklanabilir. Uzun süre sonra kullanılacaksa -80 °C'de saklanır.

RNA izolasyonunda klasik yöntem ek olarak kit de kullanılmıştır. Kitin içerisinde bulunan şirketin önerdiği protokol takip edilmiştir. Protokol aşağıdaki gibidir:

- 1) Dokular önce sıvı azota alınır, sonrasında -80 °C'de muhafaza edilir.
- 2) Deneye başlamadan önce RNAzap (ThermoScientific – AM9780) ile kullanılacak malzemeler ve laboratuvar alanı temizlenmelidir.
- 3) Havana bir miktar sıvı azot alınır ve dokular yavaşça ezilerek toz haline getirilir.
- 4) Toz haline getirilen parçalar yeni ependorfa alınır ve parçaların üzerine 600 µl Buffer RL eklenir. 5-10 kere steril insülin enjektörü ile al-ver işlemi yapılır.
- 5) Hücre artıklarının çökmesi için örnekler 2 dakika boyunca döndürülür (Daihan Scientific) (spin down). Üstte kalan sıvı kısım yeni tüpe aktarılır.
- 6) Örneklerin üzerine 600 µl %70 etanol eklenir. Bu karışım vortekslenir.
- 7) Karışımdan 600 µl alınıp koleksiyon tüplerine eklenir ve 1 dakika boyunca 3500 G'de santrifüj edilir. Bu işlem kalan karışım için tekrarlanır.
- 8) Kolonlara 400 µl yıkama solüsyonu A eklenir ve 1 dakika boyunca santrifüj edilir. Bu işlem 3 kere tekrarlanır.
- 9) En son yıkamadan sonra tüpler boş bir şekilde 5 dakika santrifüj edilir. Bu işlemin ardından tüpler 2 dakika ağzı açık şekilde bekletilir.
- 10) Kolonlara 50 µl elüsyon solüsyonu A eklenir ve 200 G'de 2 dakika santrifüj edilir. Ardından 1400 G'de 1 dakika santrifüj yapılır.
- 11) Örnekler direkt buza alınır ve NanoDropta (NanoDrop One – ThermoFisher Scientific) ölçüm yapılır.

12) RNA'lar birkaç gün içerisinde kullanılacaksa -20 °C'de saklanabilir. Uzun süre sonra kullanılacaksa -80 °C'de saklanır.

RNA izolasyonlarından sonra polimeraz zincir reaksiyonlarında kullanılması için RNA'lar komplementer DNA'lara çevrilir. Bunun için de kit kullanılmıştır (NEB – ProtoScript First Strand cDNA Synthesis Kit – E6300S). Sentez için uygulanan protokol tedarikçi firmanın önerdiği protokoldür:

- 1) RNA örnekleriyle primer d(T)₂₃ VN karıştırıldı. RNA miktarı en fazla 6 µl olmalıdır. Deney gruplarında kullanılan RNA miktarları **Tablo 5.7.1**'dedir.
- 2) Opsiyonel olarak sunulan RNA denatürasyonu 70 °C'de 5 dakika boyunca yapılır.
- 3) Sonrasında 10 µl M-MuLV reaksiyon karışımı ve M-MuLV enzim karışımı örneklerle eklenir.
- 4) Komplementer DNA sentezi için örnekler sırasıyla; 25 °C'de 5 dakika, 42 °C'de 1 saat ve 80 °C'de 5 dakika inkübe edilir. Enzim inaktivasyonu için 80 °C'de 5 dakika inkübasyon yapılır. Polimeraz zincir reaksiyonları için, sentezlenen DNA'lar en az 1/10 oranında kullanılır.

Tablo 5.7.1. Deney gruplarında kullanılan RNA miktarları

Deney Grupları (Neotonik ve Metamorfik)	Kullanılan RNA miktarı (nanogram)
Morfolino Etkinlik Grubu	315
Gün 7 grubu	303,3
Gün 10 grubu	322
Gün 16 grubu	600

Sentezlenen cDNA'lar, klasik polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile kontrol edildi. Bu amaçla MyTaq DNA polimeraz (Bioline – BIO21105) kullanıldı. PZR Thermal Cycler (BioRad – T100) cihazı ile yapıldı. PZR sonrası ürünler %2'lik agaroz (Merck, A4719) jelde yürütüldü. Jelin hazırlanması ve yürütülmesinde 1X TAE solüsyonu kullanıldı. Jel, 100 voltta 20 dakika yürütüldükten sonra ChemiDoc MP Imaging System (Bio-Rad) cihazı ile görüntülemeleri yapıldı. MyTaq kullanılarak yapılan PZR reaksiyonunda kullanılan karışım miktarları **Tablo 5.7.2**'dedir. Polimeraz zincir reaksiyonunda kullanılan ayarlar ise **Tablo 5.7.3**'tedir.

Tablo 5.7.2. MyTaq DNA polimeraz kullanılarak yapılan Polimeraz zincir reaksiyonunda kullanılan karışım miktarları.

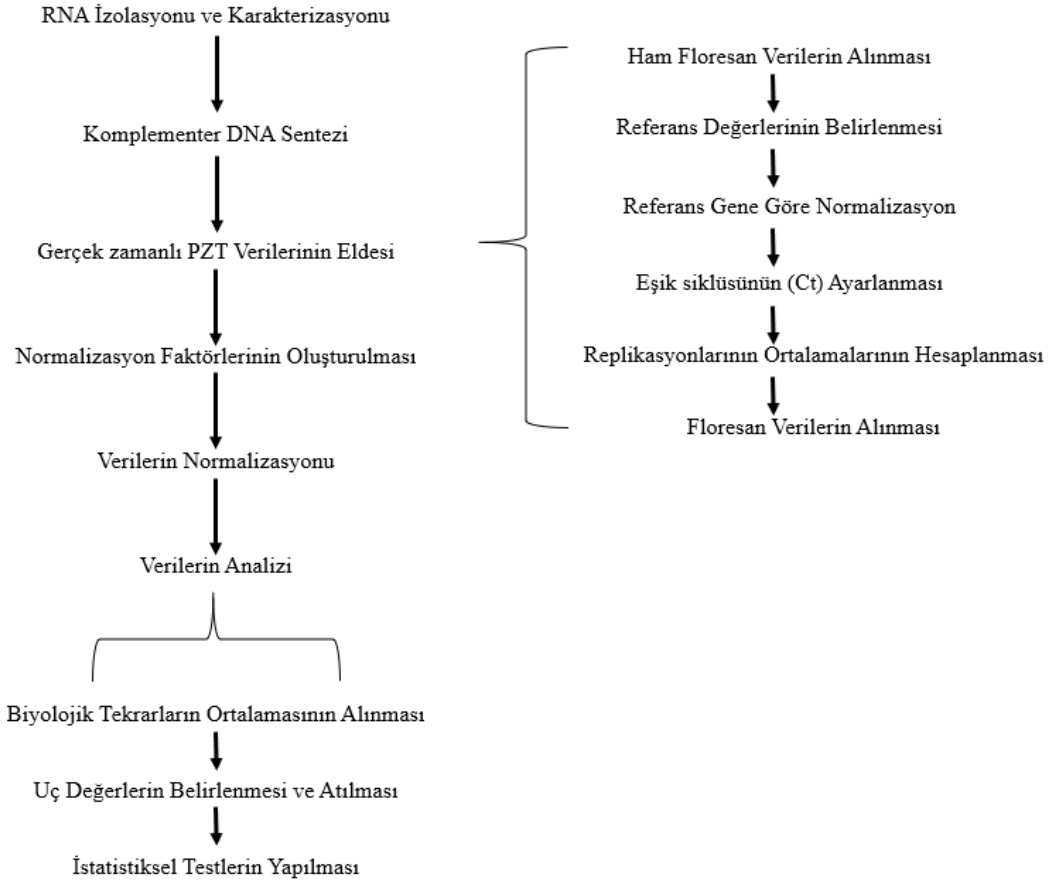
Reaksiyon karışımı	Miktarlar (1 örnek için)
MyTaq DNA polimeraz enzimi	1 µl
cDNA Kalıbı	1 µl
İleri primer	1 µl
Geri primer	1 µl
5x MyTaq solüsyonu	5 µl
Nükleaz olmayan su	16 µl

Tablo 5.7.3. MyTaq DNA polimeraz kullanılarak yapılan Polimeraz zincir reaksiyonunda kullanılan ayarlar

Sıcaklık	Zaman (Kaç kez tekrarlandığı)
95 °C	1 dakika (1 tekrar)
95 °C	15 saniye (34 tekrar)
55 °C	15 saniye (34 tekrar)
72 °C	15 saniye (34 tekrar)
72 °C	5 dakika (1 tekrar)
4 °C	∞

5.8.Kantitatif Gerçek Zamanlı-Polimeraz Zincir Reaksiyonu (QRT-PCR)

Kantitatif Gerçek Zamanlı-Polimeraz Zincir Reaksiyonu, hücre ve/veya dokulardaki mRNA miktarlarını, spesifik genlerde, kantitatif olarak belirlenmesine yarayan metottur. Öncelikle RNA izole edilir ve RNA miktarları karakterize edilir. Ardından komplementer DNA sentezlenir ve ardından PZR şablonu olarak kullanılır. Gerçek zamanlı PZR makinesinde analiz için kullanılan çıktı verilerini oluşturmak için ham floresan verileri toplanır. Referans genlerle (GAPDH gibi) sonuçları normalleştirmek için normalizasyon faktörleri hesaplanır. Floresan verilerin normalleştirme faktörüne bölünmesi ile normalleştirilmiş veriler üretilir ve sonrasında veriler istatistik için hazır hale gelir. Bu PZR tipinde yapılan adımlar **Şekil 5.8.1**'de gösterilmiştir (135).



Şekil 5.8.1. Kantitatif Gerçek Zamanlı-Polimeraz Zincir Reaksiyonu için yapılan adımların akış diagramı.

RNA izolasyonundan sonra komplementer DNA sentezi yapıldı. İzolasyonlar ve sentezler ikişer tekrarlı yapıldı. Kantitatif Gerçek Zamanlı-Polimeraz Zincir Reaksiyonu için SensiFAST™ SYBR® No-ROX Kit (Bioline-BIO-98005) kullanıldı. Her grup için öncelikle referans gen ile (Efl α) normalizasyon yapıldı. Çıkan verilere göre sulandırma katsayıları hesaplandı. Sulandırma katsayısı için yapılan hesap her grup için ayrı ayrı yapıldı. Sulandırma katsayısının nasıl yapıldığına dair örnek **Tablo 5.8.1**'dedir. Sulandırma katsayısı hesaplandıktan sonra hesaplatılan katsayılar kullanılarak Kantitatif Gerçek Zamanlı-Polimeraz Zincir Reaksiyonu karışımları hazırlandı. Karışımda olan malzemeler **Tablo 5.8.2**'dedir. Karışımlarda konulan ileri ve ters primerlerden referans genin dizi bilgisi literatürden alındı. Diğer primer dizaynları ise Primer 3.0 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3/>) yazılımı ile yapıldı. Her primer tipi için 200 nM final konsantrasyonlu primerler kullanıldı. Karışım özel 96'lık petrilere (HardShell 96 well plates, BIO RAD) ayrı ayrı konuldu. Üzeri yapışkan

kaplama (Microseal B Adhesive Sealer MSB-1001, BIO RAD) ile kapatılıp hızlıca reaksiyonun başlaması için cihaza götürüldü. Reaksiyon için CFX Connect-Real Time System (BIO RAD) cihazı kullanıldı. Cihazda kullanılan ayarlar **Tablo 5.8.3**'tedir. Her Kantitatif Gerçek Zamanlı-Polimeraz Zincir Reaksiyonu 3 biyolojik ve 3 teknik tekrarlı yapıldı. Relatif mesajcı RNA ifadeleri $2^{-\Delta\Delta Ct}$ yöntemi ile hesaplandı.

Tablo 5.8.1. Örnek sulandırma katsayısı hazırlama tablosu. Öncelikle cihazdan alınan verilerin ortalamaları alınır. En düşük ve en yüksek C_q değerleri uygun tabloya yazılır. En yüksek değer en düşük gen ifade profilini ifade etmektedir. O yüzden en yüksek değerın sulandırma katsayısı da en konsantre olan olmalıdır. En yüksek değerden diğer değerler çıkarılarak 2^{Δ} olacak şekilde hesaplama yapılır aşağıdaki tablo gibi oluşturuldu.

Grup İsmi	C_q Değeri	Hesaplama	Sulandırma Katsayısı
Kontrol (Elf1 α)	20,85	$2^{(21,85-20,85)} = 2$	1:20
YAP morfolino verilen örnek (Elf1 α)	21,85	$2^{(21,85-21,85)} = 1$	1:10
LATS morfolino verilen örnek (Elf1 α)	21,18	$2^{(21,85-21,18)} = 1,6$	1:16

Tablo 5.8.2. Kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu için kullanılan malzemeler. Aşağıdaki gibi karışımlar her grup için en az 3'er kuyucuk olacak şekilde uygun plakalara konuldu. Hızlı bir şekilde buz üzerine alınan örnekler cihaza konuldu.

Malzeme İsmi	Miktar
Syber Green	5 μ l
Nükleaz olmayan su	2 μ l
İleri Primer	1 μ l
Geri Primer	1 μ l
Uygun sulandırmaları yapılan Komplementer DNA	1 μ l

Tablo 5.8.3. Kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu için kullanılan cihaz parametreleri. Uygun kuyucuklara uygun isimlendirmeler yapıldıktan sonra tablodaki ayarlar cihazda uygulandı.

Sıcaklık	Zaman (Kaç kez tekrarlandığı)	Amaç
95 °C	2 dakika (1 tekrar)	Polimeraz aktivasyonu

95 °C	5 saniye (39 tekrar)	Denatürasyon
55 °C	10 saniye (39 tekrar)	Bağlanma (annealing)
72 °C	15 saniye (39 tekrar)	Uzama (extension)

5.9.İmmünohistokimya

Doku boyamaları (immünohistokimya) bütün deney gruplarında yapıldı. Dokularda YAP, fosfo-YAP, fosfo-LATS ve PCNA (çoğalan hücre belirteci, proliferating cell nuclear antigen) proteinlerinin hem lokalizasyonları hem de bu proteinler bakımında pozitiflik durumları ve yüzdeleri belirlendi. Bu amaçlar doğrultusunda 2 farklı yöntem kullanıldı. İlk yöntem başarılı olmadı fakat ikinci yöntem başarılı oldu. İkinci yöntem kurbağalarda YAP protein boyamasının yapıldığı yayından alınılandı. Her iki protokolde de aynı primer ve sekonder antikorlar kullanıldı. Bu antikorların sulandırma miktarları da aynı kullanıldı. Sulandırmalar için antikor sulandırma solüsyonu (Antibody Diluent Reagent - Life Technologies - 003118) kullanıldı. Kullanılan birincil ve ikincil antikorlar ve kullanılan antikorların sulandırma miktarları **Tablo 5.9.1**'dedir. Kullanılan iki protokolde dokular 25 mikrometre boyunda kesildi. Kesim için Cryostat CM1950 (Leica) cihazı kullanıldı.

Tablo 5.9.1. Çalışmada kullanılan birincil ve ikincil antikorların isimleri katalog numaraları ve sulandırma katsayıları

Antikor İsmi	Firma ve Katalog Numarası	Sulandırma Katsayısı
Fosfo-YAP	Cell Signalling Technology - 4911	1:250
Fosfo-LATS	Cell Signalling Technology - 8654	1:250
YAP	Cell Signalling Technology - 4912	1:250

PCNA	Millipore – MABE288	1:250
Keçi-anti Tavşan İkicil Antikor Alexa Flour 594 Plus	Invitrogen – A11037	1:250
Keçi-anti Fare İkicil Antikor Alexa Flour 633 Plus	Invitrogen – A11037	1:250

Tezde kullanılan protokollerden ilki aşağıdaki gibidir:

- 1) -80 derecede saklanılan dokular çıkartılıp -20 dereceye alınır.
- 2) Dokular, doku dondurma sıvısı (Tissue Freezing Medium, Leica, 14020108926) içine gömülür.
- 3) Gömülen dokular, doku kesim cihazına (Cryostat) yerleştirilir ve 25 mikrometre boyutunda kesilir.
- 4) Kesilen dokular pozitif şarjlı lamlara (Superfrost Plus, ThermoScientific-J1800AMNZ) konuldu. Dokuların etrafı PAP PEN (Invitrogen – 008877) ile çizildi. Dokuların kurumaması için dokuların üzerine PBS eklenir.
- 5) Dokulara %4 PFA (Sigma – 158127) eklendi ve 15 dakika bekletilir.
- 6) 2 kez PBS yıkamasından sonra, dokulara %30 bloklama solüsyonu (ThermoFisher – 37520), %70 PBS ve %0,05 Tween-20 içeren karışım eklenir ve 45 dakika boyunca bekletilir.
- 7) 2 kez PBS yıkamasından sonra, dokulara primer antikorlar (YAP, fosfo-YAP, fosfo-LATS ve PCNA) eklendi ve dokular gece boyunca +4 °C’de gece boyu bekletilir.
- 8) Primer antikoru sonrası, dokular sekonder antikorlarla 3 saat inkübe edilir.
- 9) 2 kez PBS ile yıkanan dokulara DAPI eklendi. 5 dakika sonra 2 kez PBS yıkaması yapılır.
- 10) Dokulara kaplama solüsyonu (Mounting Medium – C9368) eklendi ve lam ile kapatılır.
- 11) Görüntülemeler konfokal mikroskobu (Zeiss LSM800) ile yapılır.

İkinci kullanılan protokol ise literatürde bulunan bir protokoldür (92). Daha ileri çalışmalara ihtiyaç duymasına rağmen bu protokolden sonuç alınabilmektedir. Protokol aşağıdaki gibidir :

- 1) -80 derecede saklanılan dokular çıkartılıp -20 dereceye alınır.
- 2) Dokular, doku dondurma sıvısı (Tissue Freezing Medium, Leica, 14020108926) içine gömülür.
- 3) Gömülen dokular, doku kesim cihazına (Cryostat) yerleştirilir ve 25 mikrometre boyutunda kesilir.
- 4) Kesilen dokular pozitif şarjlı lamlara (Superfrost Plus, ThermoScientific-J1800AMNZ) konuldu. Dokuların etrafı PAP PEN (Invitrogen – 008877) ile çizildi. Dokuların kurumaması için dokuların üzerine PBS eklenir.
- 5) Dokulara %4 PFA (Sigma – 158127) eklendi ve 15 dakika bekletilir. Bu işlem iki kere tekrar edilir.
- 6) Dokulara sırasıyla %0.1 Triton TX-100 (Sigma – T8787) (20 dakika), %0.3 H₂O₂ (Sigma – H1009) (10 dakika) ve %2 FBS (1 saat) eklenir.
- 7) dokulara primer antikorlar (YAP, fosfo-YAP, fosfo-LATS ve PCNA) eklenir ve dokular gece boyunca +4 °C’de gece boyu bekletilir.
- 8) Primer antikoru sonrası, dokular sekonder antikorlarla 3 saat inkübe edilir.
- 9) 2 kez PBS ile yıkanan dokulara DAPI eklenir ve 5 dakika sonra 2 kez PBS yıkaması yapılır.
- 10) Dokulara kaplama solüsyonu (Mounting Medium – C9368) eklendi ve lam ile kapatılır.
- 11) Görüntülemeler konfokal mikroskobu (Zeiss LSM800) ile yapılır. Sadece sekonder antikor konularak yapılan boyamalar referans alınarak görüntülemeler yapılır.
- 12) DAPI ve diğer antikorların sayımı ZenBlue (Zeiss) yazılımı ile yapılır.

5.10. Western Blot

İzole edilen dokularda protein miktarını belirlemek için Western Blot denemeleri yapılmıştır. Protein izolasyonu için RIPA (5X RIPA Buffer With Protease Inhibitor Cocktail Reagent – MBS169028) kullanılmıştır. Literatürde aksolotlda kullanılan Western Blot protokollerinin çoğu denenmiştir. GAPDH ve PCNA antikorları hariç

YAP, fosfo-YAP ve fosfo-LATS antikorlarında yapılan denemeler başarısız olmuştur. Protein izolasyon protokolü ve Western Blot protokolleri aşağıdaki gibidir.

Protein İzolasyonu:

- 1) Buzun üzerinde dokular parçalara ayrılır ve ağırlığı ölçülür.
- 2) Ependorf tüpe aktarılan doku parçaları likit nitrojen ile dondurulur.
- 3) Her 5 miligram doku için 300 µl RIPA solüsyonu eklenir ve homojenize edilir.
- 4) 2 kere soğuk RIPA (400 µl) ile yıkama yapılır.
- 5) Dokular bu şekilde 2 saat boyunca +4 °C'de ajite edilir.
- 6) Örnekler 13000 G'de 20 dakika boyunca (+4 °C'de) santrifüj edilir.
- 7) İzole proteinlerin bulunduğu sıvı kısım yeni tüpe alınır ve -20 °C'de saklanır.
- 8) Protein konsantrasyonu kabaca NanoDrop'ta ölçülür.
- 9) Her kuyucuk başına 20 µg protein kullanılır.

Western Blot Protokolü

- 1) 20 µg protein, %10 β-merkaptetanol (Bio-Rad - 1610710), 4X Laemmli (Bio-Rad - 1610747) ve distile su kullanılarak 25 µl karışım hazırlanır.
- 2) Karışım ısıtıcı cihazda 95 °C'de 5 dakika boyunca inkübe edilir.
- 3) %10 luk ayırma jeli hazırlanır. Jelin içeriğinde distile su (4.1 ml), 3.3 ml Acrylamide/bis (30% 37.5:1; Ambion - AM9022), 2.5 ml Tris-HCl (1.5 M, pH 8.8, Merck - 109057), 100 µl %10 SDS (Sigma - L3771), 10 µl TEMED (Biofroxx - 8028ML100) ve 32 µl %10 Ammonium persulfate (APS, Sigma - A3678) bulunmaktadır.
- 4) Ayırma jeli donduktan sonra %4'lük toplama jeli hazırlanır. Jelin içeriğinde distile su (6.1 ml), 1.3 ml Acrylamide/bis (30% 37.5:1), 2.5 ml Tris-HCl (0.5 M, pH 6.8), 100 µl %10 SDS, 10 µl TEMED (Bio-Rad) ve 100 µl %10 Ammonium persulfate (APS) bulunmaktadır.
- 5) Jeller hazırlandıktan sonra protein örneklerinin bulunduğu karışımdan 20 µl kuyucuğa konulur.
- 6) 1X yürütme solüsyonu ile doldurulan tankta proteinler 15 dakika 70 voltta; 45 dakika ise 120 voltta yürütülür. Yürütme solüsyonu (pH 8.3) içeriğinde 25 mM Tris Base (Sigma - T1503), 192 mM Glycine (Sigma - G8898) ve %0.1 SDS bulunmaktadır.

- 7) 0,42'lik PVDF membran (GVS - 1214429) 30 saniye boyunca aktifleştirilir. Yürütmenin ardından jel distile suya alınır. 1X transfer solüsyonunda membran, yastık ve kaset sistemleri bekletilir. Transfer solüsyonu (pH 8.3) içeriğinde 48 mM Tris Base, 39 mM Glycine ve %20 metanol (Merck - 100837) bulunmaktadır.
- 8) Transfer solüsyonu ile ıslandıktan sonra 'sandwich' modeli oluşturulur. Bu modelde malzemeler + taraftan – tarafa doğru sünger, filtre kağıdı (Bio-Rad - 1703932), PVDF membran, jel, filtre kağıdı, sünger şeklinde konulur. Bu model hazırlanırken baloncuk olmamasına dikkat edilir.
- 9) Proteinler yarı-kuru (semi-dry, Bio-Rad) sistemi kullanılarak membrana transfer edilir. Transfer 1,3 amperde, 25 voltta ve 10 dakikada yapılır.
- 10) Transferden sonra, membran bloklama için %5'lik yağsız süt tozunda (AppliChem - A08300500) gece boyunca 4 derecede gece boyunca bekletilir. Bloklama için 20 RPM'de çalkalayıcı kullanılır.
- 11) Bloklama sonrası membran distile su ile yıkanır. Boyut tespiti için bantlar kalemle hafifçe işaretlenir.
- 12) Bloklama inkübasyonu sonrası membranlar 1:1000 oranında seyreltilmiş birincil antikorlar (YAP, fosfo-YAP, fosfo-LATS, PCNA ve GAPDH (Sigma – G8795) gece boyunca 4 derecede inkübe edilir.
- 13) Birincil antikor muamelesi sonrası membran 3 kere 10 dakika boyunca 1X TBST ile yıkanır. 10X TBST hazırlamak için (pH 7,6) 24 gram TrisBase, 88 gram NaCl (Sigma - S9888) ve 10 mililitre Tween 20 (Sigma - P9416) 1 litre su ile karıştırılır.
- 14) Membranlar ikincil antikorlarla (1:2000- Anti-Rabbit IgG, HRP-linked Antibody, Cell Signalling Technology, 7074 ve 1:2000 - Anti-Mouse IgG, HRP conjugated Antibody, GenDEPOT W3903) 4 derecede gece boyunca 25 rpm' de inkübe edilir.
- 15) İkincil antikor inkübasyonu sonrası membranlar 3 kez 5 dakika boyunca 1X TBST ile yıkanır.
- 16) Üretici firmanın önerilerine uygun şekilde ECL (Bio-Rad - 1705061) solüsyonu kullanılır. 5 dakika karanlıkta inkübasyon sonrası görüntüleme için Chemidoc™ Imaging System (Bio-Rad) kullanılır.

Diğer denenen protokol ise literatürde fosfo antikor kullanılan aksotl çalışmasına aittir. Uyguladığımız protokolden farklı olan bloklama solüsyonunda %10'luk tavuk serumu (ThermoFisher - 16110082) kullanılmasıdır. Bloklama oda sıcaklığında 1 saat yapılmıştır (136).

5.11. Proteomiks

Kütle spektrometresi analizi için FASP (Filter-aided sample preparation – Filtre-yardımlı örnek hazırlama, Abcam - ab270519) kiti kullanılmıştır. mRNA düzeyindeki analizlere ek inhibisyon sonrası genel proteom profilinin çıkarılması elzem hale gelmiştir. Bu amaçla firmanın önerdiği şekilde FASP kiti protokolü kullanılmıştır. Kullanılan malzemeler kitin içerisindeki malzemelerdir. Proteomiks analizleri İstanbul Medipol Üniversitesi Proteomiks Laboratuvarında yapılmıştır.

Protein İzolasyonu ve FASP protokolü:

- 1) Dokular demir boncukların olduğu tüpe aktarılır. Örneğin üzerine buzun içerisinde 500 µl amonyum bikarbonat ve 7 µl proteaz inhibitör kokteyli eklenir. Homojenizatörde mekanik parçalama için her örnek 4 kere 10 saniyelik periyotlarla döndürülür.
- 2) Örnekler 5 dakika boyunca sonikasyona maruz bırakılır. Ardından 250 µl örneğe 250 µl UPX ve 5 µL proteaz inhibitör kokteyli (protein yıkımını engellemek için) konulur. UPX, SDS ve DTT karışımıdır. SDS dokuları parçalarken; DTT de disülfid bağlarını parçalamaktadır.
- 3) Örnekler çalkalayıcıda (600 RPM'de) 10 dakika boyunca 100 °C'ye kadar ısıtılarak karıştırılır.
- 4) Örnekler hızlı bir şekilde +4°C'ye alınır ve en az 1 saat boyunca inkübe edilir.
- 5) 1 saat sonra 16000 G'de 10 dakika boyunca santrifüj edilir. Süpernetant LoBind tüplere konulur.
- 6) Protein konsantrasyonları Qubit 2.0 (Thermo Fisher Scientific) cihazı ile yapılmıştır. Kit olarak Qubit Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific-Q33212) kullanılmıştır. Kit protokolünde firmanın önerdiği protokol kullanılmıştır. Konsantrasyon tayini sonucunda örnekler, 50 µg/30 µl olacak şekilde ayarlanmıştır.

- 7) 30 µl örneğin üzerine 200 µl üre ilave edilir. Karışım filtreli FASP tüplerinin üzerine eklenir ve 15 dakika boyunca 14000 G'de santrifüj yapılır. Bu işlem iki kez tekrarlanır.
- 8) Bu aşamadan sonra toplama tüpündeki sıvı kısım atılır. Filtreli tüpün üzerine 10 µl iyodoasetamid ve 90 µl üre eklenir ve inkübasyon için karanlıkta 20 dakika beklenir.
- 9) Örnekler 10 dakika boyunca 14000 G'de santrifüj yapılır.
- 10) Örnekler 100 µl üre eklenir ve örnekler 10 dakika boyunca 14000 G'de santrifüj yapılır. Bu işlem 3 kere tekrarlanır.
- 11) Filtrenin üzerine 100 µl amonyum bikarbonat (50mM) eklenir.
- 12) Örnekler 10 dakika boyunca 14000 G'de santrifüj yapılır ve bu işlem 3 kere tekrarlanır.
- 13) Örnekler 75 µl parçalama solüsyonu (1 µg tripsin ve 75µl amonyum bikarbonat) eklenir. Tüpler parafilmle sarılır ve örnekler 37°C'de 18 saat inkübe edilir.
- 14) Yeni tüpe alınan filtreli örneklerin üzerine 40 µl amonyum bikarbonat eklenir ve örnekler 10 dakika boyunca 14000 G'de santrifüj yapılır. Bu işlem 2 kere tekrarlanır.
- 15) Bu aşamadan sonra tüpe gelen süpernatant solüsyonu atılmaz. Örnekler 50 µl sodyum klorür eklenir ve örnekler 10 dakika boyunca 14000 G'de santrifüj yapılır ve filtre atılır.
- 16) Bu aşamada örnekler liyofilize edilir.
- 17) Örneklerin üzerine 20 µl %0,1'lik formik asit eklenir. Örnekler cihaza yüklenmeden Qubit kiti ve cihazı kullanılarak örneklerin konsantrasyonu belirlenir. Örneklerin konsantrasyonları 100 ng/ µl olacak şekilde ayarlanır.

Peptitlerin analizi için yüksek çözünürlüklü kütle spektrometresi olan SYNAPT[®]G2-Si (Waters) ve ACQUITY UPLC (Waters) sistemleri kullanılmıştır. Kantifikasyon metodu olarak HDMS^E kullanılmıştır. Peptit ayrımı için 2 adet kolon kullanılmıştır. Kolonlarda %97 mobil faz A (%0,1 FA içeren LC-MS sınıfı su) ve sıcaklık 55°C'ye ayarlanmıştır. Ayrıştırma işlemi dakikada 0,300 µl olarak ayarlanmıştır. Kütle spektrometre taramaları 0,7 saniyelik döngüyle tarama yapılmıştır ve çarpışma enerjileri 10V ve 30V olarak ayarlanmıştır. Dalga hızı 1000'den 55 m/s'ye artırılmıştır.

Cihazda ön iyon seçimi yapılmadan 50-1900 m/z (kütle/yük) aralığındaki tüm iyonların parçalanması sağlanmıştır. Peptitlerin tespiti için önce organizmaya özgü protein veri tabanları kullanılmıştır. Peptit analizleri amacıyla PLGS (ProteinLynx Global Server 3.0.1. Waters®, ABD) ve Progenesis for Proteomics (Progenesis QI-P 2.0.5556.29015 Nonlinear, Waters®) yazılımları kullanılmıştır.

Peptit özelliklerinin kantitatif analizi ve protein tanımlamaları için Progenesis QI for proteomics (v.4.0, Waters) kullanıldı. İşleme parametreleri olarak; düşük enerji eşiği için 150 sayım ve yükseltilmiş enerji eşiği için 30 sayım seçildi. Algoritma seçimi ve veri analizi için takip edilen parametreler önceki iki makaleden alındı (137, 138). Referans veri tabanı olarak aksotl proteom veri tabanı kullanıldı. Protein normalizasyonu bilinen peptitler kullanılarak nispi kantitasyona göre gerçekleştirildi. Protein ifade değişiklikleri ve p değeri hesaplamasında Progenesis QI for proteomics yazılımı kullanıldı. Elde edilen veri setinde ANOVA testi kullanıldı ($p < 0.01$). Gruplar arasında 2 kat değişim ve daha fazla değişim gösteren proteinler dikkate alındı. GO ve KEGG yolak analiz veri tabanları kullanılarak görseller iki referans makaleye göre hazırlandı (139, 140).

5.12. Bilgisayarlı Tomografi

Bilgisayarlı tomografi, dar bir X-Ray ışının örnek çevresinde hızla döndürüldüğü ve makinenin bilgisayarı tarafında işlenen sinyaller üreten görüntüleme prosedürünü ifade etmektedir. Örnekte kesitsel dilim görüntüleri oluşturmaktadır. Bu dilimler üst üste konularak 3 boyutlu tanımlama görüntüleri ortaya çıkmaktadır. Tezde YAP ve LATS inhibisyonları sonrası uzun dönem kemik gelişiminde değişiklik olup olmadığını belirlenmesi için U-CT (MiLabs) cihazı kullanılmıştır. Bu sistem sayesinde bütün fare vücudu 5 saniye gibi bir sürede görüntülenebilmektedir. Ayrıca bu tarama düşük X ışını radyasyon dozlarıyla yapılmaktadır. Sistem kullanılmadan önce cihaz açılır. Hayvanlar Benzokain yardımıyla bayıltılır. Bayılma durumları cımbız ile kontrol edilir. Aksotlolar bayıldıktan sonra özel tomografi kabına alınır. Hayvanın tomografisinin yapılmasını istenilen bölge seçilir. En son hayvan fotoğrafı ile birlikte kalibrasyon yapılır. Aksotl için yüksek çözünürlüklü tarama modu seçilir. Yüksek çözünürlük modunda tarama 15 dakika sürmektedir. Bu süre zarfında hayvan ara ara kontrol edilir. Görüntü alındıktan sonra cihazdaki 'Reconstitution (MiLabs)'

yazılımı açılır ve görüntü 3 boyuta çevrilir. 3 boyuta çevrilen görüntülerin işlenmesi, parlaklık ve kontrast ayarlarının yapılması için veri 'IMALYTICS Preclinical 2.1 (MiLabs)' yazılımına aktarılır. Burada parlaklık ayarı yapılan görüntüler 'TIFF' formatındaki görüntülere çevrilir. Tezde, neotonik hayvanlarda kol hasarı sonrası 120. günde (yenilenme tamamlandıktan sonra) bilgisayarlı tomografi taraması yüksek çözünürlükle yapılmıştır.

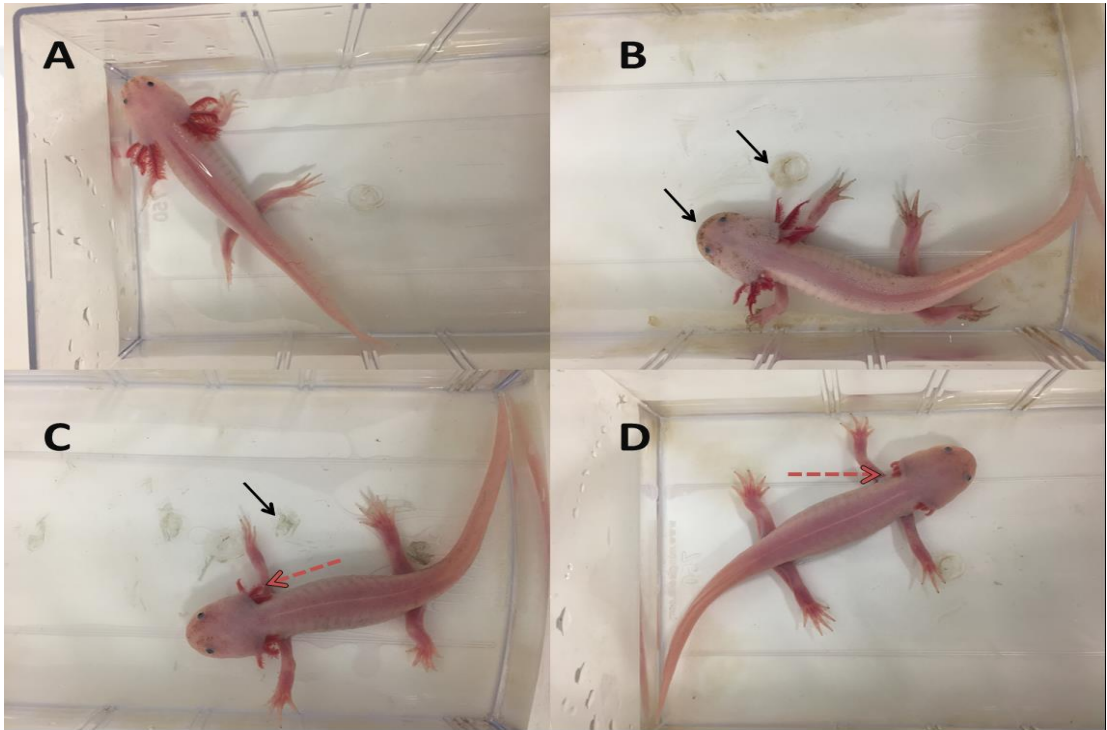
5.13.İstatistik

İstatistik analizlerinde (ortalamalar ve standard hata hesaplamaları dahil) GraphPad Prism 8 (San Diego, CA, USA) kullanıldı. Kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu deneylerinde ve proteomiks verilerinde One-way ANOVA post hoc Tukey's testi kullanıldı. İmmün boyama deneyi sonucunda hesaplanan yüzdelerde chi-squared testi kullanıldı. Uzuv ölçüm deneylerinde Student t-test kullanıldı. Anlamlılık değeri $0.05 \leq p \leq 0.01$ olduğunda tek yıldız (*), $0.01 < p \leq 0.001$ olduğunda iki yıldız (**) ve $p < 0.001$ olduğunda üç yıldız (***) konuldu.

6. BULGULAR

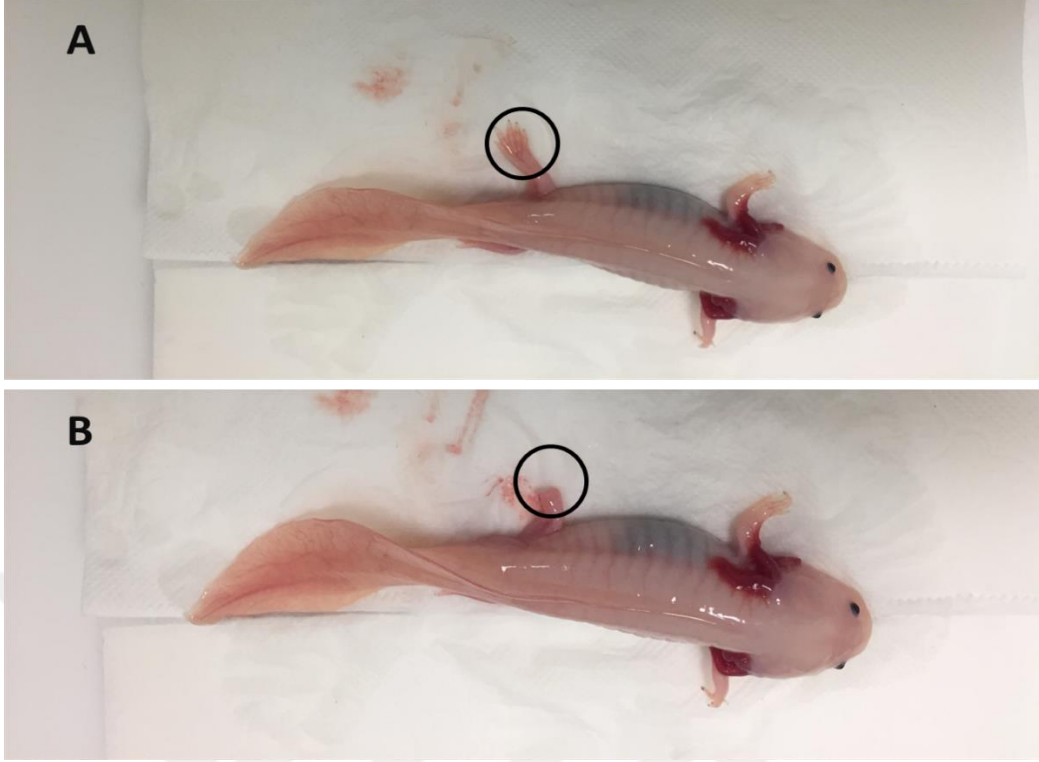
6.1. Metamorfoz Süreci ve Kol Kesimi

Bu tez çalışmasında, metamorfoz geçirmiş ve metamorfoz geçirmemiş aksolotllarda kol hasarı yapıldı. Metamorfoz süreci için T4 kullanıldı. Metamorfoz sürecinde deri değişimi ve solungaçların içine çekilmesi gösterildi. **Resim 6.1.1**'de neotonik hayvanlarda deri dökülmesi ve solungaçların içerisi çekilmesi gösterildi. Ayrıca metamorfoz sürecindeki hayvanlarda ölüm gözlemlendi. T3 ve T4 kullanılarak yapılan deneylerde hayvanların sadece %33'ü hayatta kalabildi.

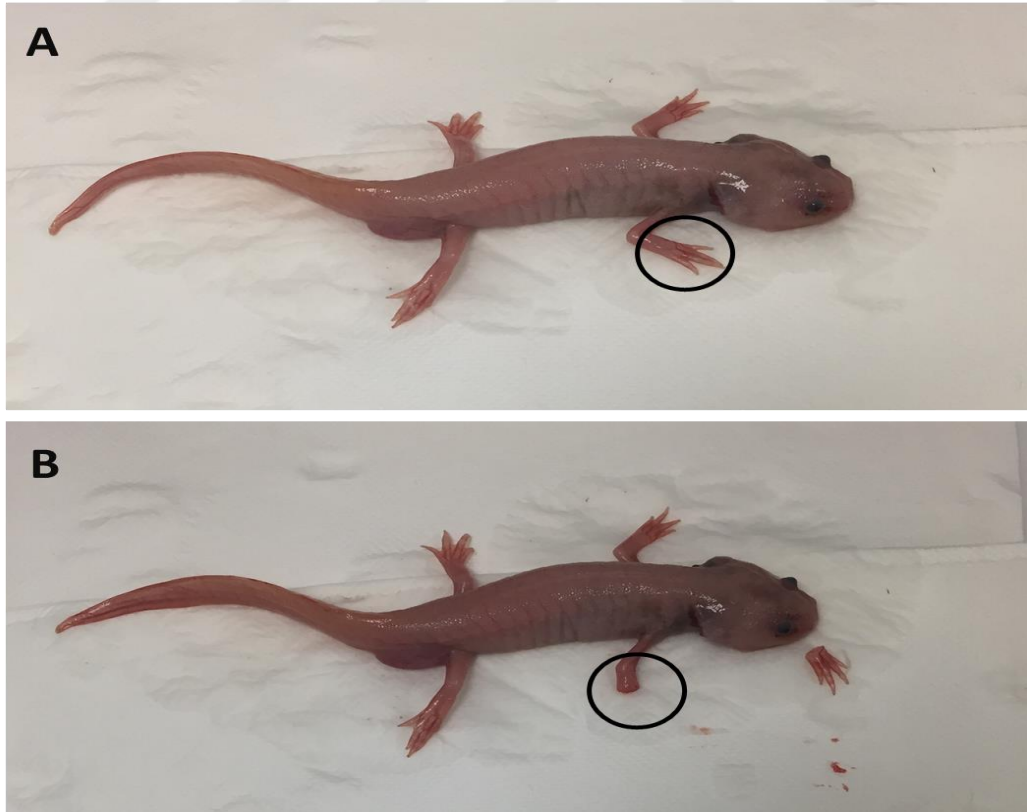


Resim 6.1.1. Aksolotl metamorfozu. A. Metamorfoz sürecine başlamadan önce neotonik aksolotl. B. T4 veya T3 ilavesinden sonra önce hayvanların derileri döküldü. Aynı zamanda derilerde siyahlık görüldü. Dökülen ve dökülmekte olan deri parçaları siyah okla gösterildi. C. İlerleyen süreçlerde deri dökülmesine (siyah ok) ek solungaçların çekildiği (kırmızı ok) görüldü. Metamorfoz sürecinin sonlarına doğru solungaçların tamamen kaybolmaya (kırmızı ok) başladığı gözlemlendi.

Çalışmada model organizma olarak kullanılan aksolotllarda kol hasarı sonrası Hippo yolağı analizleri yapıldı. Kol hasarı için metot kısmında belirtildiği ön kolun yarısından kol kesildi. Kesim işlemi metamorfik ve neotonik hayvanlarda aynı yerden yapıldı. Hayvanların durumlarına göre çoğu zaman sağ ön kol tercih edildi. Neotonik ve metamorfik hayvanlarda yapılan kol hasar resimleri **Resim 6.1.2** ve **Resim 6.1.3**'tedir. Ayrıca metamorfik hayvanda derinin kalınlaştığı, gözlerin dışarı daha fazla çıktığı da görüldü (**Resim 6.1.3**).



Resim 6.1.2. Neotonik hayvanlarda kol hasarı öncesi (A) ve kol hasarı sonrası (B). Kesilen bölge siyah daire ile gösterilmiştir.



Resim 6.1.3. Metamorfik hayvanlarda kol hasarı öncesi (A) ve kol hasarı sonrası (B). Kesilen bölge siyah daire ile gösterilmiştir.

6.2. Morfolino Dizilerinin Sentezi

Tezde mRNA inhibisyonu için morfolino sistemi kullanıldı. Öncelikle YAP ve LATS proteinlerinin sekans bilgileri aksolotl veri tabanından elde edildi. YAP ve LATS protein dizileri **Tablo 6.2.1**'dedir.

Tablo 6.2.1. Aksolotl protein veri tabanından elde edilen YAP ve LATS protein sekansları

Aksolotl (<i>Ambystoma mexicanum</i>)	Protein	Dizi
	YAP1	MDPNQQAGPAAPSSQPPVGHQIVHVRGDSETDLE ALFNAVMPNPKSAGGLPQTVPMRLRKLPSFFKPP EPKSHSRQASTDGGGAGALTPQHVRHSSPASLQ LGAVSPGAMTSSGLMAPSGPAPSSQHLRQSSFEIP DDVPLPPGWEMAKTPSGQRYFLNHIDQTTTWD PRKALLSQMNVPAPTSPAVQQNLMNPTAGPLPDG WEQAMTQDGEIYYINHKNKSTSWLDPRLDPRFA MNQRLSQSAPLKPPPPLSQSPQSGLMGGGNSQQQ QMRLQELQMEKQRLRLKHQELLRQVRPQELALR SQLPTMEQDGGPQNPVSSPGMSQELRTMTTNSSD PFLNSGTYSREESTDSGLSMSSYSVPRTPDDFLN SVDEMDTGDAVNQSTIPSQQTRFPDYLEALPGTN VDLGTLDGEAMNVEGEELMPSLQEALSSDILNDM ESVLAATKLDKESFLTWL
	LATS2	MRPKTFPATAHSGNSRQRLDEIREGLKQPPSHSIP VGLGSDTLDPKVAGKEATRQQQLRPTAKFAPY QKVLKEIRYSLLPFANESGSPATMEVNRQMLQEL VNAGCDQEMAVRALKQTGSRNIDA ALEYISKMG YLDPRNEQIVQVIKQTSTGKGMVNNVAHRQAFE GSNEFPFPYHQISNAA YDGTNFTDTVGDVQRSIYV MDYLRSASQTAALNPLGQRPTVVGTHSAAGSHPL QQKAYSATIETSVMNYSVANHNSQPLQLQGGHG SNSPHYSRQHLVVQRESMGYGVQRSPSFQNKMQ QEAGYTTVVQNSSGHTFQHASTGMYMAQSHHK QTSPSSHMPMHVITRGSTYANDFSDTPQTLTSPRN SLNMDLYDLSNTQVQQWPATTSRRDSLQNPTME APSRQHVTFRAEAQVPSRTNSFNPNQHQVPIGKR QSPSNKQDPSIAVPNAITAVSATHILQPVKSMRVM RPEPQTA VGP THPGWLAAQNQA VDGLEMMEPH ALQVGGSSAYGLDVDFVNQDKRCPPPPYPKHLLL QSTTEPYDINTLCMGVEQGLRVANNAPCGKSEEN ASPKSDKSSKSTKAEKTGKDKKQIQTSVPVRKN GRDEEKRESRIKSYSPFAFKFYMEQHVENVLKTY

		HQKVNRRRLQLEQEMAKARLCEAEQ QMRKILYQKESNYNRLKRAKMDKSMFVKIKTL
--	--	---

Elde edilen diziler GeneTools formlarına yüklenerek bu iki proteinin dizilerine karşılık gelen morfolino sekansları istendi. Sekans bilgileri **Tablo 6.2.2**'dir.

Tablo 6.2.2. Tezde inhibisyon için kullanılan YAP ve LATS proteinlerine karşı sentezlenmiş morfolino dizi bilgileri.

Oligo İsmi	Sekans Bilgileri
YAP MORFOLİNO	5'- AGC TTC CTC AGA CGC ATG GGT AC -3'
LATS MORFOLİNO	5'- TAG CAG GAA ATG TCT TCG GCC TCA T -3'
STANDARD KONTROL MORFOLİNO	5'- CCT CTT ACC TCA GTT ACA ATT TAT A -3'

Gönderilen sekanslar ise metot kısmında yazılan veri tabanlarından kontrol edildi. Kontrol sonuçlarına bakıldığında; her iki morfolino da ideal Guanin-Sitozin yüzdesi ve çok düşük self-dimer özelliği gösterdi. YAP morfolino için yapılan analiz sonuçları **Tablo 6.2.3**'te ve LATS morfolino için yapılan analiz sonuçları **Tablo 6.2.4**'tedir. Her iki morfolino için self-dimer özelliklerini gösteren sonuçlar **Şekil 6.2.1**'dir. Firmanın önerdiği şekilde kontrol sekansı içeren morfolino da alınmıştır. Morfolino kontrolü için yapılan kantitatif gerçek zamanlı-polimeraz zincir reaksiyonu sonuçlarına bakıldığında standard kontrol morfolino kullanılmamıştır. Aynı zamanda metamorfozda yaşanan ölümler nedeniyle standard kontrol morfolino tercih edilmemiştir.

Tablo 6.2.3. YAP morfolino için yapılan biyoinformatik analizlerin sonuçları

SEQUENCE (hedeflenecek yer)	5'- GTA CCC ATG CGT CTG AGG AAG CT -3'
-----------------------------	---

COMPLEMENT (istenecek oligo)	5'- AGC TTC CTC AGA CGC ATG GGT AC -3'
LENGTH	23
GC CONTENT	56.5 %
MELT TEMP	60.9 °C
MOLECULAR WEIGHT	7064.6 g/mole
EXTINCTION COEFFICIENT	219800 L/(mole·cm)
nmole/OD₂₆₀:	4.55
µg/OD₂₆₀:	32.14

Tablo 6.2.4. LATS morfolino için yapılan biyoinformatik analizlerin sonuçları.

SEQUENCE (hedeflenecek yer)	5'- ATG AGG CCG AAG ACA TTT CCT GCT A -3'
COMPLEMENT (istenecek oligo)	5'- TAG CAG GAA ATG TCT TCG GCC TCA T -3'
LENGTH	25
GC CONTENT	48 %
MELT TEMP	60.1 °C
MOLECULAR WEIGHT	7666 g/mole

EXTINCTION COEFFICIENT	244000 L/(mole·cm)
nmole/OD₂₆₀:	4.1
µg/OD₂₆₀:	31.42

YAP Morfolino

Dimer Sequence:
5'- GTACCCATGCGTCTGAGGAAGCT -3'
Maximum Delta G: -44.48 kcal/mole
Delta G: -6.34 kcal/mole Base Pairs: 4
5' GTACCCATGCGTCTGAGGAAGCT

|||||
3' TCGAAGGAGTCTGCGTACCCATG
Delta G: -5.38 kcal/mole Base Pairs: 4
5' GTACCCATGCGTCTGAGGAAGCT

:::|:::
3' TCGAAGGAGTCTGCGTACCCATG
Delta G: -3.65 kcal/mole Base Pairs: 4
5' GTACCCATGCGTCTGAGGAAGCT

|||||
3' TCGAAGGAGTCTGCGTACCCATG
Delta G: -3.61 kcal/mole Base Pairs: 2
5' GTACCCATGCGTCTGAGGAAGCT

:::|:::
3' TCGAAGGAGTCTGCGTACCCATG
Delta G: -3.14 kcal/mole Base Pairs: 2
5' GTACCCATGCGTCTGAGGAAGCT

:::|:::
3' TCGAAGGAGTCTGCGTACCCATG
Delta G: -3.14 kcal/mole Base Pairs: 2
5' GTACCCATGCGTCTGAGGAAGCT

||:::|:
3' TCGAAGGAGTCTGCGTACCCATG
Delta G: -3.07 kcal/mole Base Pairs: 2
5' GTACCCATGCGTCTGAGGAAGCT

:::|:::
3' TCGAAGGAGTCTGCGTACCCATG
Delta G: -3.07 kcal/mole Base Pairs: 2
5' GTACCCATGCGTCTGAGGAAGCT

:::|:::
3' TCGAAGGAGTCTGCGTACCCATG
Delta G: -1.6 kcal/mole Base Pairs: 2
5' GTACCCATGCGTCTGAGGAAGCT

:::|:::
3' TCGAAGGAGTCTGCGTACCCATG
Delta G: -1.6 kcal/mole Base Pairs: 2
5' GTACCCATGCGTCTGAGGAAGCT

||:::|:
3' TCGAAGGAGTCTGCGTACCCATG
Delta G: -1.6 kcal/mole Base Pairs: 2
5' GTACCCATGCGTCTGAGGAAGCT

:::|:::
3' TCGAAGGAGTCTGCGTACCCATG
Delta G: -1.57 kcal/mole Base Pairs: 2
5' GTACCCATGCGTCTGAGGAAGCT

:::|:::
3' TCGAAGGAGTCTGCGTACCCATG

LATS Morfolino

Delta G: -9.28 kcal/mole Base Pairs: 4
5' ATGAGGCCGAAGACATTTCTGCTA

:|:::
3' ATCGTCCTTTACAGAAGCCGGAGTA
Delta G: -4.87 kcal/mole Base Pairs: 3
5' ATGAGGCCGAAGACATTTCTGCTA

:|:::
3' ATCGTCCTTTACAGAAGCCGGAGTA
Delta G: -3.81 kcal/mole Base Pairs: 2
5' ATGAGGCCGAAGACATTTCTGCTA

:::|:::
3' ATCGTCCTTTACAGAAGCCGGAGTA
Delta G: -3.52 kcal/mole Base Pairs: 3
5' ATGAGGCCGAAGACATTTCTGCTA

:::|:::
3' ATCGTCCTTTACAGAAGCCGGAGTA
Delta G: -3.14 kcal/mole Base Pairs: 2
5' ATGAGGCCGAAGACATTTCTGCTA

||:::|:
3' ATCGTCCTTTACAGAAGCCGGAGTA
Delta G: -3.14 kcal/mole Base Pairs: 2
5' ATGAGGCCGAAGACATTTCTGCTA

||:::|:
3' ATCGTCCTTTACAGAAGCCGGAGTA
Delta G: -1.95 kcal/mole Base Pairs: 2
5' ATGAGGCCGAAGACATTTCTGCTA

||:::|:
3' ATCGTCCTTTACAGAAGCCGGAGTA
Delta G: -1.94 kcal/mole Base Pairs: 2
5' ATGAGGCCGAAGACATTTCTGCTA

:::|:::
3' ATCGTCCTTTACAGAAGCCGGAGTA
Delta G: -1.8 kcal/mole Base Pairs: 2
5' ATGAGGCCGAAGACATTTCTGCTA

:::|:::
3' ATCGTCCTTTACAGAAGCCGGAGTA
Delta G: -1.8 kcal/mole Base Pairs: 2
5' ATGAGGCCGAAGACATTTCTGCTA

||:::|:
3' ATCGTCCTTTACAGAAGCCGGAGTA
Delta G: -1.57 kcal/mole Base Pairs: 2
5' ATGAGGCCGAAGACATTTCTGCTA

:::|:::
3' ATCGTCCTTTACAGAAGCCGGAGTA
Delta G: -1.57 kcal/mole Base Pairs: 2
5' ATGAGGCCGAAGACATTTCTGCTA

||:::|:
3' ATCGTCCTTTACAGAAGCCGGAGTA
Delta G: -1.47 kcal/mole Base Pairs: 2
5' ATGAGGCCGAAGACATTTCTGCTA

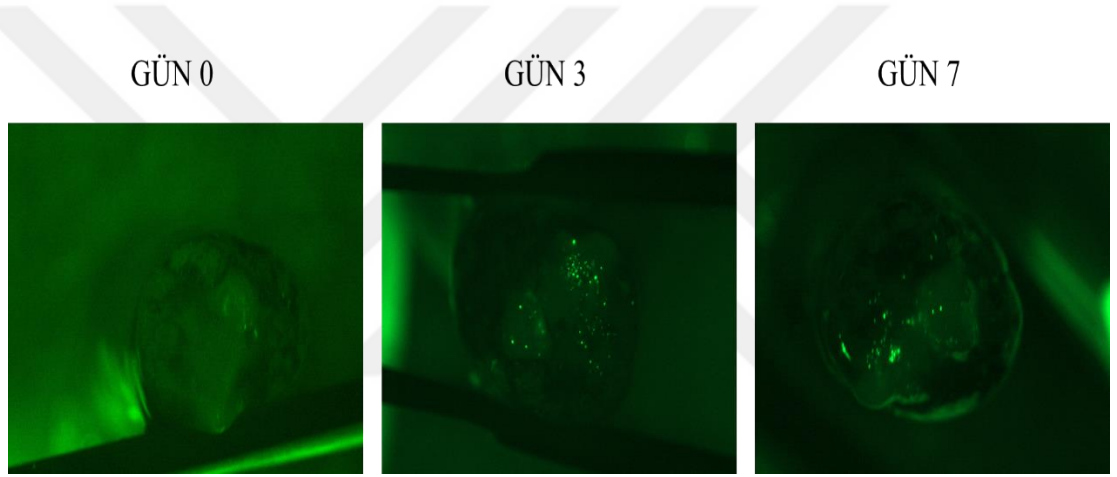
||:::|:
3' ATCGTCCTTTACAGAAGCCGGAGTA
Delta G: -0.96 kcal/mole Base Pairs: 2
5' ATGAGGCCGAAGACATTTCTGCTA

||:::|:
3' ATCGTCCTTTACAGAAGCCGGAGTA

Şekil 6.2.1. YAP ve LATS morfolino için yapılan biyoinformatik self-dimer analizlerinin sonuçları. Her iki morfolino da düşük self-dimer özelliği gösterdi.

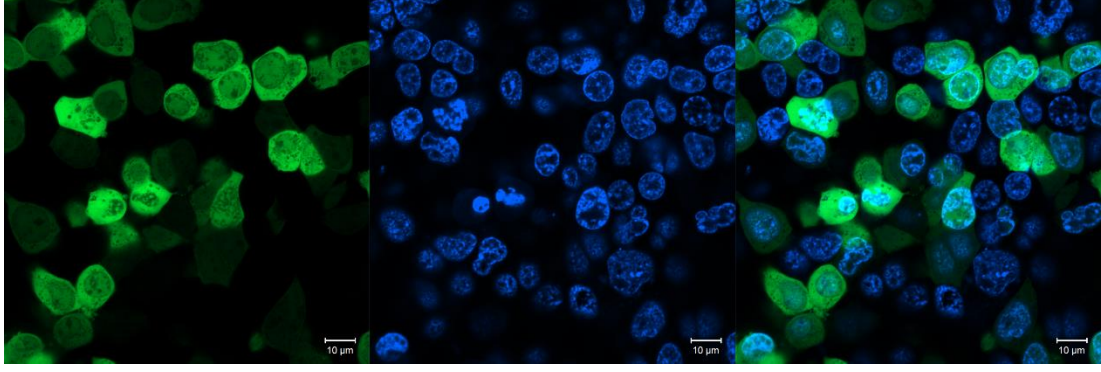
6.3. Morfolinoların *in vivo* ve *in vitro* Elektroporasyon Etkinlik Kontrolleri

Morfolino sentezlendikten sonra etkinlik kontrolü için sentezlenen morfolinolar kullanılarak *in vivo* ve *in vitro* denemeler yapıldı. Morfolino dokulara Hamilton enjektörü ile enjekte edildi. Enjeksiyon sonrası metot kısmındaki parametrelerle elektroporasyon yapıldı. Elektroporasyonun çalıştığını göstermek için neotonik hayvanın blastemasına EGFP plazmid enjekte edildi. Elektroporasyon sonrası plazmid 7 gün boyunca takip edildi. Sıfırıncı günde hiç yeşil floresan görülmezken 3. günde ve 7. günde yeşil floresan gözlemlendi. 3. günde 7. güne göre daha fazla floresan görüldü. Blastemanın *in vivo* görüntüleri **Resim 6.3.1**'dedir. Sonuçlara göre elektroporasyon başarılı olduğu görüldü.



Resim 6.3.1. Neotonik aksolotl blastemasına enjekte edilen EGFP plazmidin 0. 3. Ve 7. gün görüntüleri. 0. günde yeşil floresan görülmezken; diğer günlerde yeşil floresan görüldü. Bu da elektroporasyon protokolümüzün çalıştığını gösterdi. 7. günde gelişen blastemada yeşil floresan etkinliğini devam ettirmektedir.

EGFP plazmidin *in vivo* kullanımı elektroporasyon protokolünün başarısını ortaya koydu. EGFP plazmidin *in vitro*'da da bilinen hücrelerde de gösterilmesi gerekmektedir. Plazmidin gerçekten çalışıp çalışmadığını anlamak için HEK293T hücrelerine plazmid verildi. Sonuçlara göre HEK293T hücreleri yeşil floresan gösterdi (**Resim 6.3.2**).



Resim 6.3.2. HEK293T hücrelerinde EGFP plazmid görüntüleri. Plazmidlerin çalışıp çalışmadığını anlamak için yapılan deneyde hücrelerin çoğu yeşil floresan ifade etmiştir. Görüntülerdeki referans çubukları 10 µm'yi göstermektedir.

6.4. Morfolinoların İnhibisyonlarını Tespit Etmek İçin Yapılan Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu

YAP ve LATS inhibisyonlarının spesifik olarak bu genlerde olduğunu kontrol etmek için Kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (KGZ-PZR) deneyleri yapıldı. Bu amaçla öncelikle Primer 3.0 yazılımı kullanılarak gen dizilerine uygun primerler sentez edildi. Referans gen olarak kullanılan GAPDH ve Elf1 α dizi sekansları literatürden alındı. Tezde kullanılan primer dizileri **Tablo 6.4.1**'dedir.

Tablo 6.4.1. KGZ-PZR deneyleri için tasarlanan primer dizi bilgileri.

OLİGO İSMİ	SEKANS BİLGİSİ
Q-RT-PCR için YAP PRİMER	F: 5'-TCA AAA TCC GGT CTC CTC AC-3' R: 5'-TGT CCG TGC TTT CCT CTC TT-3'
Q-RT-PCR için LATS PRİMER	F: 5'-CAG TGG ACA CAG TGG GTG AC-3' R: 5'-AGG TCT TTG CCC AAG AGG AT-3'
Q-RT-PCR için GAPDH PRİMER	F: 5'-CGT GAC CCC GCC AAC ATC-3' R: 5'-ACG CTT AGC ACC GCC CTT CA-3'
Q-RT-PCR için ELF1 α PRİMER	F: 5'-CGC GAG TTC TAA TAG GTT CTG ATA TT -3' R: 5'-ATG CAA TTA CTT TAG CGA GTA CCA C-3'

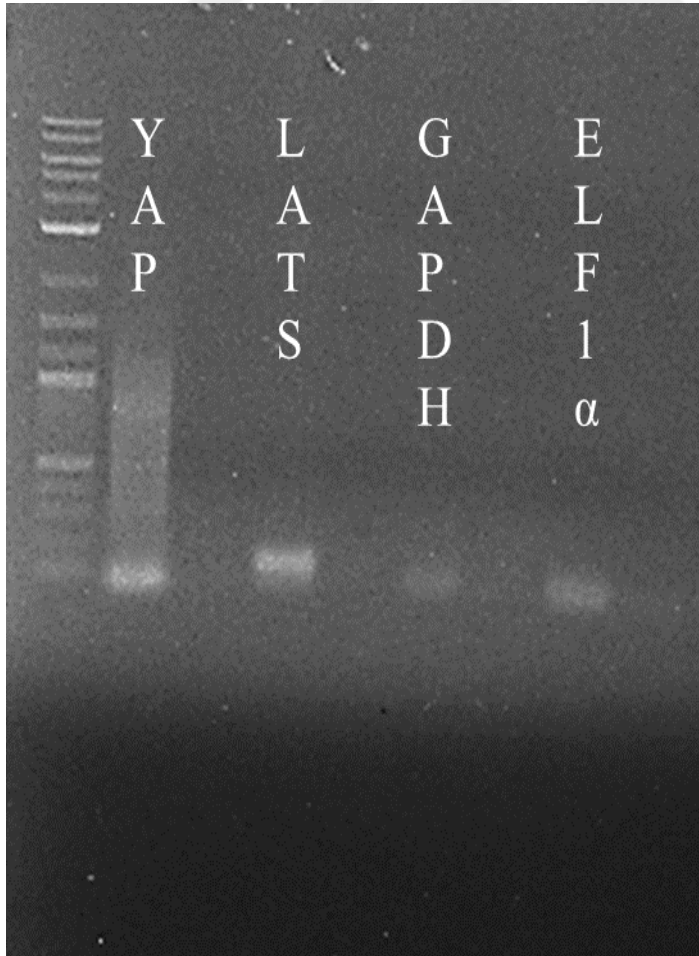
KGZ-PZR reaksiyonunun gerçekleşmesi için öncelikle dokulardan RNA izole edildi ve izole edilen RNA'larda bir kontaminasyon (protein, etanol vs.) olup olmadığına bakıldı. Bazı dokulardan izole edilen RNA'larda kontaminasyon olsa da bu durum önemsenmedi. Neotonik hayvanlara morfolino (M.O.) enjeksiyonu (YAP-Morfolino, LATS-Morfolino, Standard Kontrol ve PBS Enjekte edilen grup) yapıldıktan 2 gün

sonra blastema dokuları alındı. Ve bu dokulardan RNA izole edildi. İzole edilen RNA'ların konsantrasyonları ve A260/280 VE A260/230 değerleri **Tablo 6.4.2**'dedir.

Tablo 6.4.2. Morfolinoların mRNA düzeyindeki inhibisyonlarını tespit etmek için yapılan RNA izolasyonlarının konsantrasyon değerleri.

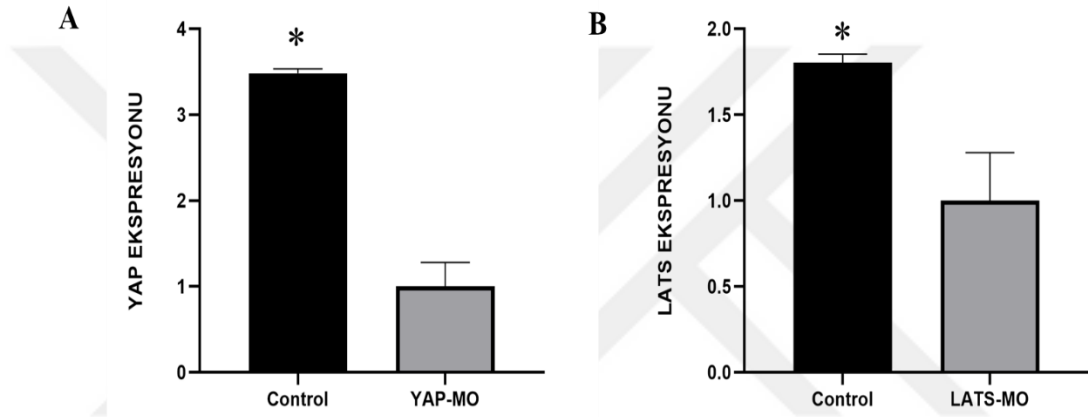
MORFOLİNO ETKİNLİK GRUBU	RNA CONC(NG/UL)	A260/280	A260/230
YAP M.O.	205,1	1,96	2,16
LATS M.O.	165,4	1,93	1,68
NEGATİF M.O.	111,3	1,98	1,63
CONTROL	139,7	1,96	1,94

RNA izolasyonuna müteakiben Komplementer DNA (cDNA) sentezi yapıldı. cDNA sentezinden sonra sentezlenen primerlerin aksolotlda çalışıp çalışmadığını ve primerlerin doğru büyüklükte bant verip vermedikleri anlamak için normal PZR deneyi yapıldı. Deneyde YAP bandında hafif 'sürüntü (smear)' görülmesine rağmen bütün primerler kendi boyutunda bant verdi ve tepkime aksolotl DNA'sında çalıştığı anlaşıldı. YAP, LATS, GAPDH ve Elfl α genlerine ait jel görüntüleri **Resim 6.4.1**'dedir.



Resim 6.4.1. Üretilen cDNA'larda YAP, LATS, GAPDH ve Elfl α genlerine ait jel görüntüsü.

Primerlerin doğru boyutta bant vermesi ve aksoltldan üretilen cDNA'larda çalışması üzerine KGZ-PZR deneyi yapıldı. Bu deney grubunda amaç YAP ve LATS morfolinoları enjekte edildikten sonra mRNA düzeyinde YAP ve LATS genlerinde de düşmenin olup olmadığının gösterilmesidir. Bu amaçla inhibisyon yapılan neotonik aksoltllardan sentezlenen cDNA' lar kullanılarak KGZ-PZR yapıldı. Çıkan sonuçlara göre YAP kontrol grubuna göre 3,48 kat; LATS kontrol grubuna göre 1,8 kat azaldığı görüldü. En az 1,5-2 kat azalmanın yeterli olduğu literatürde mevcuttu. Bu sonuçlar YAP ve LATS proteinlerine karşı sentezlenen morfolinolar ileri çalışmalar için kullanılabilir olduğunu gösterdi. YAP ve LATS morfolinolarının KGZ-PZR sonuçları **Şekil 6.4.1**'dedir.



Şekil 6.4.1. YAP ve LATS morfolino enjeksiyonu sonrası KGZ-PZR sonuçları. A. YAP mRNA inhibisyonu için yapılan morfolino elektroporasyonu sonrası YAP kontrol grubuna göre 3,48 kat azalmıştır. B. LATS mRNA inhibisyonu için yapılan morfolino elektroporasyonu sonrası LATS kontrol grubuna göre 1,8 kat azalmıştır. Sonuçlar kontrol gruplarına kıyasla anlamlıdır (p < 0.05, *).

6.5.Kol Kesiminden 7 Gün Sonra Yapılan Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu Sonuçları

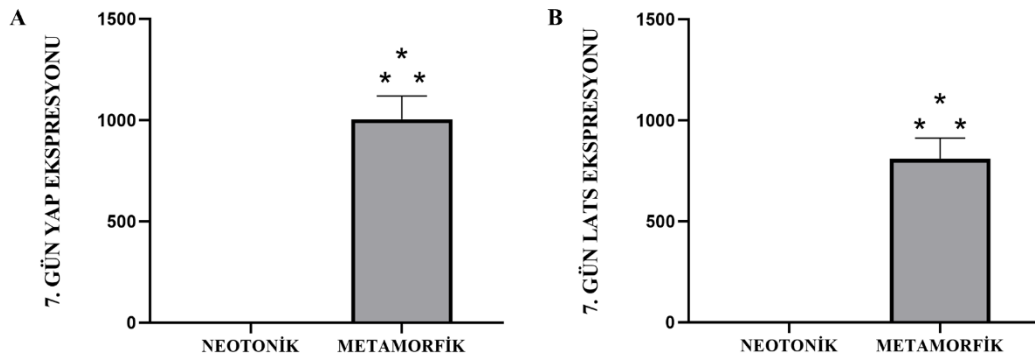
Literatüre bakıldığında morfolino enjeksiyonu için kol kesiminden sonra 7. ya da 10. gün deney yapıldığı görüldü. Bu günlerin tercih edilmesinin sebebi blastema dokusunu tamamen oluşmasının beklenmesidir. Projemizde 10. gün tercih edildi. Fakat 7. günde hem neotonik hem de metamorfik hayvanlarda sadece YAP ve LATS proteinlerinin mRNA seviyeleri karşılaştırıldı. Bu tercihin sebeplerinden birisi de hayvanlarda görülen ölümlerdir. Bu deney grubunda hayvanlardan izole edilen RNA miktarları ve saflıkları **Tablo 6.5.1**'dedir. Yapılan karşılaştırmalarda az ifade edilen proteinin katsayısı 1 olarak ayarlandı. Çıkan sonuçlara göre kol hasarı sonrası 7. günde metamorfik hayvandaki YAP ifadesi neotonik hayvana göre 1005 kat fazla iken; kol hasarı sonrası 7. günde metamorfik hayvandaki LATS ifadesi neotonik hayvana göre 810 kat fazla çıktığı görüldü. **Tablo 6.5.2**' de KGZ-PZR sayısal veri cinsinden sonuçları görülmektedir. Ayrıca **Şekil 6.5.1**'de grafik hali görülmektedir.

Tablo 6.5.1. Kol kesimi sonrası 7. günde alınan blastema dokularında RNA izolasyonlarının konsantrasyon değerleri.

7.Gün Deney Grubu	RNA CONC(NG/UL)	A260/280	A260/230
Metamorfik	57,7	1,89	0,8
Neotonik	606,6	1,90	0,73

Tablo 6.5.2. Kol kesimi sonrası 7. günde alınan blastema dokularında YAP ve LATS ifade seviyeleri. 7. günde metamorfik hayvanda neotonik hayvana kıyasla YAP ifadesi 1005 kat fazla iken; metamorfik hayvanda neotonik hayvana kıyasla YAP ifadesi 810 kat fazladır.

Kol Kesimi Sonrası 7. Gün Grupları	İfade Seviyeleri
Neotonik YAP İfadesi	1
Metamorfik YAP İfadesi	1005
Neotonik LATS İfadesi	1
Metamorfik LATS İfadesi	810



Şekil 6.5.1. Kol kesimi sonrası 7. günde alınan blastema dokularında YAP ve LATS ifade seviyelerinin grafikte gösterimi. YAP ve LATS ifadelerinde tespit edilen metamorfik ve neotonik hayvanlardaki fark anlamlı değişkendir ($p < 0.001$, ***).

6.6. Kol Kesiminden 10 Gün Sonra Yapılan Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu Ve İmmünohistokimya Sonuçları

Morfolino enjeksiyonu için çalışmamızda 10. gün seçildi. 10. günde morfolino enjeksiyonları yapıldı. Bu deney grubunda enjeksiyon yapılmadan önceki YAP ve LATS ifadeleri tespit edildi. Aynı zamanda immünohistokimya deneyleri ile protein düzeyinde de YAP, fosfo-YAP, fosfo-LATS ve PCNA proteinlerinin lokasyonları ve oranları belirlendi. PCNA boyaması, hücrelerin tamamen çoğalan hücreler olduklarını göstermek için yapıldı. KGZ-PZR sonuçlarına göre neotonik hayvandaki YAP seviyesi metamorfik hayvana göre 72 kat fazla iken; neotonik hayvandaki LATS seviyesi metamorfik hayvana göre 87 kat fazla olduğu anlaşıldı. Bu oranların 7. günde çıkan verilere ters çıktığı görüldü. Bu deney grubunda hayvanlardan izole edilen RNA miktarları ve saflıkları **Tablo 6.6.1**'dedir. Yapılan karşılaştırmalarda az ifade edilen

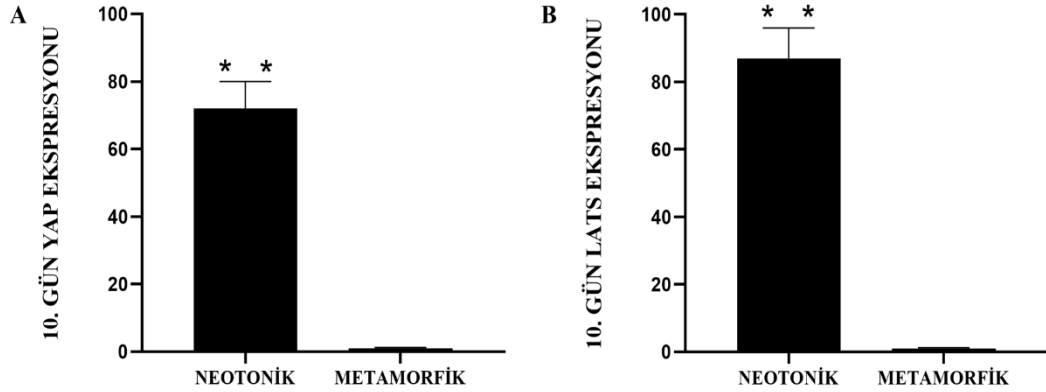
proteinin katsayısı 1 olarak ayarlandı. **Tablo 6.6.2'** de KGZ-PZR sayısal veri cinsinden sonuçları görülmektedir. Ayrıca **Şekil 6.6.1'**de grafik hali görülmektedir.

Tablo 6.6.1. Kol kesimi sonrası 10. günde alınan blastema dokularında RNA izolasyonlarının konsantrasyon değerleri.

10.Gün Deneç Grubu	RNA CONC(NG/UL)	A260/280	A260/230
Metamorfik	212,7	1,95	1,67
Neotonik	76,4	1,97	1,66

Tablo 6.6.2. Kol kesimi sonrası 10. günde alınan blastema dokularında YAP ve LATS ifade seviyeleri. 10. günde neotonik hayvanda metamorfik hayvana kıyasla YAP ifadesi 72 kat fazla iken; neotonik hayvanda metamorfik hayvana kıyasla LATS ifadesi 87 kat fazladır.

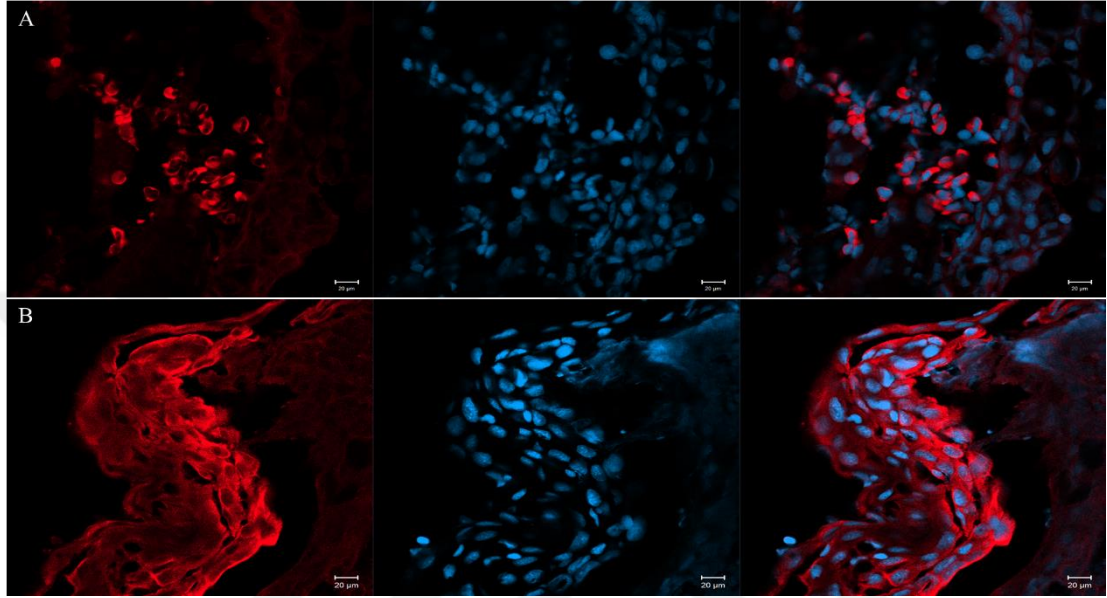
Kol Kesimi Sonrası 7. Gün Grupları	İfade Seviyeleri
Neotonik YAP İfadesi	72
Metamorfik YAP İfadesi	1
Neotonik LATS İfadesi	87
Metamorfik LATS İfadesi	1



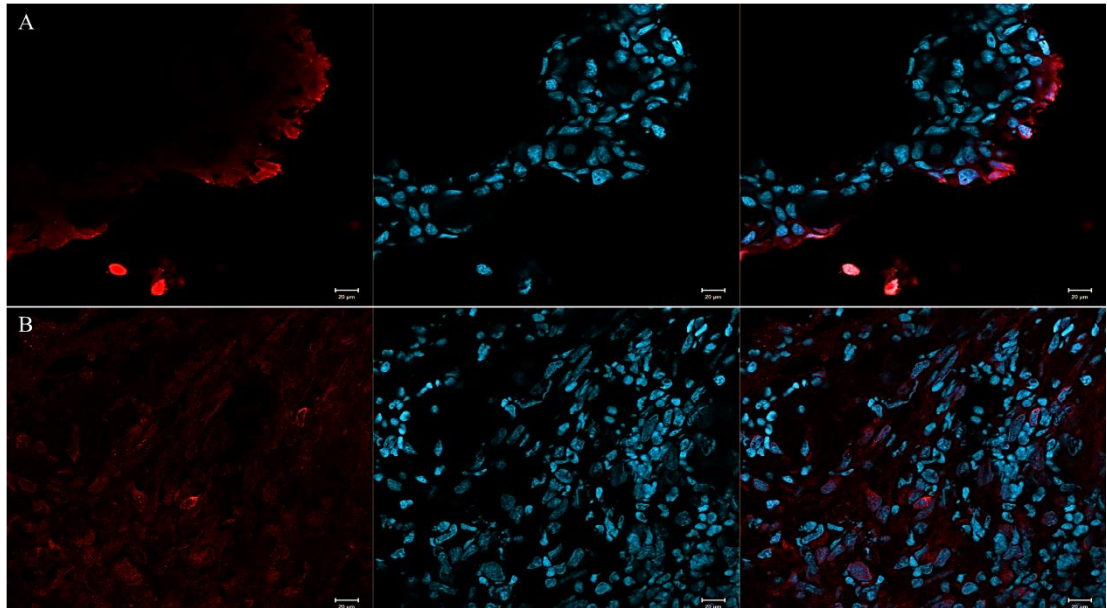
Şekil 6.6.1. Kol kesimi sonrası 10. günde alınan blastema dokularında YAP ve LATS ifade seviyelerinin grafikte gösterimi. YAP ve LATS ifadelerinde tespit edilen metamorfik ve neotonik hayvanlardaki fark anlamlı değişkendir (0.05 < p < 0.001, **).

10. gündeki neotonik ve metamorfik hayvanlarda PCNA boyaması sitoplazmada (bütün hücrelerde) görülmüştür (**Resim 6.6.1 A** ve **Resim 6.6.1 B**). Bu sonuç literatürde olan boyamalara ters düşmektedir. Fakat PCNA proteininin sitoplazmada da çeşitli roller üstlendiği gösterilmiştir. İmmünohistokimya sonuçlarına göre 10. günde neotonik hayvanda YAP pozitif hücre oranı %13,12 iken (**Resim 6.6.2 A**); metamorfik hayvanda YAP pozitif hücre oranı %3,03 çıkmıştır (**Resim 6.6.2 B**). 10. günde neotonik hayvanda fosfo-YAP pozitif hücre oranı %27,87 iken (**Resim 6.6.3 A**); metamorfik hayvanda LATS pozitif hücre oranı %23,29 çıkmıştır (**Resim 6.6.3 B**). 10. günde neotonik hayvanda fosfo-LATS pozitif hücre oranı %2,75 iken (**Resim**

6.6.4 A); metamorfik hayvanda fosfo-LATS pozitif hücre oranı %6,66 çıkmıştır (**Resim 6.6.4 B**). Neotonik ve metamorfik hayvanlarda (kol kesiminden sonra 10. Gün) görülen YAP, fosfo-YAP ve fosfo-LATS boyamalarının yüzdeleri, toplamda sayılan hücre sayıları ve birbirlerine göre anlamlılıkları **Tablo 6.6.3**'tedir. KGZ-PZR ve İmmünohistokimya sonuçları YAP bakımından birbirleri ile tutarlı iken; LATS proteini açısından tutarlı çıkmadığı görülmüştür.

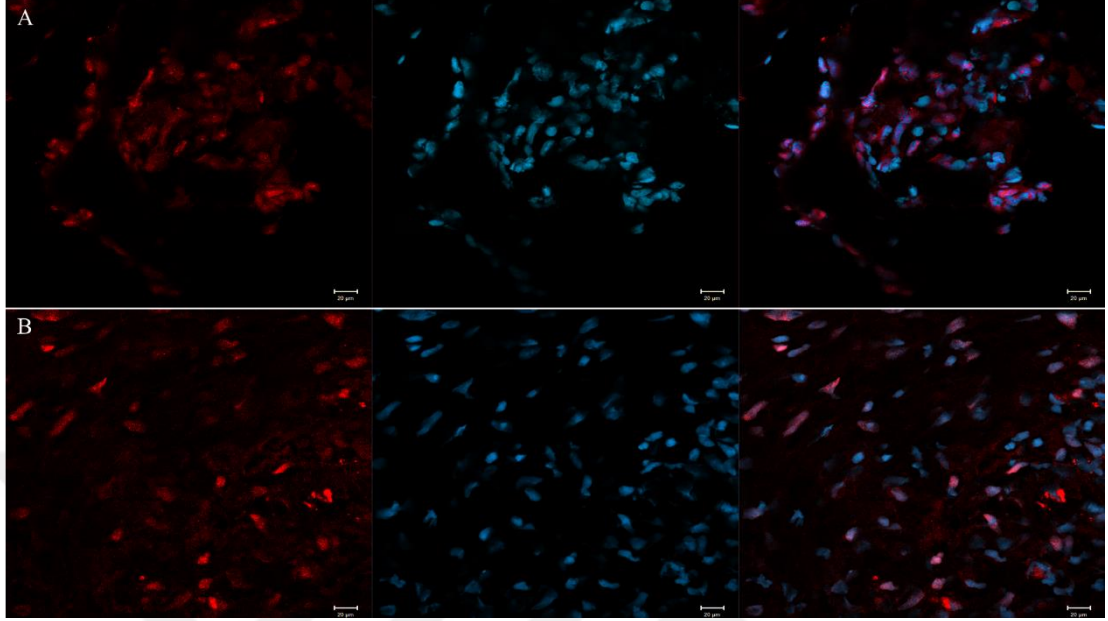


Resim 6.6.1. Neotonik ve metamorfik hayvanlardaki blastema dokularında yapılan PCNA boyamaları. Kırmızı PCNA ve Mavi DAPI'yi göstermektedir. A. Neotonik hayvandan izole edilen blastema dokusunda bütün hücrelerde PCNA boyaması pozitif görüldü. B. Metamorfik hayvandan izole edilen blastema dokusunda bütün hücrelerde PCNA boyaması pozitif görüldü. Referans çubuğu 20 µm'yi göstermektedir.

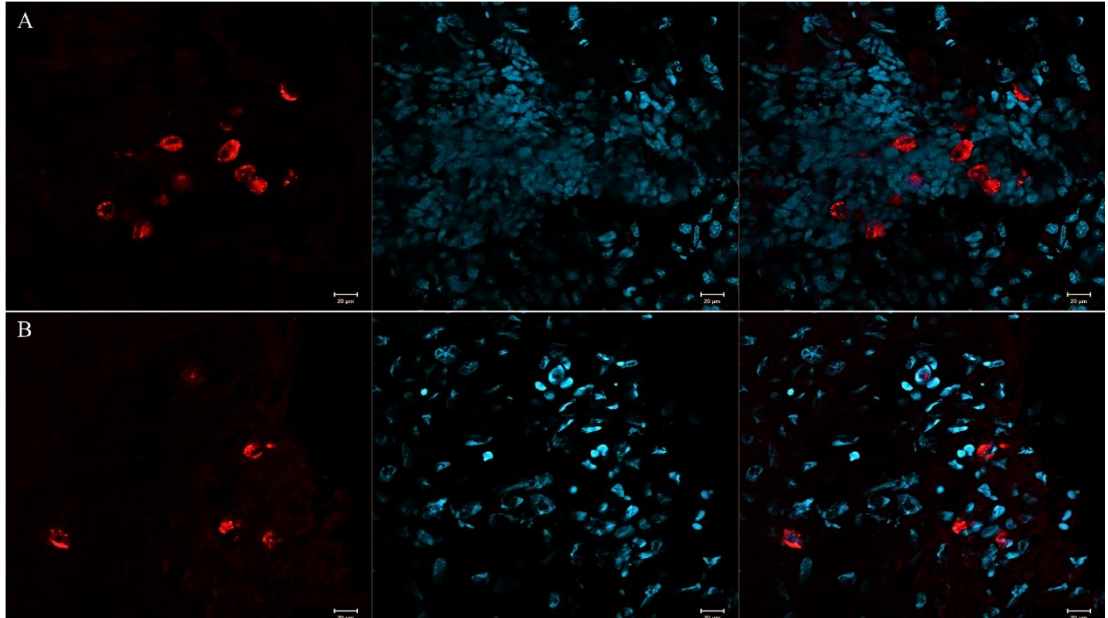


Resim 6.6.2. Neotonik ve metamorfik hayvanlardaki blastema dokularında yapılan YAP boyamaları. Kırmızı YAP ve Mavi DAPI'yi göstermektedir. YAP iki grupta da hem sitoplazmada hem de çekirdekte

görüldü. A. Neotonik hayvandan izole edilen blastema dokusunda YAP boyaması %13,12 oranında pozitif görüldü. B. Metamorfik hayvandan izole edilen blastema dokusunda YAP boyaması %3,03 oranında pozitif görüldü. Referans çubuğu 20 µm'yi göstermektedir.



Resim 6.6.3. Neotonik ve metamorfik hayvanlardaki blastema dokularında yapılan fosfo-YAP boyamaları. Kırmızı fosfo-YAP ve Mavi DAPI'yi göstermektedir. fosfo-YAP iki grupta da hem sitoplazmada hem de çekirdekte görüldü. Normalde fosfo proteinlerin çekirdekte görüldüğüne dair çok az rapor bulunmaktadır. A. Neotonik hayvandan izole edilen blastema dokusunda fosfo-YAP boyaması %27,87 oranında pozitif görüldü. B. Metamorfik hayvandan izole edilen blastema dokusunda fosfo-YAP boyaması %23,29 oranında pozitif görüldü. Referans çubuğu 20 µm'yi göstermektedir.



Resim 6.6.4. Neotonik ve metamorfik hayvanlardaki blastema dokularında yapılan fosfo-LATS boyamaları. Kırmızı fosfo-LATS ve Mavi DAPI'yi göstermektedir. fosfo-LATS iki grupta da sitoplazmada görüldü. A. Neotonik hayvandan izole edilen blastema dokusunda fosfo-LATS boyaması %2,75 oranında pozitif görüldü. B. Metamorfik hayvandan izole edilen blastema dokusunda fosfo-YAP boyaması %6,66 oranında pozitif görüldü. Referans çubuğu 20 µm'yi göstermektedir.

Tablo 6.6.3. Neotonik ve metamorfik hayvanlarda kol kesiminden sonra 10. gün YAP, fosfo-YAP ve fosfo-LATS boyama sonuçları. YAP pozitif hücre yüzdesi neotonik hayvanda %13,12 olurken; metamorfik hayvanda bu oran %3,03 çıktı. Bu sonuçlar iki grupta istatistiksel olarak anlamlı farklıdır. fosfo-YAP pozitif hücre yüzdesi neotonik hayvanda %27,87 olurken; metamorfik hayvanda bu oran %23,29 çıktı. Bu sonuçlar iki grupta istatistiksel olarak anlamlı değildir. fosfo-LATS pozitif hücre yüzdesi neotonik hayvanda %2,75 olurken; metamorfik hayvanda bu oran %6,66 çıktı. Bu sonuçlar iki grupta istatistiksel olarak anlamlı değildir.

Protein	Neotonik 10. Gün Yüzde (Sayılan Hücre Sayısı (n))	Metamorfik 10. Gün Yüzde (Sayılan Hücre Sayısı (n))	Gruplar Arasında İstatistiksel Anlamlılık
YAP	%13,12 (n=320)	%3,03 (n=330)	Anlamlı (***)
Fosfo-YAP	%27,87 (n=226)	%23,29 (n=176)	Anlamsız
Fosfo-LATS	%2,75 (n=254)	%6,66 (n=270)	Anlamlı (*)

6.7. YAP Ve LATS Morfolino Enjekte Edilen Neotonik Ve Metamorfik Hayvanlardaki Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu, İmmünohistokimya, Western Blot Ve Proteomiks Sonuçları

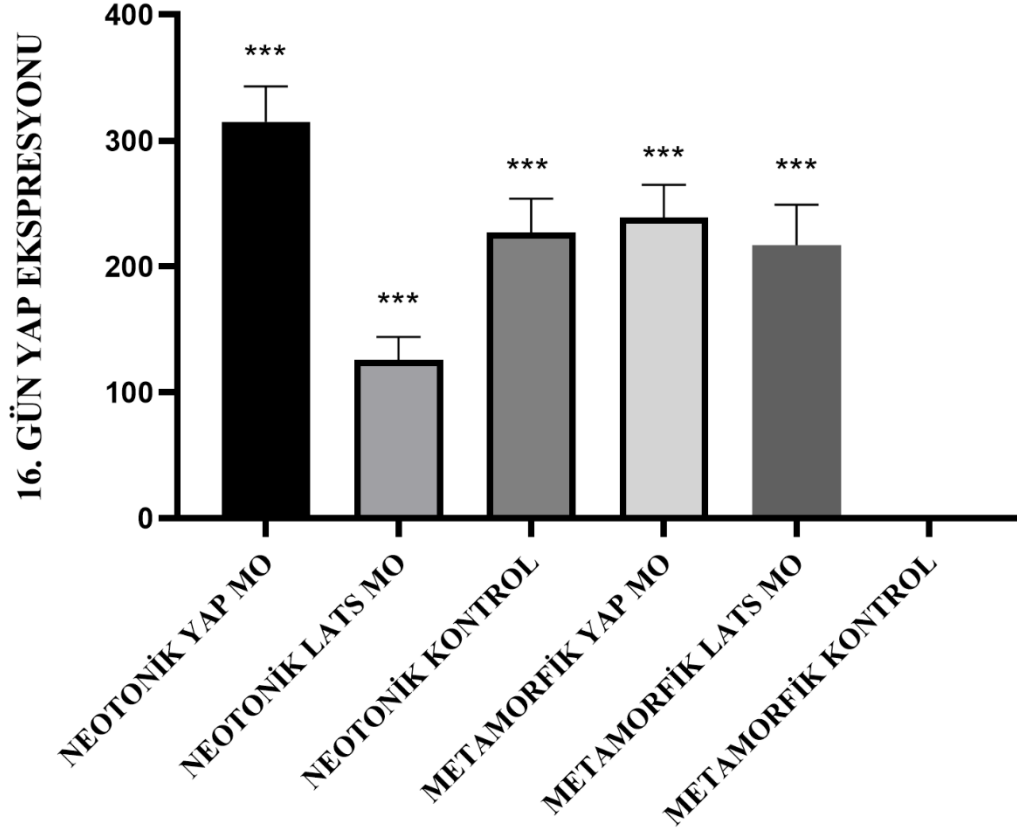
6.7.1. Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Kol kesiminden 10 gün sonra YAP ve LATS mRNA inhibisyonu için sentez edilen morfolinolar (MO) blastema dokularına enjekte edildi. Ardından elektroporasyon yapıldı. Enjeksiyon sonrası 6 gün beklenildi. Bu deneyler hem metamorfik hem de neotonik hayvanlarda yapıldı. İzole edilen dokularda KGZ-PZR, immünohistokimya (YAP, fosfo-YAP ve fosfo-LATS) ve proteomiks deneyleri yapıldı.

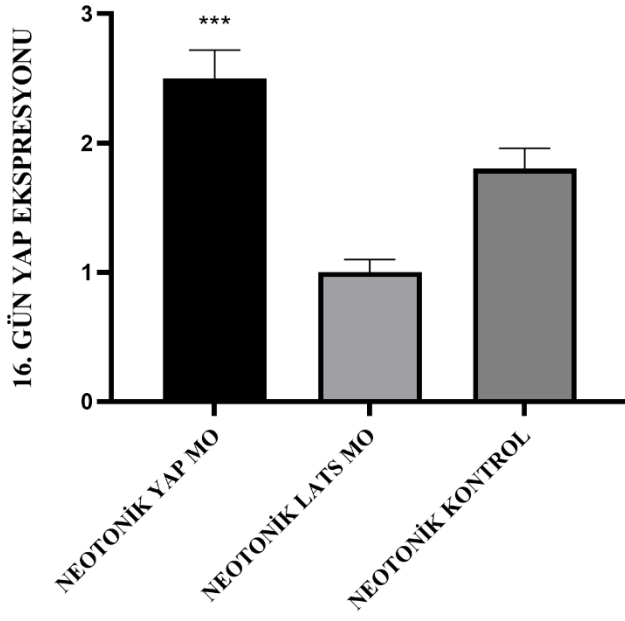
KGZ-PZR deneylerinde metamorfik ve neotonik hayvanlarda bulunan değerler en az ifade seviyesi gösteren gruba göre birbirleri ile karşılaştırıldı. Ayrıca grupla neotonik ve metamorfik olarak kendi aralarında da karşılaştırıldı.

Metamorfik ve neotonik hayvanlarda yapılan inhibisyonlar sonucunda YAP ifade sonuçlarında metamorfik kontrol grubunun katsayısı 1 iken; neotonik YAP MO (YAP inhibe edilen) grupta YAP ifadesi katsayısı 315, neotonik LATS MO (LATS inhibe edilen) grupta YAP ifadesi katsayısı 126, neotonik kontrol grubunda YAP ifadesi katsayısı 227, metamorfik YAP MO (YAP inhibe edilen) grupta YAP ifadesi katsayısı 239 ve metamorfik LATS MO (LATS inhibe edilen) grupta YAP ifadesi katsayısı 239 çıkmıştır. Neotonik hayvanların inhibisyonlu gruplarında kendi aralarında yapılan katsayı karşılaştırmalarına göre; neotonik LATS MO (LATS inhibe edilen) grupta YAP ifadesi katsayısı 1 iken, neotonik YAP MO (YAP inhibe edilen) grupta YAP ifadesi katsayısı 2,5 ve neotonik kontrol grubunda YAP ifadesi katsayısı 1,8 çıkmıştır. YAP ifadelerindeki sonuçlara göre metamorfik hayvanlarda yapılan inhibisyonlar

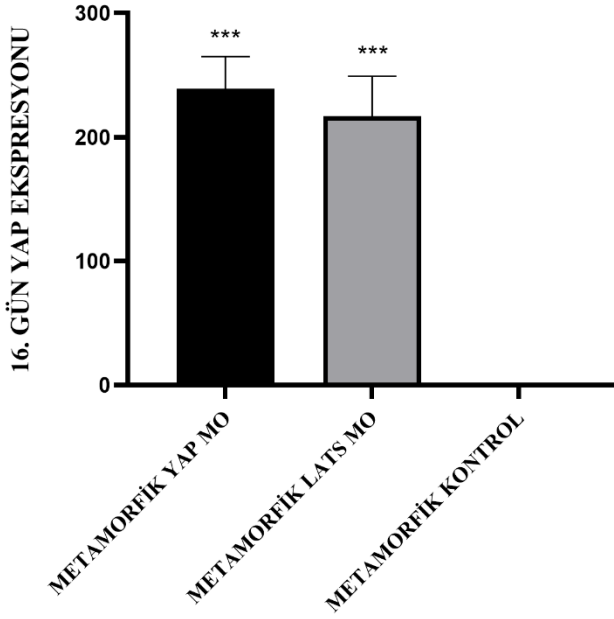
sonucunda YAP ifadeleri, neotonik hayvanlardaki YAP ifadesine yakın çıkmıştır. 16. gündeki bütün gruplardaki YAP ifadeleri **Şekil 6.7.1.1**'de gösterilmiştir. Neotonik hayvanlarda yapılan deneylerde elde edilen YAP ifadeleri **Şekil 6.7.1.2**'dedir. Metamorfik hayvanlarda yapılan deneylerde elde edilen YAP ifadeleri **Şekil 6.7.1.3**'dedir. Gruplar arasında yapılan tüm istatistiklerin sonuçları **Tablo 6.7.1.1**'dedir. Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklı çıkan gruplar **Tablo 6.7.1.2**'dedir.



Şekil 6.7.1.1. 10. Günde YAP ve LATS mRNA inhibisyonları yapılan neotonik ve metamorfik deney gruplarındaki 16. Gün YAP ifade profilleri.



Şekil 6.7.1.2. 10. Günde YAP ve LATS mRNA inhibisyonları yapılan neotonik deney gruplarındaki 16. Gün YAP ifade profilleri.



Şekil 6.7.1.3. 10. Günde YAP ve LATS mRNA inhibisyonları yapılan metamorfik deney gruplarındaki 16. Gün YAP ifade profilleri.

Tablo 6.7.1.1. 10. Günde YAP ve LATS mRNA inhibisyonları yapılan (Morfolino (mo) enjeksiyonu yapılan)neotonik ve metamorfik deney gruplarındaki 16. Gün YAP ifade profillerinin istatistiksel olarak karşılaştırılması

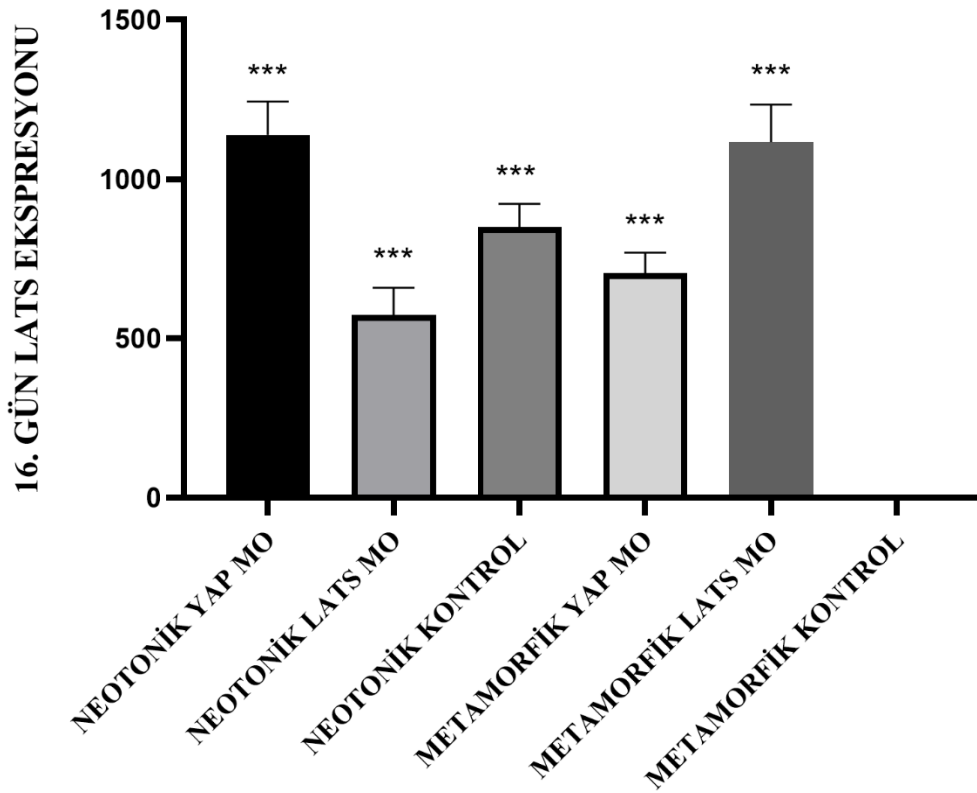
		Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
neotonik yap mo	neotonik lats mo	-1,51000*	,26176	,000	-2,3080	-,7120
	neotonik kontrol	-,78333	,26176	,057	-1,5813	,0146
	metamorfik yap mo	-,40833	,26176	,630	-1,2063	,3896
	metamorfik lats mo	-,23900	,27454	,951	-1,0759	,5979
	metamorfik kontrol	-8,42667*	,26176	,000	-9,2246	-7,6287
neotonik lats mo	neotonik yap mo	1,51000*	,26176	,000	,7120	2,3080
	neotonik kontrol	,72667	,26176	,090	-,0713	1,5246
	metamorfik yap mo	1,10167*	,26176	,003	,3037	1,8996
	metamorfik lats mo	1,27100*	,27454	,001	,4341	2,1079
	metamorfik kontrol	-6,91667*	,26176	,000	-7,7146	-6,1187
neotonik kontrol	neotonik yap mo	,78333	,26176	,057	-,0146	1,5813
	neotonik lats mo	-,72667	,26176	,090	-1,5246	,0713
	metamorfik yap mo	,37500	,26176	,708	-,4230	1,1730
	metamorfik lats mo	,54433	,27454	,376	-,2926	1,3813
	metamorfik kontrol	-7,64333*	,26176	,000	-8,4413	-6,8454
metamorfik yap mo	neotonik yap mo	,40833	,26176	,630	-,3896	1,2063
	neotonik lats mo	-1,10167*	,26176	,003	-1,8996	-,3037
	neotonik kontrol	-,37500	,26176	,708	-1,1730	,4230

	metamorfik lats mo	,16933	,27454	,989	-,6676	1,0063
	metamorfik kontrol	-8,01833*	,26176	,000	-8,8163	-7,2204
metamorfik lats mo	neotonik yap mo	,23900	,27454	,951	-,5979	1,0759
	neotonik lats mo	-1,27100*	,27454	,001	-2,1079	-,4341
	neotonik kontrol	-,54433	,27454	,376	-1,3813	,2926
	metamorfik yap mo	-,16933	,27454	,989	-1,0063	,6676
	metamorfik kontrol	-8,18767*	,27454	,000	-9,0246	-7,3507
metamorfik kontrol	neotonik yap mo	8,42667*	,26176	,000	7,6287	9,2246
	neotonik lats mo	6,91667*	,26176	,000	6,1187	7,7146
	neotonik kontrol	7,64333*	,26176	,000	6,8454	8,4413
	metamorfik yap mo	8,01833*	,26176	,000	7,2204	8,8163
	metamorfik lats mo	8,18767*	,27454	,000	7,3507	9,0246

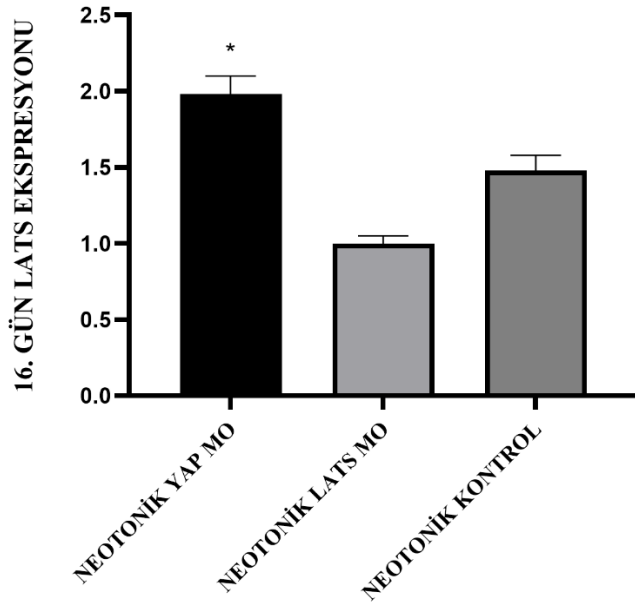
Tablo 6.7.1.2. 10. Günde YAP ve LATS mRNA inhibisyonları yapılan neotonik ve metamorfik deney gruplarındaki 16. Gün YAP ifade profillerinin arasında istatistiksel olarak anlamlı fark çıkan gruplar ve anlamlılık derecesi.

Gruplar	neotonik yap mo	neotonik lats mo	neotonik kontrol	metamorfik yap mo	metamorfik lats mo	metamorfik kontrol
neotonik yap mo		Anlamlı (***)				Anlamlı (***)
neotonik lats mo	Anlamlı (***)			Anlamlı (**)	Anlamlı (**)	Anlamlı (***)
neotonik kontrol						Anlamlı (***)
metamorfik yap mo		Anlamlı (**)				Anlamlı (***)
metamorfik lats mo		Anlamlı (**)				Anlamlı (***)
metamorfik kontrol	Anlamlı (***)	Anlamlı (***)	Anlamlı (***)	Anlamlı (***)	Anlamlı (***)	

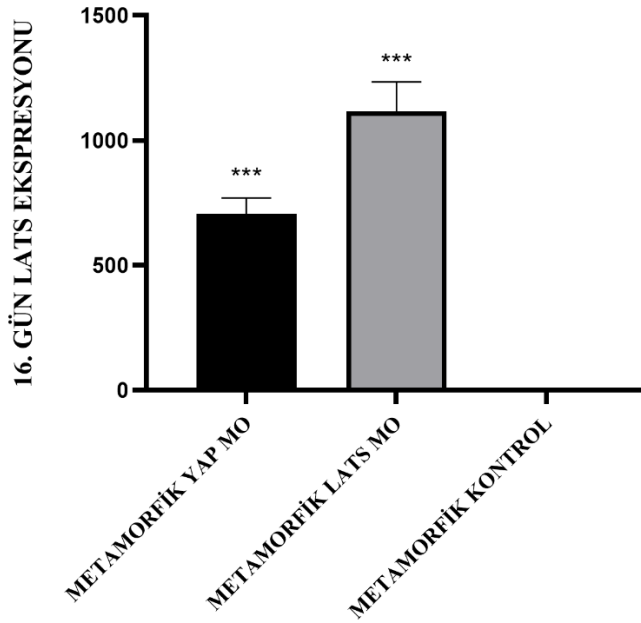
Metamorfik ve neotonik hayvanlarda yapılan inhibisyonlar sonucunda LATS ifade sonuçlarında metamorfik kontrol grubunun katsayısı 1 iken; neotonik YAP MO (YAP inhibe edilen) grupta LATS ifadesi katsayısı 1139, neotonik LATS MO (LATS inhibe edilen) grupta LATS ifadesi katsayısı 573, neotonik kontrol grubunda LATS ifadesi katsayısı 849, metamorfik YAP MO (YAP inhibe edilen) grupta LATS ifadesi katsayısı 705 ve metamorfik LATS MO (LATS inhibe edilen) grupta LATS ifadesi katsayısı 1116 çıkmıştır. Neotonik hayvanların inhibisyonlu gruplarında kendi aralarında yapılan katsayı karşılaştırmalarına göre; neotonik LATS MO (LATS inhibe edilen) grupta LATS ifadesi katsayısı 1 iken, neotonik YAP MO (YAP inhibe edilen) grupta LATS ifadesi katsayısı 1,98 ve neotonik kontrol grubunda LATS ifadesi katsayısı 1,48 çıkmıştır. LATS ifadelerindeki sonuçlara göre metamorfik hayvanlarda yapılan inhibisyonlar sonucunda LATS ifadeleri, neotonik hayvanlardaki LATS ifadesine yakın çıkmıştır. 16. gündeki bütün gruplardaki LATS ifadeleri **Şekil 6.7.1.4**'de gösterilmiştir. Neotonik hayvanlarda yapılan deneylerde elde edilen LATS ifadeleri **Şekil 6.7.1.5**'dedir. Metamorfik hayvanlarda yapılan deneylerde elde edilen LATS ifadeleri **Şekil 6.7.1.6**'dedir. Gruplar arasında yapılan tüm istatistiklerin sonuçları **Tablo 6.7.1.3**'dedir. Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklı çıkan gruplar **Tablo 6.7.1.4**'dedir.



Şekil 6.7.1.4. 10. Günde YAP ve LATS mRNA inhibisyonları yapılan neotonik ve metamorfik deney gruplarındaki 16. Gün LATS ifade profilleri.



Şekil 6.7.1.5. 10. Günde YAP ve LATS mRNA inhibisyonları yapılan neotonik deney gruplarındaki 16. Gün LATS ifade profilleri.



Şekil 6.7.1.6. 10. Günde YAP ve LATS mRNA inhibisyonları yapılan metamorfik deney gruplarındaki 16. Gün LATS ifade profilleri.

Tablo 6.7.1.3. 10. Günde YAP ve LATS mRNA inhibisyonları yapılan (Morfolino (mo) enjeksiyonu yapılan) neotonik ve metamorfik deney gruplarındaki 16. Gün LATS ifade profillerinin istatistiksel olarak karşılaştırılması.

		Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
neotonik yap mo	neotonik lats mo	-1,17833*	,34769	,023	-2,2383	-,1184
	neotonik kontrol	-,73667	,34769	,306	-1,7966	,3233
	metamorfik yap mo	-,70000	,34769	,360	-1,7599	,3599
	metamorfik lats mo	-,51400	,36466	,721	-1,6257	,5977
	metamorfik kontrol	-10,28167*	,34769	,000	-11,3416	-9,2217
neotonik lats mo	neotonik yap mo	1,17833*	,34769	,023	,1184	2,2383
	neotonik kontrol	,44167	,34769	,798	-,6183	1,5016
	metamorfik yap mo	,47833	,34769	,741	-,5816	1,5383
	metamorfik lats mo	,66433	,36466	,468	-,4473	1,7760
	metamorfik kontrol	-9,10333*	,34769	,000	-10,1633	-8,0434
neotonik kontrol	neotonik yap mo	,73667	,34769	,306	-,3233	1,7966
	neotonik lats mo	-,44167	,34769	,798	-1,5016	,6183
	metamorfik yap mo	,03667	,34769	1,000	-1,0233	1,0966

	metamorfik lats mo	,22267	,36466	,989	-,8890	1,3343
	metamorfik kontrol	-9,54500*	,34769	,000	-10,6049	-8,4851
metamorfik yap mo	neotonik yap mo	,70000	,34769	,360	-,3599	1,7599
	neotonik lats mo	-,47833	,34769	,741	-1,5383	,5816
	neotonik kontrol	-,03667	,34769	1,000	-1,0966	1,0233
	metamorfik lats mo	,18600	,36466	,995	-,9257	1,2977
	metamorfik kontrol	-9,58167*	,34769	,000	-10,6416	-8,5217
metamorfik lats mo	neotonik yap mo	,51400	,36466	,721	-,5977	1,6257
	neotonik lats mo	-,66433	,36466	,468	-1,7760	,4473
	neotonik kontrol	-,22267	,36466	,989	-1,3343	,8890
	metamorfik yap mo	-,18600	,36466	,995	-1,2977	,9257
	metamorfik kontrol	-9,76767*	,36466	,000	-10,8793	-8,6560
metamorfik kontrol	neotonik yap mo	10,28167*	,34769	,000	9,2217	11,3416
	neotonik lats mo	9,10333*	,34769	,000	8,0434	10,1633
	neotonik kontrol	9,54500*	,34769	,000	8,4851	10,6049

	metamorfik yap mo	9,58167*	,34769	,000	8,5217	10,6416
	metamorfik lats mo	9,76767*	,36466	,000	8,6560	10,8793

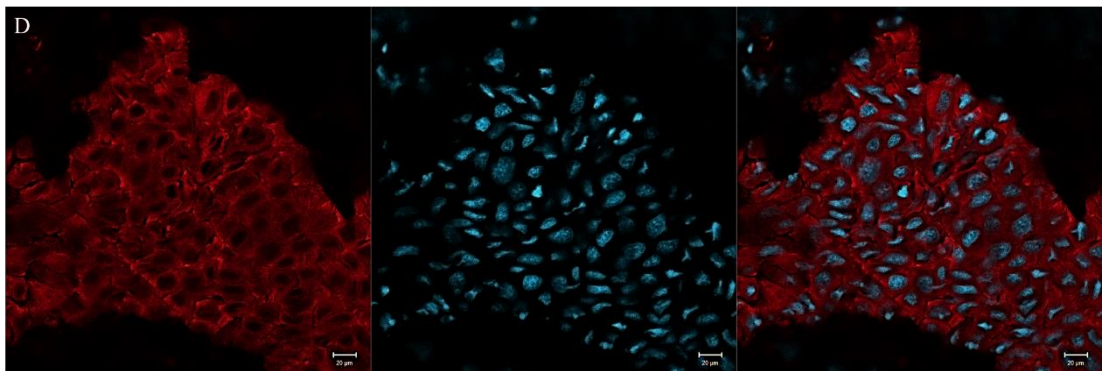
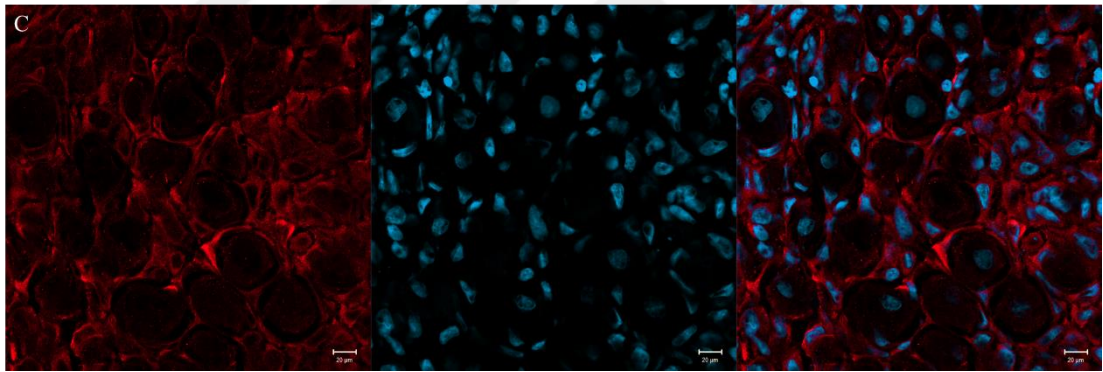
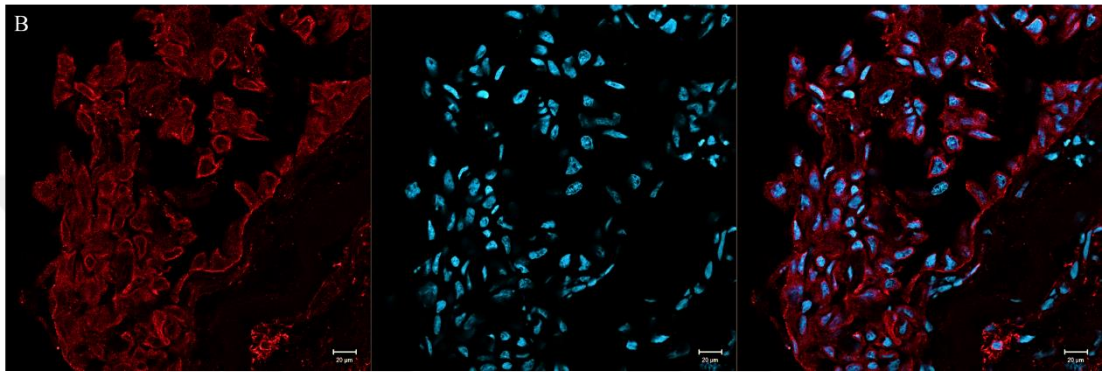
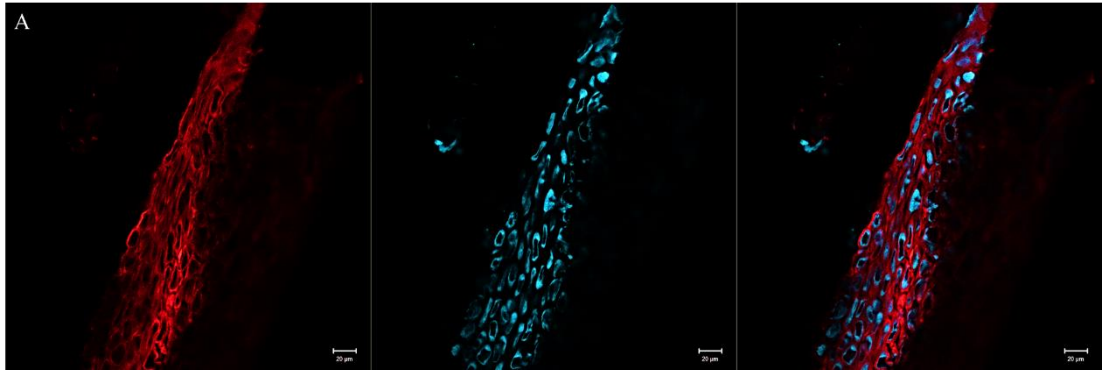
Tablo 6.7.1.4. 10. Günde YAP ve LATS mRNA inhibisyonları yapılan neotonik ve metamorfik deney gruplarındaki 16. Gün LATS ifade profillerinin arasında istatistiksel olarak anlamlı fark çıkan gruplar ve anlamlılık derecesi.

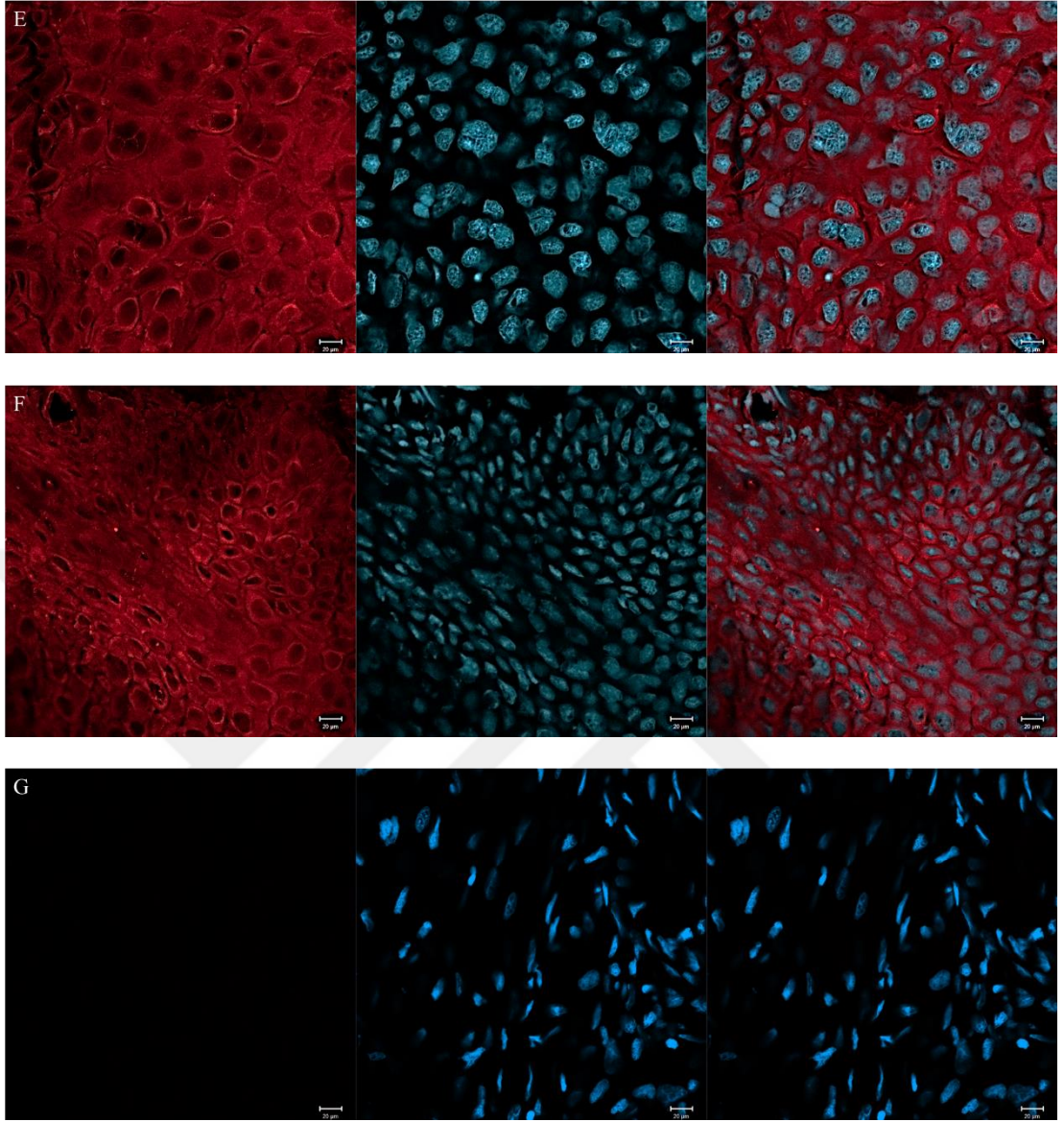
Gruplar	neotonik yap mo	neotonik lats mo	neotonik kontrol	metamorfik yap mo	metamorfik lats mo	metamorfik kontrol
neotonik yap mo		Anlamlı (*)				Anlamlı (***)
neotonik lats mo	Anlamlı (*)					Anlamlı (***)
neotonik kontrol						Anlamlı (***)
metamorfik yap mo						Anlamlı (***)
metamorfik lats mo						Anlamlı (***)
metamorfik kontrol	Anlamlı (***)	Anlamlı (***)	Anlamlı (***)	Anlamlı (***)	Anlamlı (***)	

6.7.2. İmmünohistokimya

YAP ve LATS mRNA inhibisyonundan sonra PCNA, YAP, fosfo-YAP ve fosfo-LATS proteinlerinin hücresel lokalizasyonunu ve pozitiflik yüzdesini belirlemek için immünohistokimya deneyleri yapıldı. Bu proteinlerin fosfo hallerinin de tercih edilmesinin sebebi aktif formalarının fosforlu olmasıdır. Hem metamorfik hem neotonik hayvanda kol kesiminden 10 gün sonra YAP ve LATS morfolinoları enjekte edildi. Kontrol grubuna ise PBS enjeksiyonu yapıldı. Tüm gruplarda elektroporasyon işlemi sonrası 6 gün beklenildi. Blastema oluşumundan sonrası akut süreci gözlemek için 6 gün seçildi.

16. günde bütün gruplarda çoğalan hücreleri tespit etmek için çoğalan hücre belirteci olan PCNA boyamaları yapıldı. 16. Gündeki neotonik ve metamorfik hayvanlarda PCNA boyaması sitoplazmada (bütün hücrelerde) görüldü (**Resim 6.7.2.1 A, B, C, D, E ve F**) Bu sonuç literatürde olan boyamalara ters düşmektedir. Fakat PCNA proteininin sitoplazmada da çeşitli roller üstlendiği gösterilmiştir.





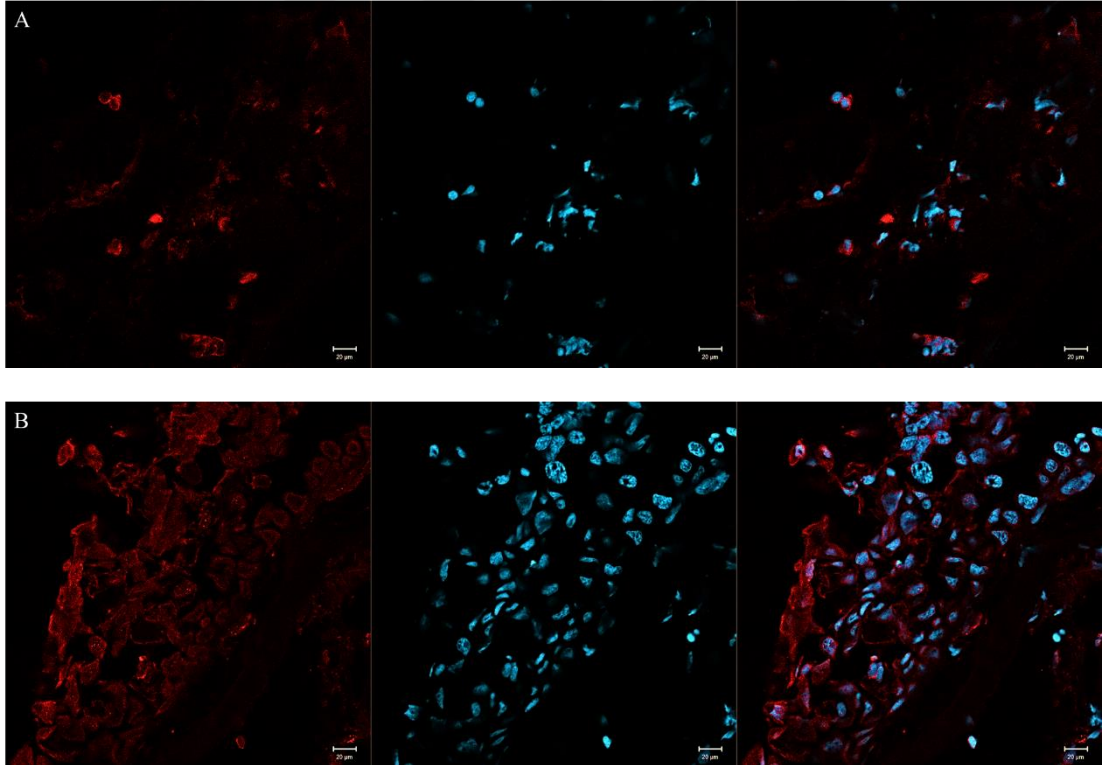
Resim 6.7.2.1. Neotonik ve metamorfik hayvanlarda 16. Günde yapılan PCNA (çoğalan hücre belirteci) boyamaları. Kırmızı PCNA ve Mavi DAPI. A. YAP mRNA inhibe edilen neotonik hayvandaki boyama. B. LATS mRNA inhibe edilen neotonik hayvandaki boyama. C. İnhibisyon yapılmayan neotonik hayvandaki boyama. D. YAP mRNA inhibe edilen metamorfik hayvandaki boyama. E. LATS mRNA inhibe edilen metamorfik hayvandaki boyama. F. İnhibisyon yapılmayan metamorfik hayvandaki boyama. G. Sadece sekonder antikor muamelesi yapılan boyama. Diğer boyamalar sekonder antikor referans alınarak yapıldı. Bütün gruplardaki bütün hücreler, sitoplazmalarında PCNA boyaması göstermiştir. Referans çubuğu 20 µm'yi göstermektedir.

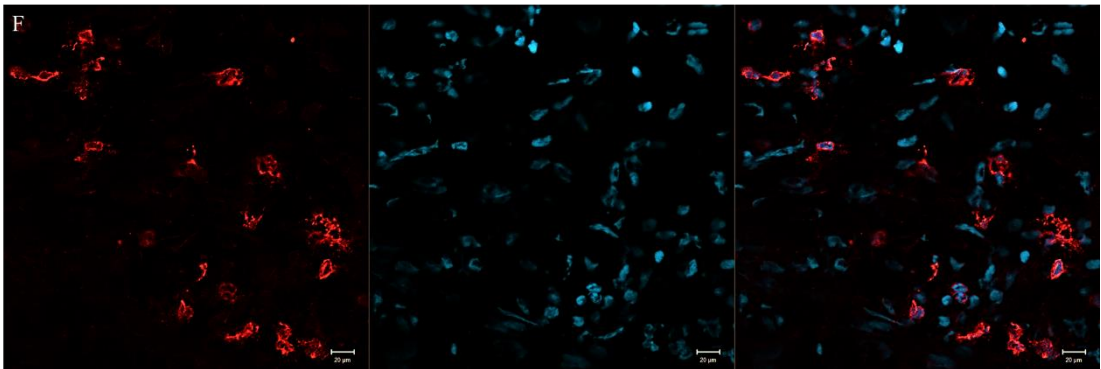
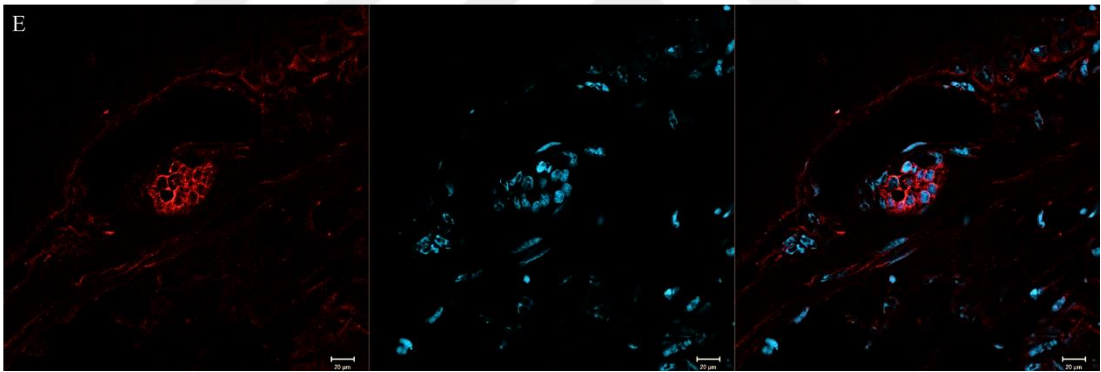
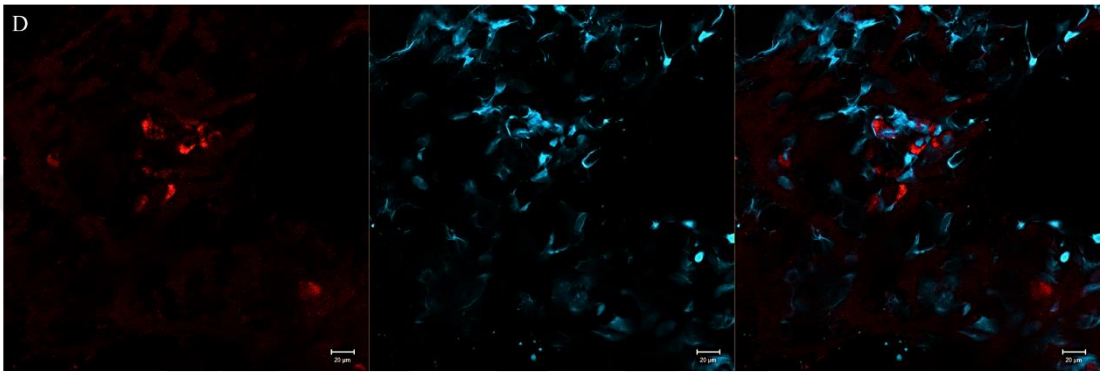
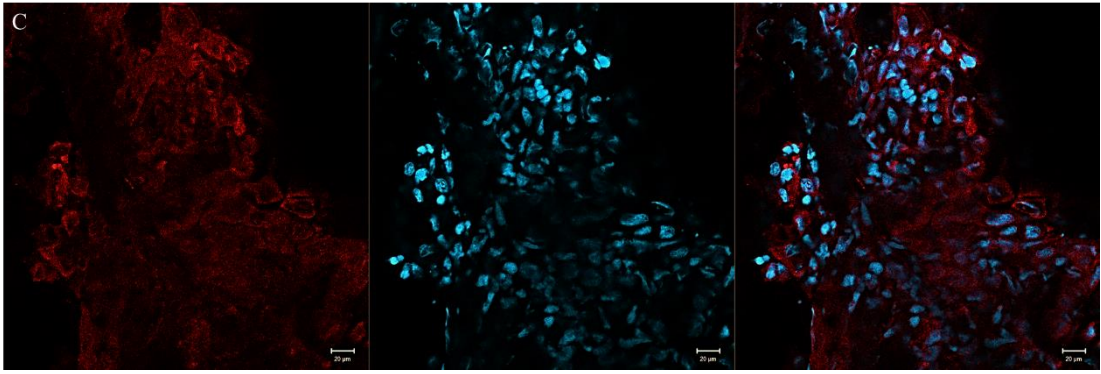
16. günde neotonik hayvan kontrol grubunda YAP pozitif hücre yüzdesi %20,89 iken; YAP inhibe edilen neotonik hayvanda (YAP morfolino (mo) verilen grup) YAP pozitif hücre yüzdesi %6,49 ve LATS inhibe edilen neotonik hayvanda (LATS morfolino (mo) verilen grup) YAP pozitif hücre yüzdesi %25,71 çıkmıştır. Bu durumda neotonik hayvanda YAP inhibisyonu sonrası YAP azalırken; LATS inhibisyonu sonrası YAP oranı artmıştır. Bu durumda neotonik hayvanda YAP inhibisyonundan sonra YAP

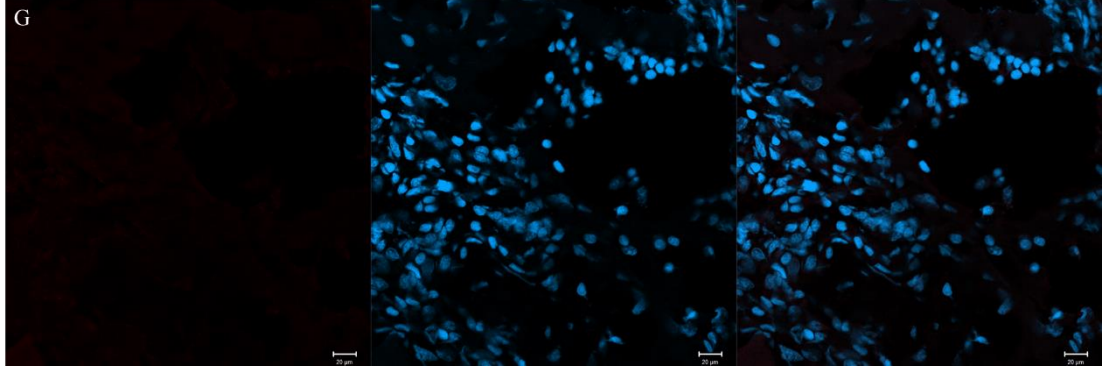
protein düzeyinde azalmanın (inhibisyon sebebiyle) kalıcı olduğu ortaya konulmuştur. Bu sonuçların aynı zamanda KGZ-PZR sonuçlarına göre ters olduğu görülmüştür.

16. günde metamorfik hayvan kontrol grubunda YAP pozitif hücre yüzdesi %13,06 iken; YAP inhibe edilen metamorfik hayvanda (YAP morfolino (mo) verilen grup) YAP pozitif hücre yüzdesi %13,78 ve LATS inhibe edilen metamorfik hayvanda (LATS morfolino (mo) verilen grup) YAP pozitif hücre yüzdesi %5,18 çıkmıştır. Bu durumda metamorfik hayvanda YAP inhibisyonu sonrası YAP yüzdesi %0,75 artarken; LATS inhibisyonu sonrası YAP oranı azalmıştır. Bu durumda metamorfik hayvanda YAP inhibisyonundan sonra YAP protein düzeyinde azalmanın kalıcı olmadığı ortaya konulmuştur. LATS inhibisyonunda ise YAP protein düzeyinde azalmanın kalıcı olduğu gözlemlenmiştir. Bu sonuçların aynı zamanda KGZ-PZR sonuçlarına göre ters olduğu görülmüştür.

Neotonik ve Metamorfik hayvanlarda kontrol grubundaki, YAP morfolino verilen gruplardaki ve LATS morfolino verilen gruplardaki YAP boyama görüntüleri **Resim 6.7.2.2 A, B, C, D, E ve F**'dedir. YAP boyamaları beklendiği gibi bütün gruplarda hem sitoplazmada hem de hücre çekirdeğinde görülmüştür. YAP protein yüzdeleri **Tablo 6.7.2.1**'dedir. YAP protein açısından bütün deney gruplarının istatistiksel karşılaştırmaları **Tablo 6.7.2.2**'dedir.







Resim 6.7.2.2. Neotonik ve metamorfik hayvanlarda 16. Günde yapılan YAP boyamaları. Kırmızı YAP ve Mavi DAPI. A. YAP mRNA inhibe edilen neotonik hayvandaki boyama. B. LATS mRNA inhibe edilen neotonik hayvandaki boyama. C. İnhibisyon yapılmayan neotonik hayvandaki boyama. D. YAP mRNA inhibe edilen metamorfik hayvandaki boyama. E. LATS mRNA inhibe edilen metamorfik hayvandaki boyama. F. İnhibisyon yapılmayan metamorfik hayvandaki boyama. G. Sadece sekonder antikor muamelesi yapılan boyama. Diğer boyamalar sekonder antikor referans alınarak yapıldı. Gruplarda YAP antikorunu, hem sitoplazmada hem de çekirdekte lokalize görülmüştür. Referans çubuğu 20 µm'yi göstermektedir.

Tablo 6.7.2.1. 16. Günde YAP proteininin neotonik ve metamorfik deney gruplarındaki (Kontrol, YAP Morfolino (MO) ve LATS MO) pozitiflik yüzdeleri.

	Kontrol (16. Gün)	YAP MO (16. Gün)	LATS MO (16. Gün)
YAP (Neotonik)	%20,89 (n=268)	%6,49 (n=308)	%25,71 (n=315)
YAP (Metamorfik)	%13,06 (n=398)	%13,78 (n=508)	%5,18 (n=270)

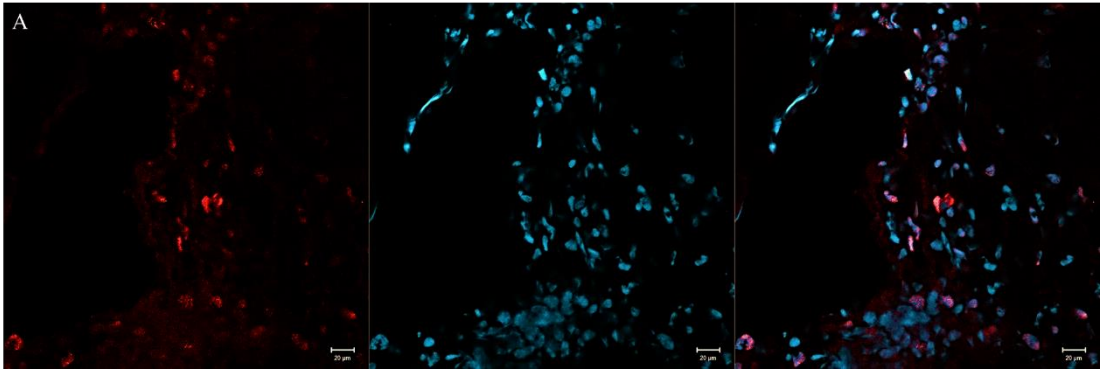
Tablo 6.7.2.2. 10. Günde YAP ve LATS mRNA inhibisyonları yapılan neotonik ve metamorfik deney gruplarındaki 16. Gün YAP protein boyamalarının arasında istatistiksel olarak anlamlı fark çıkan gruplar ve anlamlılık derecesi.

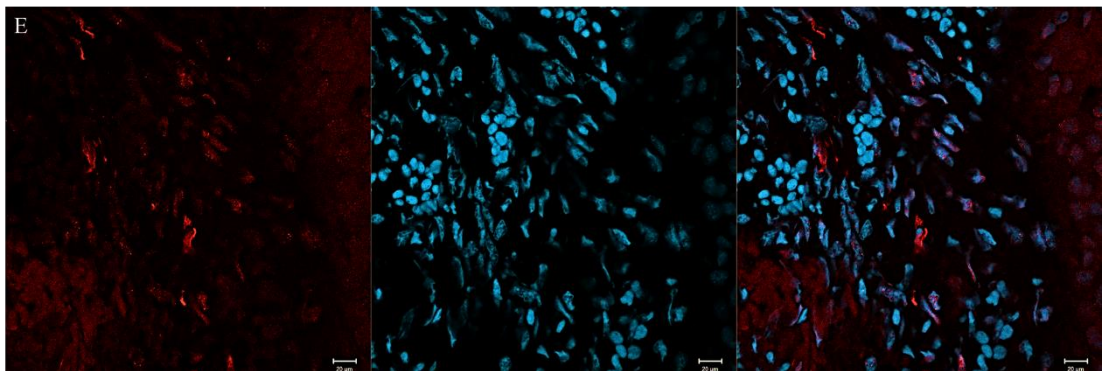
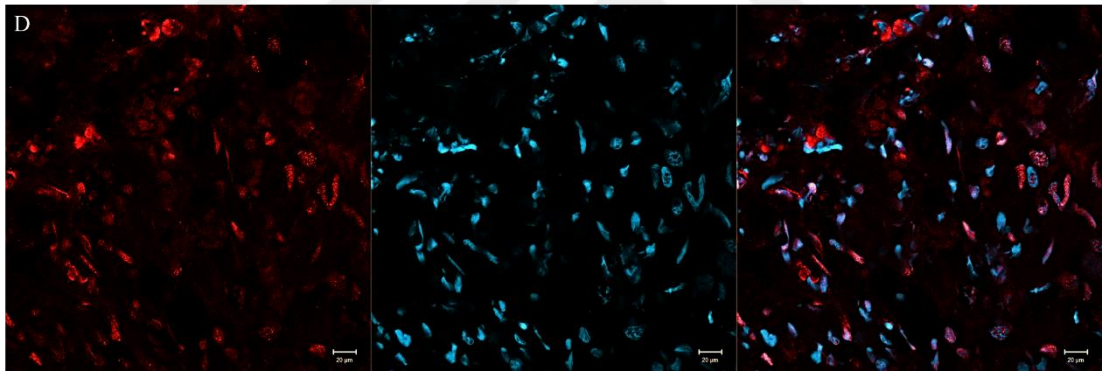
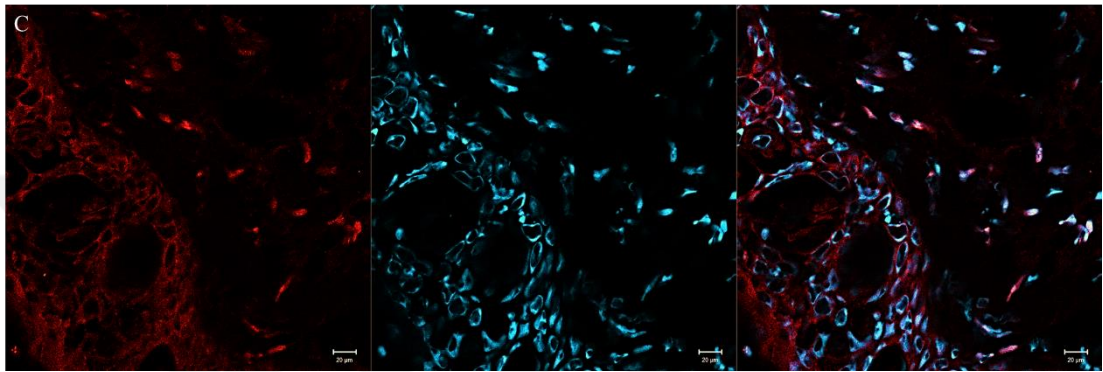
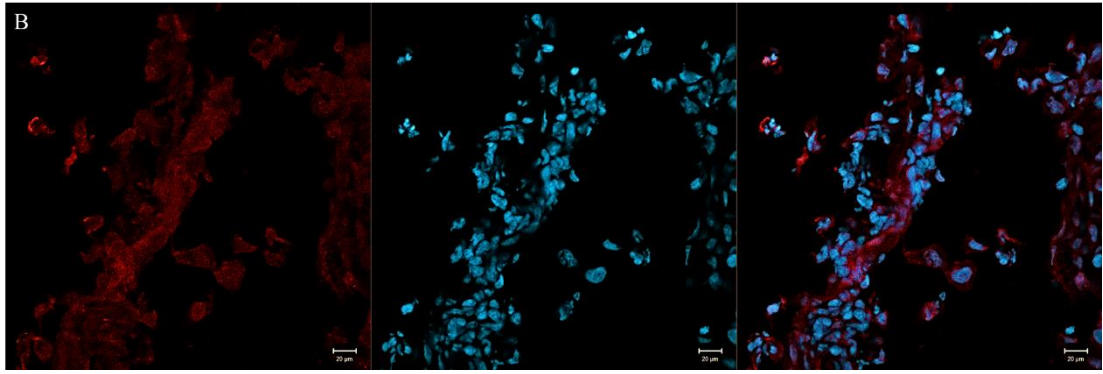
Gruplar	neotonik yap mo	neotonik lats mo	neotonik kontrol	metamorfik yap mo	metamorfik lats mo	metamorfik kontrol
neotonik yap mo		Anlamlı (***)	Anlamlı (***)	Anlamlı (**)		Anlamlı (**)
neotonik lats mo	Anlamlı (***)			Anlamlı (***)	Anlamlı (***)	Anlamlı (***)
neotonik kontrol	Anlamlı (***)			Anlamlı (*)	Anlamlı (***)	Anlamlı (**)
metamorfik yap mo	Anlamlı (**)	Anlamlı (***)	Anlamlı (*)		Anlamlı (***)	
metamorfik lats mo		Anlamlı (***)	Anlamlı (***)	Anlamlı (***)		Anlamlı (***)
metamorfik kontrol	Anlamlı (**)	Anlamlı (***)	Anlamlı (**)		Anlamlı (***)	

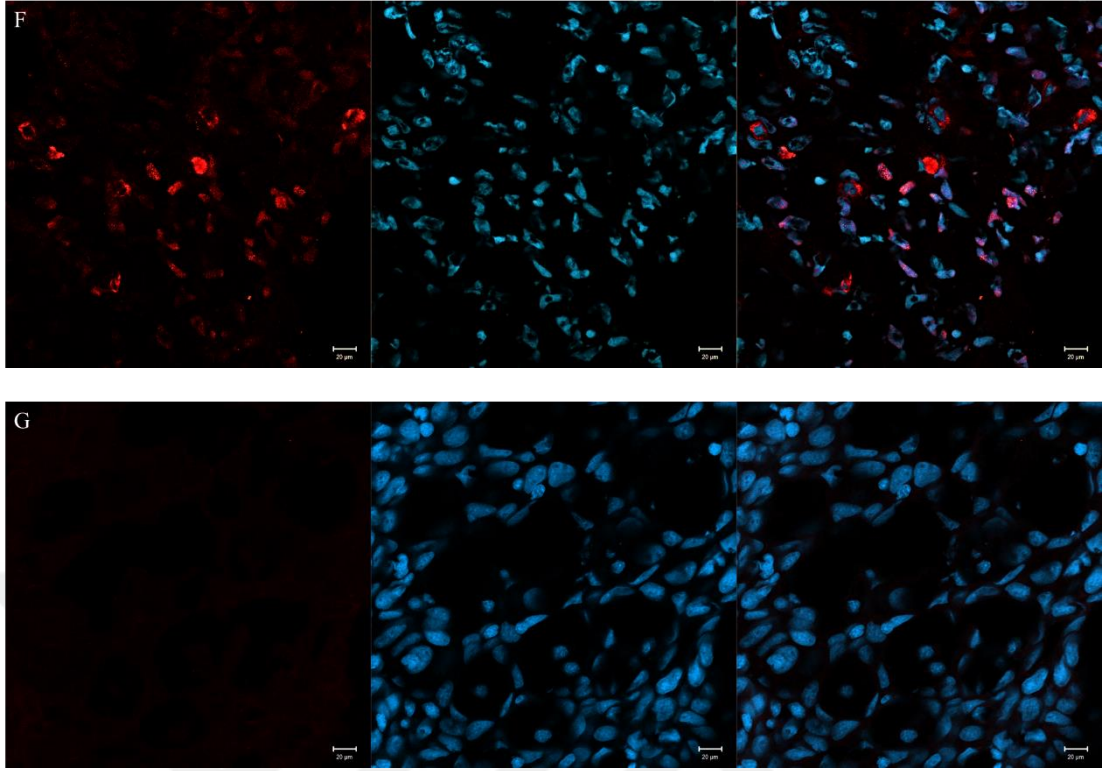
16. günde neotonik hayvan kontrol grubunda fosfo-YAP pozitif hücre yüzdesi %39,63 iken; YAP inhibe edilen neotonik hayvanda (YAP morfolino (mo) verilen grup) fosfo-YAP pozitif hücre yüzdesi %16,66 ve LATS inhibe edilen neotonik hayvanda (LATS morfolino (mo) verilen grup) fosfo-YAP pozitif hücre yüzdesi %22,5 çıkmıştır. Bu durumda neotonik hayvanda YAP ve LATS inhibisyonu sonrası fosfo-YAP azalmıştır. YAP ve LATS inhibisyonundan sonra YAP proteinin aktifliğini gösteren fosfo-YAP yüzdesi azalmıştır. Bu sonuç inhibisyonun kalıcı olduğunu göstermiştir. Fakat boyamalarda fosfo-YAP çok büyük orada hücre çekirdeğinde görülmüştür. Literatürün aksine fosfo-YAP neotonik aksolotlda çekirdekte de lokalize olmuştur.

16. günde metamorfik hayvan kontrol grubunda fosfo-YAP pozitif hücre yüzdesi %17,32 iken; YAP inhibe edilen metamorfik hayvanda (YAP morfolino (mo) verilen grup) fosfo-YAP pozitif hücre yüzdesi %12,82 ve LATS inhibe edilen metamorfik hayvanda (LATS morfolino (mo) verilen grup) fosfo-YAP pozitif hücre yüzdesi %9,42 çıkmıştır. Bu durumda metamorfik hayvanda YAP ve LATS inhibisyonu sonrası fosfo-YAP azalmıştır. YAP ve LATS inhibisyonundan sonra YAP proteinin aktifliğini gösteren fosfo-YAP yüzdesi azalmıştır. Bu sonuç inhibisyonun kalıcı olduğunu göstermiştir. Fakat boyamalarda fosfo-YAP çok büyük oranda hücre çekirdeğinde görülmüştür. Literatürün aksine fosfo-YAP metamorfik aksolotlda çekirdekte de lokalize olmuştur.

Neotonik ve Metamorfik hayvanlarda kontrol grubundaki, YAP morfolino verilen gruplardaki ve LATS morfolino verilen gruplardaki fosfo-YAP boyama görüntüleri **Resim 6.7.2.3 A, B, C, D, E ve F**'dedir. Fosfo-YAP boyaması literatürün aksine çoğu hücrede hücre çekirdeğinde görülmüştür. fosfo-YAP'ın çekirdekteki lokalizasyonunu gösteren çok az rapor bulunmaktadır. fosfo-YAP protein yüzdeleri **Tablo 6.7.2.3**'dedir. fosfo-YAP protein açısından bütün deney gruplarının istatistiksel karşılaştırmaları **Tablo 6.7.2.4**'dedir.







Resim 6.7.2.3. Neotonik ve metamorfik hayvanlarda 16. Günde yapılan fosfo-YAP boyamaları. Kırmızı fosfo-YAP ve Mavi DAPI. A. YAP mRNA inhibe edilen neotonik hayvandaki boyama. B. LATS mRNA inhibe edilen neotonik hayvandaki boyama. C. İnhibisyon yapılmayan neotonik hayvandaki boyama. D. YAP mRNA inhibe edilen metamorfik hayvandaki boyama. E. LATS mRNA inhibe edilen metamorfik hayvandaki boyama. F. İnhibisyon yapılmayan metamorfik hayvandaki boyama. G. Sadece sekonder antikor muamelesi yapılan boyama. Diğer boyamalar sekonder antikor referans alınarak yapıldı. Gruplarda fosfo-YAP antikoru, hem sitoplazmada hem de çekirdekte lokalize görülmüştür. Bu durum literatürdeki bilgilerle çelişmektedir. Referans çubuğu 20 μm 'yi göstermektedir.

Tablo 6.7.2.3. 16. Günde fosfo-YAP proteininin neotonik ve metamorfik deney gruplarındaki (Kontrol, YAP Morfolino (MO) ve LATS MO) pozitiflik yüzdeleri.

	Kontrol (16. Gün)	YAP MO (16. Gün)	LATS MO (16. Gün)
fosfo-YAP (Neotonik)	%39,63 (n=328)	%16,66 (n=408)	%22,5 (n=400)
fosfo-YAP (Metamorfik)	%17,32 (n=404)	%12,82 (n=351)	%9,42 (n=435)

Tablo 6.7.2.4. 10. Günde YAP ve LATS mRNA inhibisyonları yapılan neotonik ve metamorfik deney gruplarındaki 16. Gün fosfo-YAP protein boyamalarının arasında istatistiksel olarak anlamlı fark çıkan gruplar ve anlamlılık derecesi.

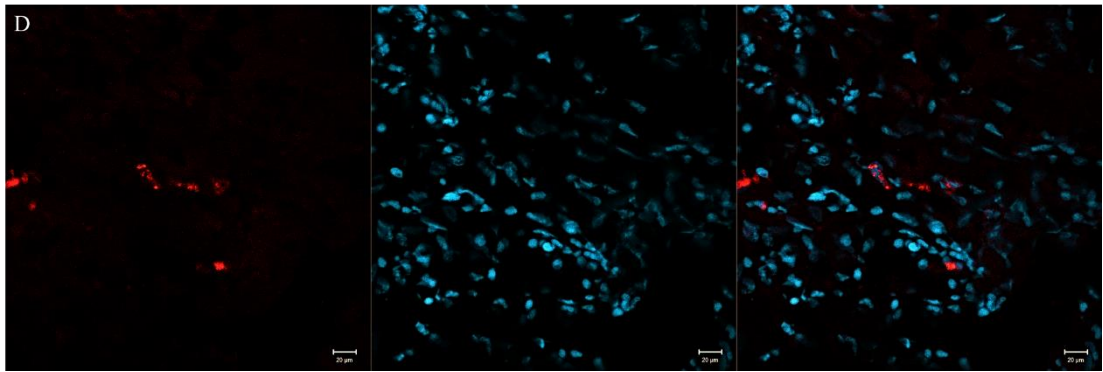
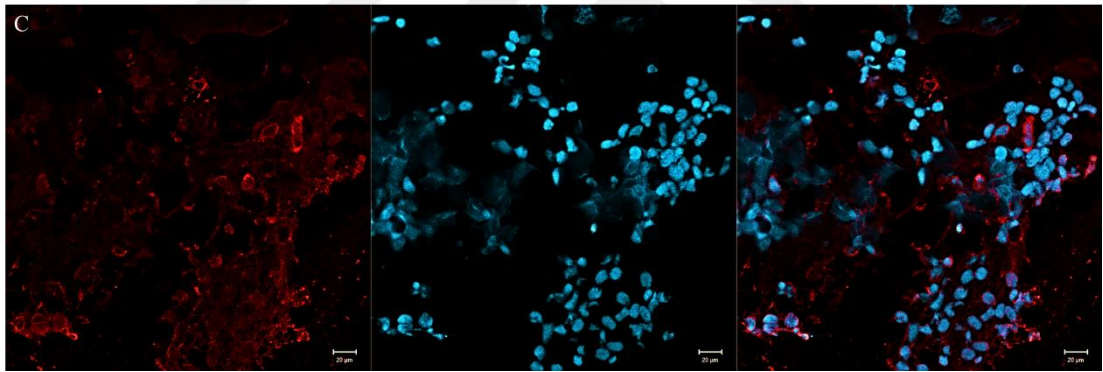
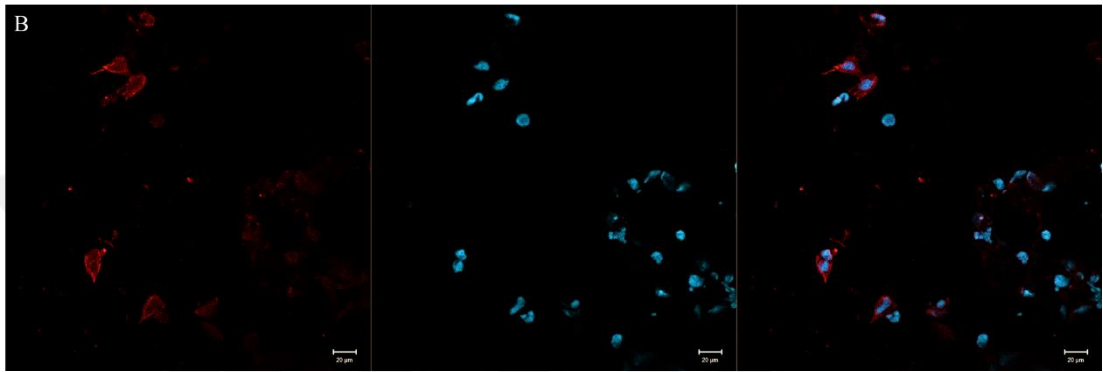
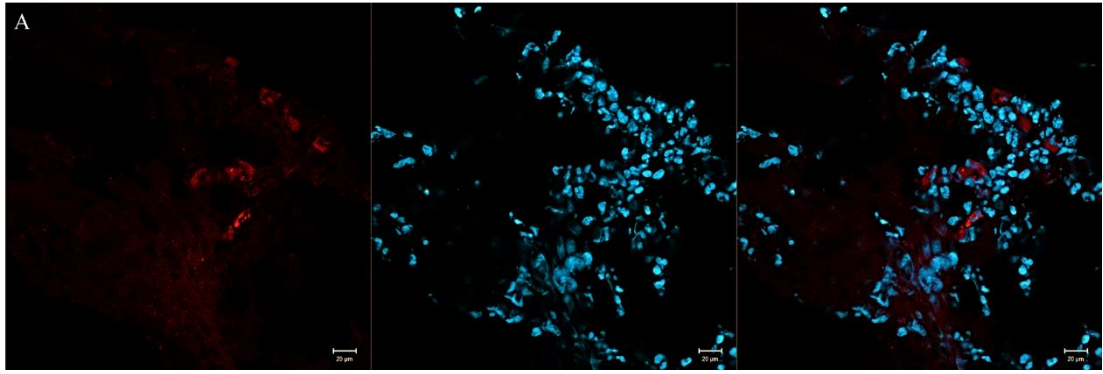
Gruplar	neotonik yap mo	neotonik lats mo	neotonik kontrol	metamorfik yap mo	metamorfik lats mo	metamorfik kontrol
neotonik yap mo		Anlamlı (*)	Anlamlı (***)		Anlamlı (**)	

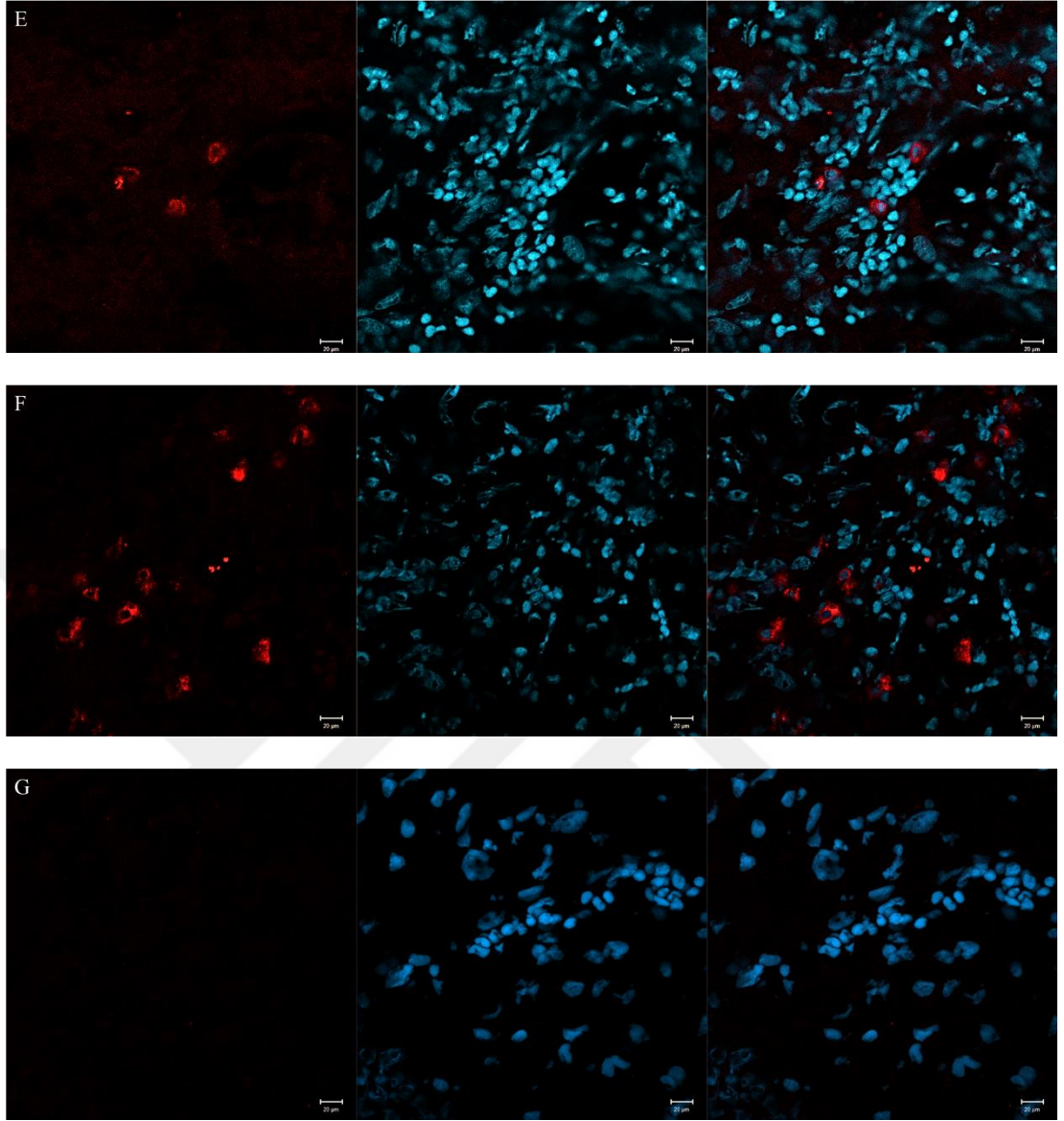
neotonik lats mo	Anlamlı (*)		Anlamlı (***)	Anlamlı (***)	Anlamlı (***)	
neotonik kontrol	Anlamlı (***)	Anlamlı (***)		Anlamlı (***)	Anlamlı (***)	Anlamlı (***)
metamorfik yap mo		Anlamlı (***)	Anlamlı (***)			
metamorfik lats mo	Anlamlı (**)	Anlamlı (***)	Anlamlı (***)			Anlamlı (***)
metamorfik kontrol			Anlamlı (***)		Anlamlı (***)	

16. günde neotonik hayvan kontrol grubunda fosfo-LATS pozitif hücre yüzdesi %5,3 iken; YAP inhibe edilen neotonik hayvanda (YAP morfolino (mo) verilen grup) fosfo-LATS pozitif hücre yüzdesi %2,12 ve LATS inhibe edilen neotonik hayvanda (LATS morfolino (mo) verilen grup) fosfo-LATS pozitif hücre yüzdesi %1,98 çıkmıştır. Bu durumda neotonik hayvanda YAP ve LATS inhibisyonu sonrası fosfo-LATS azalmıştır. YAP ve LATS inhibisyonundan sonra YAP proteinin aktifliğini gösteren fosfo-LATS yüzdesi azalmıştır. Bu sonuç inhibisyonun protein düzeyinde kalıcı olduğunu göstermiştir. Boyamalarda fosfo-LATS hücre sitoplazmasında görülmüştür.

16. günde metamorfik hayvan kontrol grubunda fosfo-LATS pozitif hücre yüzdesi %7,06 iken; YAP inhibe edilen metamorfik hayvanda (YAP morfolino (mo) verilen grup) fosfo-LATS pozitif hücre yüzdesi %1,2 ve LATS inhibe edilen metamorfik hayvanda (LATS morfolino (mo) verilen grup) fosfo-LATS pozitif hücre yüzdesi %1,54 çıkmıştır. Bu durumda metamorfik hayvanda YAP ve LATS inhibisyonu sonrası fosfo-LATS azalmıştır. YAP ve LATS inhibisyonundan sonra YAP proteinin aktifliğini gösteren fosfo-LATS yüzdesi azalmıştır. Bu sonuç inhibisyonun kalıcı olduğunu göstermiştir. Boyamalarda fosfo-LATS hücre sitoplazmasında görülmüştür.

Neotonik ve Metamorfik hayvanlarda kontrol grubundaki, YAP morfolino verilen gruplardaki ve LATS morfolino verilen gruplardaki fosfo-LATS boyama görüntüleri **Resim 6.7.2.4 A, B, C, D, E ve F**'dedir. Fosfo-LATS boyaması literatürdeki gibi, hücre sitoplazmasında görülmüştür. fosfo-LATS protein yüzdeleri **Tablo 6.7.2.5**'dedir. fosfo-LATS protein açısından bütün deney gruplarının istatistiksel karşılaştırılmaları **Tablo 6.7.2.6**'dedir.





Resim 6.7.2.4. Neotonik ve metamorfik hayvanlarda 16. Günde yapılan fosfo-LATS boyamaları. Kırmızı fosfo-LATS ve Mavi DAPI. A. YAP mRNA inhibe edilen neotonik hayvandaki boyama. B. LATS mRNA inhibe edilen neotonik hayvandaki boyama. C. İnhibisyon yapılmayan neotonik hayvandaki boyama. D. YAP mRNA inhibe edilen metamorfik hayvandaki boyama. E. LATS mRNA inhibe edilen metamorfik hayvandaki boyama. F. İnhibisyon yapılmayan metamorfik hayvandaki boyama. G. Sadece sekonder antikor muamelesi yapılan boyama. Diğer boyamalar sekonder antikor referans alınarak yapıldı. Gruplarda fosfo-LATS antikoruna, sitoplazmada lokalize görülmüştür. Referans çubuğu 20 µm'yi göstermektedir.

Tablo 6.7.2.5. 16. Günde fosfo-LATS proteininin neotonik ve metamorfik deney gruplarındaki (Kontrol, YAP Morfolino (MO) ve LATS MO) pozitiflik yüzdeleri.

	Kontrol (16. Gün)	YAP MO (16. Gün)	LATS MO (16. Gün)
Fosfo-LATS (Neotonik)	%5,3 (n=396)	%2,12 (n=423)	%1,98 (n=352)

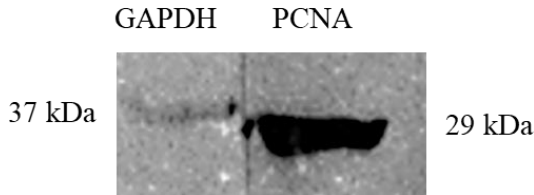
fosfo-LATS (Metamorfik)	% 17,06 (n=453)	% 1,2 (n=333)	% 1,54 (n=324)
----------------------------	-----------------	---------------	----------------

Tablo 6.7.2.6. 10. Günde YAP ve LATS mRNA inhibisyonları yapılan neotonik ve metamorfik deney gruplarındaki 16. Gün fosfo-LATS protein boyamalarının arasında istatistiksel olarak anlamlı fark çıkan gruplar ve anlamlılık derecesi.

Gruplar	neotonik yap mo	neotonik lats mo	neotonik kontrol	metamorfik yap mo	metamorfik lats mo	metamorfik kontrol
neotonik yap mo			Anlamlı (*)			Anlamlı (***)
neotonik lats mo			Anlamlı (*)			Anlamlı (***)
neotonik kontrol	Anlamlı (*)	Anlamlı (*)		Anlamlı (**)	Anlamlı (**)	
metamorfik yap mo			Anlamlı (**)			Anlamlı (***)
metamorfik lats mo			Anlamlı (**)			Anlamlı (***)
metamorfik kontrol	Anlamlı (***)	Anlamlı (***)		Anlamlı (***)	Anlamlı (***)	

6.7.3 Aksolotl Blastema Dokusunda Western Blot Denemeleri

İzole edilen dokularda PCNA, YAP, fosfo-YAP ve fosfo-LATS proteinlerinin tayini ve miktar analizleri için western blot denemeleri yapıldı. Denenen birçok protokolde YAP, fosfo-YAP ve fosfo-LATS antikorlarının çalışmadığı tespit edildi. GAPDH ve PCNA antikorları kullanılarak yapılan western blot deneylerinde doğru ağırlıkta bantlar tespit edildi (**Resim 6.7.3**). Fakat bu proteinler için miktar tayini yapılması uygun görülmedi.



Resim 6.7.3. GAPDH ve PCNA antikorları kullanılarak yapılan western blot deney bantları. Neotonik kontrol blastema dokusundan izole edilen proteinlerde protein tayinleri amacıyla denemeler yapıldı. Denemelerin sonucunda sadece GAPDH (~ 37 kDa) ve PCNA (~ 29 kDa) antikorlarında bantlar görüldü.

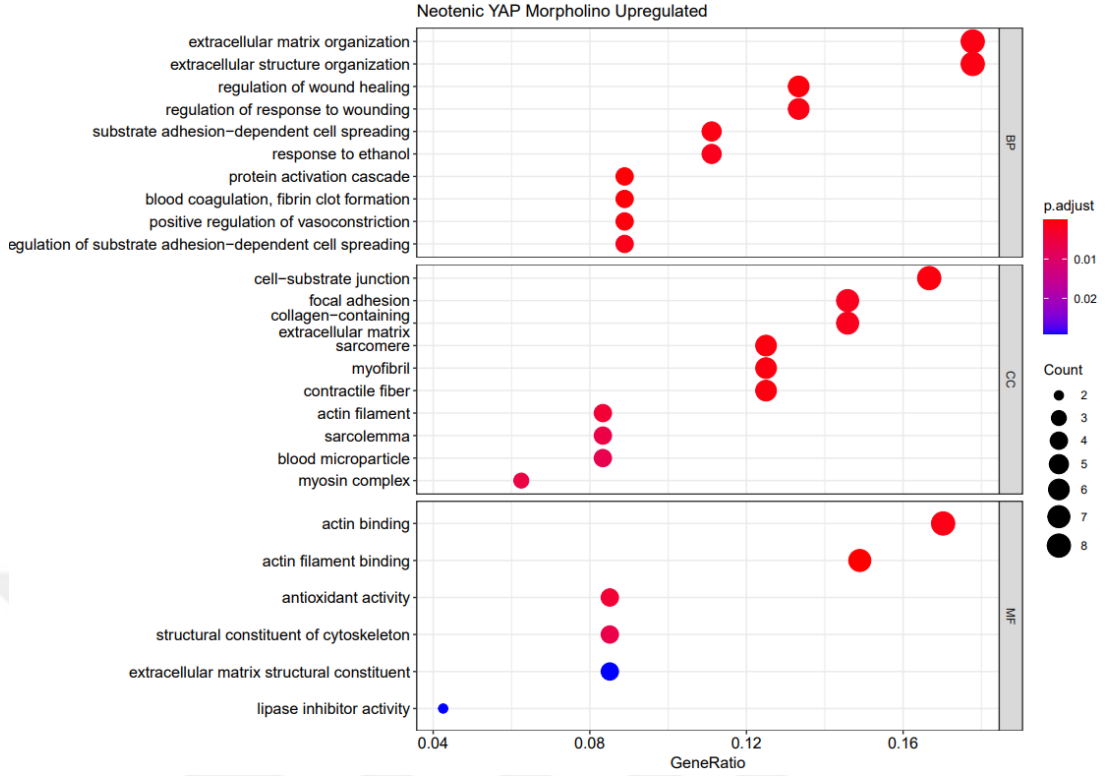
6.7.4 YAP ve LATS mRNA İnhibisyonlu Gruplarda Proteomiks Sonuçları

Tezin bu kısmına kadar elde edilen verilere ek, proteomiks gibi inhibisyondan sonra bütün protein profillerini gösteren teknik tercih edildi.

Metamorfik ve neotonik aksolotllarda inhibisyonlar sonrası (YAP ve LATS mRNA inhibisyonları) kontrol gruplarına göre anlamlı artan ve azalan proteinler tespit edildi. Bu proteinlerin hangi hücresel süreçlere etki ettikleri analiz edildi. Her karşılaştırmada biyolojik süreçler (BP), moleküler fonksiyonlar (MF) ve hücresel bileşenler (CC) ayrı ayrı tespit edildi ve yapılan görselleştirmeler BP, MF ve CC açısından farklı olanlarla ile yapıldı.

Neotonik YAP morfolino verilen grupta kontrol grubuna göre anlamlı artan biyolojik süreçler (BP), moleküler fonksiyonlar (MF) ve hücresel bileşenler (CC) **Şekil 6.7.4.1**'de ve şunlardır:

- BP
 1. Hücre dışı matriks organizasyonu
 2. Hücre dışı yapı organizasyonu
 3. Yara iyileşmesinin düzenlenmesi
 4. İyileşme cevabının düzenlenmesi
 5. Substrat adezyonu
 6. Etanole cevap
 7. Protein aktivasyon kaskadı
 8. Kan pıhtılaşması
 9. Damar daralmasının pozitif regülasyonu
 10. Substrat adezyonu düzenlenmesi
- CC
 1. Hücre-substrat birleşmesi
 2. Odaksal yapışma
 3. Kollajen içeren Hücre dışı matriks
 4. Sarkomer
 5. Miyofibril
 6. Aktin filament
 7. Kas zarı
 8. Kan partikülleri
 9. Miyozin
- MF
 1. Aktin bağlanması
 2. Aktin filament bağlanması
 3. Antioksidan aktivitesi
 4. Hücre iskeleti yapısı
 5. Hücre dışı matriks yapısı
 6. Lipaz inhibitör aktivitesi



Şekil 6.7.4.1. Neotenic YAP morfolino verilen grupta kontrol grubuna göre anlamlı artan biyolojik süreçler (BP), moleküler fonksiyonlar (MF) ve hüresel bileşenler (CC).

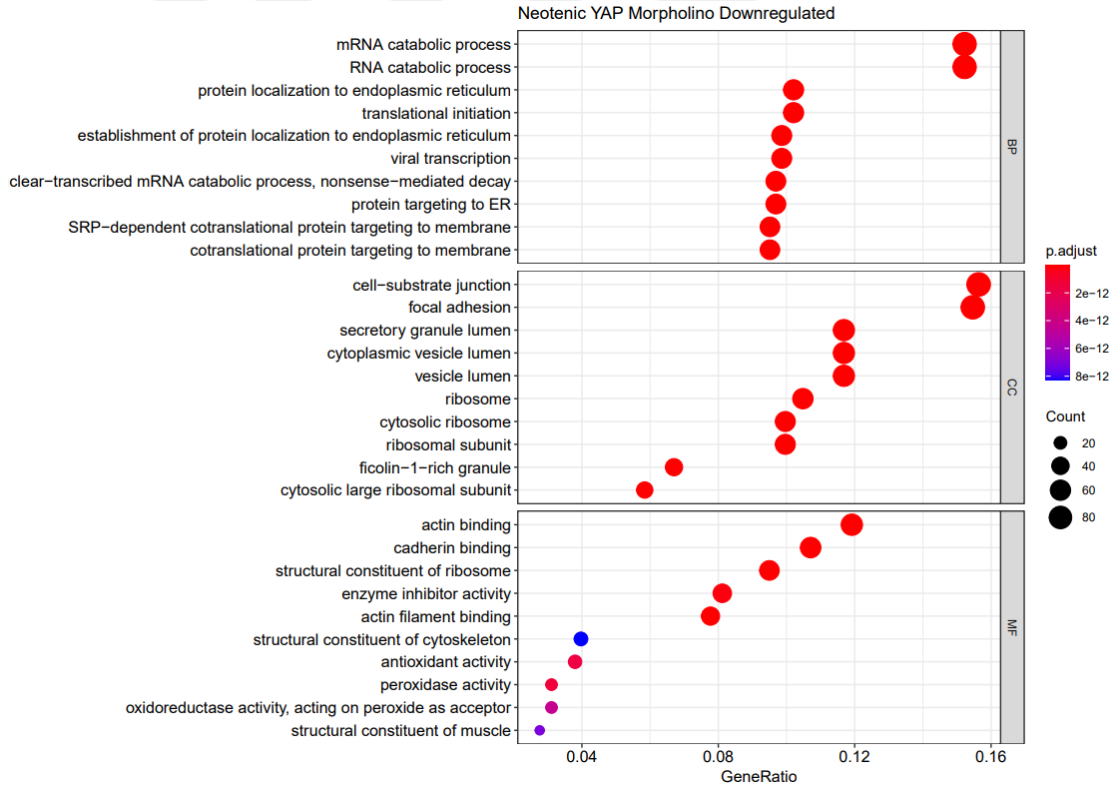
Neotenic YAP morfolino verilen grupta kontrol grubuna göre anlamlı azalan biyolojik süreçler (BP), moleküler fonksiyonlar (MF) ve hüresel bileşenler (CC) Şekil 6.7.4.2' dedir ve şunlardır:

- BP
 1. mRNA katabolik süreçler
 2. RNA katabolik süreçler
 3. Endoplazmik retikulumda protein lokalizasyonu
 4. Translasyonun başlaması
 5. Endoplazmik retikulumda protein lokalizasyonunun kurulması
 6. Viral transkripsiyon
 7. Nuklear mRNA katabolik süreçler
 8. Endoplazmik retikulumda protein hedeflenmesi
 9. SRP-bağımlı kotranslasyonel membrana protein hedeflenmesi
 10. Kotranslasyonel membrana protein hedeflenmesi
- CC
 1. Hücre-substrat birleşmesi
 2. Odaksal yapışma
 3. Salgılayıcı granül lümeni
 4. Sitoplazmik granül lümeni
 5. Vezikül lümeni

6. Ribozom
7. Sitolik ribozom
8. Ribozomal alt üniteler
9. Fikolin-1 zengin granüller
10. Sitolik büyük ribozom alt üniteleri

- MF

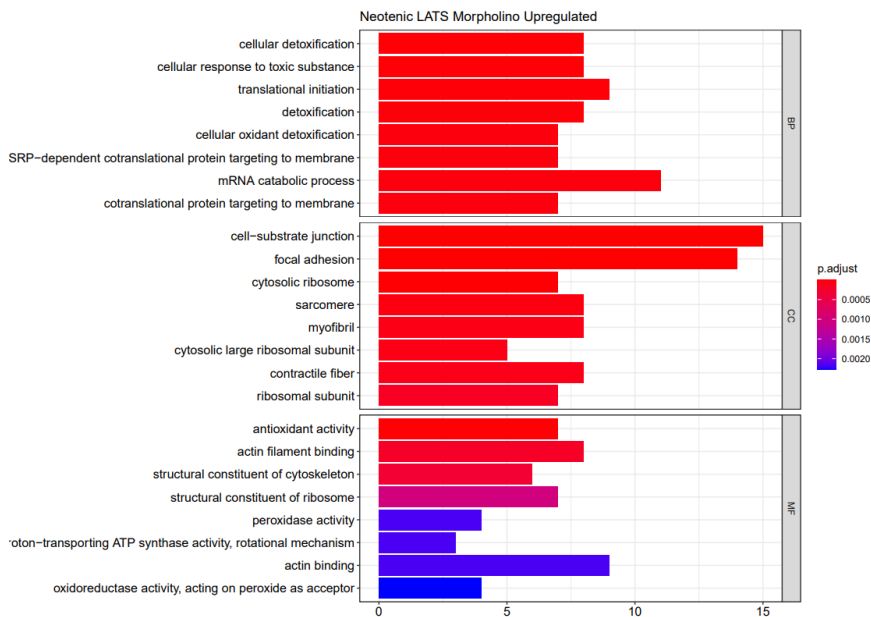
1. Aktin bağlanması
2. Kaderin bağlanması
3. Ribozom yapısı
4. İnhibitör enzim aktivitesi
5. Aktin filament bağlanması
6. Hücre iskeleti yapısı
7. Antioksidan aktivite
8. Peroksidaz aktivitesi
9. Oksidoredüktaz aktivite
10. Kas yapısı



Şekil 6.7.4.2. Neotenic YAP morfolino verilen grupta kontrol grubuna göre anlamlı azalan biyolojik süreçler (BP), moleküler fonksiyonlar (MF) ve hücresel bileşenler (CC).

Neotenic LATS morfolino verilen grupta kontrol grubuna göre anlamlı artan biyolojik süreçler (BP), moleküler fonksiyonlar (MF) ve hücresel bileşenler (CC) Şekil 6.7.4.3'dedir ve şunlardır:

- BP
 1. Hücresel detoksifikasyon
 2. Toksik içeriklere karşı hücresel cevap
 3. Translasyon başlaması
 4. Detoksifikasyon
 5. Hücresel oksidan detoksifikasyonu
 6. SRP-bağımlı kotranslasyonel membrana protein hedeflenmesi
 7. mRNA katabolik süreç
 8. Kotranslasyonel membrana protein hedeflenmesi
- CC
 1. Hücre-substrat birleşmesi
 2. Odaksal yapışma
 3. Sitosolik ribozom
 4. Sarkomer
 5. Miyofibril
 6. Sitosolik büyük ribozom alt üniteleri
 7. Kasılan fiber
 8. Ribozomla alt üniteler
- MF
 1. Antioksidan aktivite
 2. Aktin filament bağlanması
 3. Hücre iskeleti yapısı
 4. Ribozom yapısı
 5. Peroksidaz aktivitesi
 6. Proton taşıyıcı ATP sentaz aktivitesi
 7. Aktin bağlanması
 8. Oksidoredüktaz aktivitesi

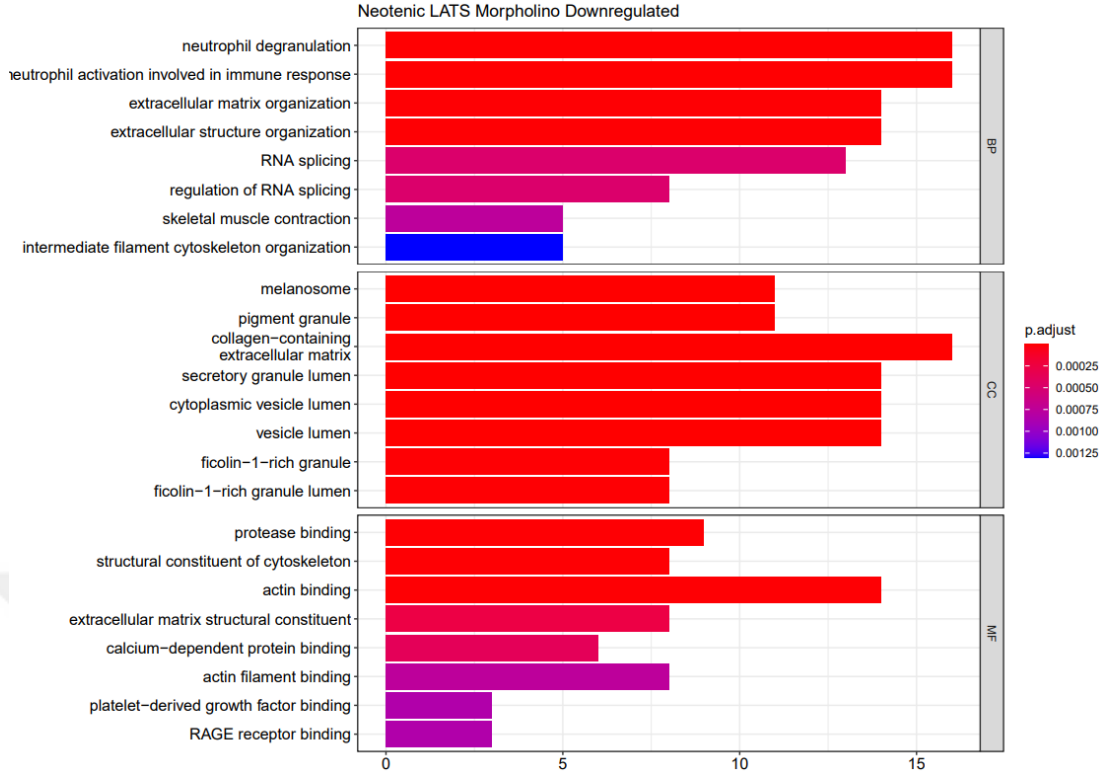


Şekil 6.7.4.3. Neotonik LATS morfolino verilen grupta kontrol grubuna göre anlamlı artan biyolojik süreçler (BP), moleküler fonksiyonlar (MF) ve hücresel bileşenler (CC).

Neotonik LATS morfolino verilen grupta kontrol grubuna göre anlamlı azalan biyolojik süreçler (BP), moleküler fonksiyonlar (MF) ve hücresel bileşenler (CC)

Şekil 6.7.4.4'dedir ve şunlardır:

- BP
 1. Nötrofil degranülasyonu
 2. Nötrofil aktivasyonu
 3. Hücre dışı matriks organizasyonu
 4. Hücre dışı yapı organizasyonu
 5. RNA uçbirleştirme
 6. RNA uçbirleştirmenin düzenlenmesi
 7. İskelet kası kasılması
 8. Ara filaman hücre iskeleti organizasyonu
- CC
 1. Melanozom
 2. Granül pigmenti
 3. Kollajen içeren hücre dışı matrix
 4. Salgılayıcı granül lümeni
 5. Sitoplazmik granül lümeni
 6. Vezikül lümeni
 7. Fikolin-1 zengin granüller
 8. Fikolin-1 zengin granül lümeni
- MF
 1. Proteaz bağlanması
 2. Hücre iskeleti yapısı
 3. Aktin bağlanması
 4. Hücre dışı matriks yapısı
 5. Kalsiyum bağımlı protein bağlanması
 6. Aktin filament bağlanması
 7. Platelet kökenli büyüme faktörü bağlanması
 8. RAGE reseptör bağlanması

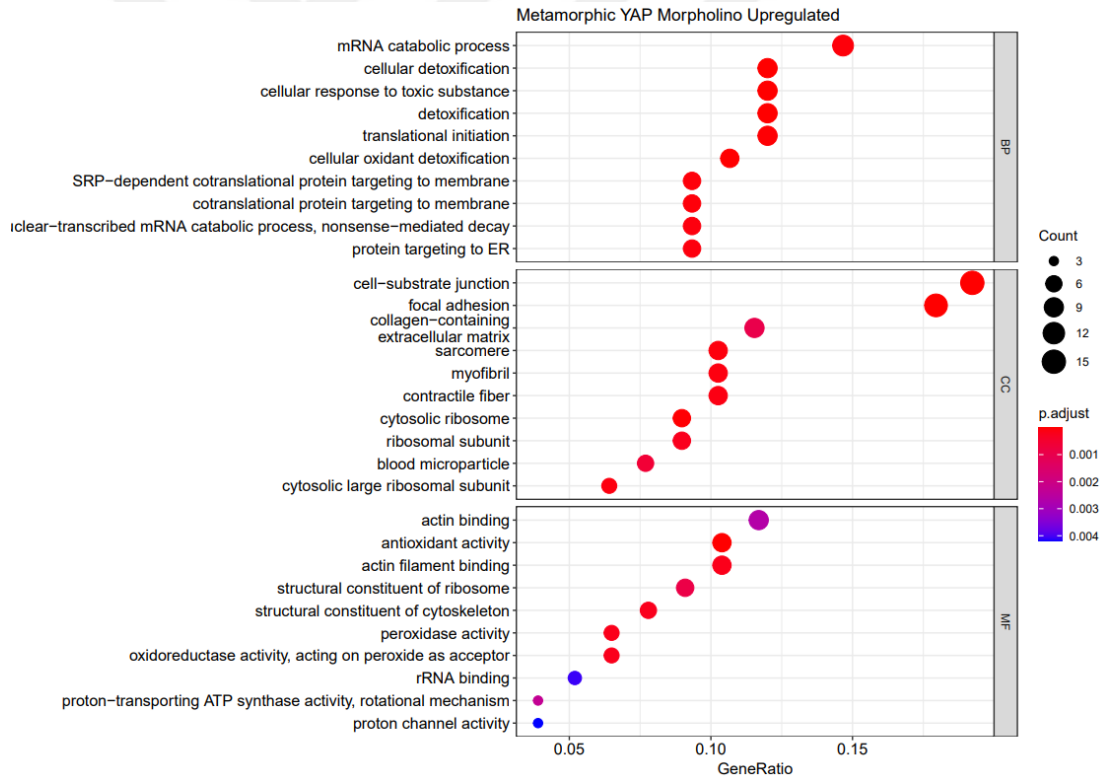


Şekil 6.7.4.4. Neotonik LATS morfolino verilen grupta kontrol grubuna göre anlamlı azalan biyolojik süreçler (BP), moleküler fonksiyonlar (MF) ve hücresel bileşenler (CC).

Metamorfik YAP morfolino verilen grupta kontrol grubuna göre anlamlı artan biyolojik süreçler (BP), moleküler fonksiyonlar (MF) ve hücresel bileşenler (CC) Şekil 6.7.4.5'dedir ve şunlardır:

- BP
 1. mRNA katabolik süreçleri
 2. Hücresel detoksifikasyon
 3. Toksik içeriklere karşı hücresel cevap
 4. Detoksifikasyon
 5. Translasyonel başlama
 6. Hücresel oksidant detoksifikasyonu
 7. SRP-bağımlı kotranslasyonel membrana protein hedeflenmesi
 8. Kotranslasyonel membrana protein hedeflenmesi
 9. Nüklear mRNA katabolik süreçleri
 10. Endoplazmik retikuluma protein hedeflemesi
- CC
 1. Hücre-substrat kavşağı
 2. Fokal yapışma
 3. Kollajen içeren hücre dışı matriks
 4. Sarkomer
 5. Miyofibril

6. Kasılan fibril
 7. Sitozolik ribozom
 8. Ribozomal alt ünite
 9. Kan mikropartikülleri
 10. Sitozolik geniş ribozomal alt ünite
- MF
 1. Aktin bağlanması
 2. Antioksidan aktivitesi
 3. Aktin filament bağlanması
 4. Ribozom yapısı
 5. Hücre iskeleti yapısı
 6. Peroksidaz aktivitesi
 7. Oksidoredüktaz aktivitesi
 8. rRNA bağlanması
 9. Proton-taşıyıcı ATP sentaz aktivitesi
 10. Proton kanalı aktivitesi

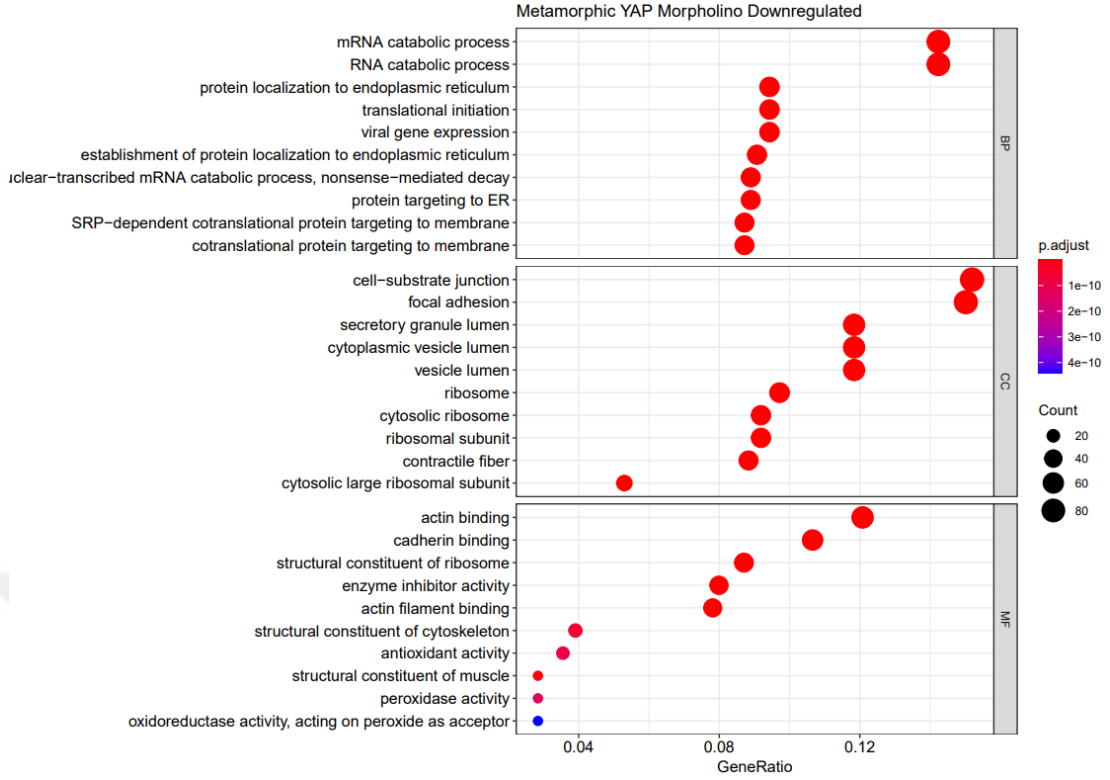


Şekil 6.7.4.5. Metamorfik YAP morfolino verilen grupta kontrol grubuna göre anlamlı artan biyolojik süreçler (BP), moleküler fonksiyonlar (MF) ve hücresel bileşenler (CC).

Metamorfik YAP morfolino verilen grupta kontrol grubuna göre anlamlı azalan biyolojik süreçler (BP), moleküler fonksiyonlar (MF) ve hücresel bileşenler (CC)

Şekil 6.7.4.6'dedir ve şunlardır:

- BP
 1. mRNA katabolik süreç
 2. RNA katabolik süreç
 3. Endoplazmik retikuluma protein lokalizasyonu
 4. Translasyonel başlangıcı
 5. Viral gen ifadesi
 6. Endoplazmik retikuluma protein lokalizasyonunun kurulması
 7. Nükleer mRNA katabolik süreçleri
 8. Endoplazmik retikuluma protein hedeflemesi
 9. SRP-bağımlı kotranslasyonel membrana protein hedeflenmesi
 10. Kotranslasyonel membrana protein hedeflenmesi
- CC
 1. Hücre-substrat kavşağı
 2. Fokal yapışma
 3. Salgılayıcı granül lümeni
 4. Sitoplazmik vezikül lümeni
 5. Vezikül lümeni
 6. Ribozom
 7. Sitoplazmik ribozom
 8. Ribozomal alt ünitesi
 9. Kasılan fiber
 10. Geniş sitozolik ribozomal alt ünite
- MF
 1. Aktin bağlanması
 2. Kaderin bağlanması
 3. Ribozom yapısı
 4. Enzim inhibitör aktivitesi
 5. Aktin filament bağlanması
 6. Hücre iskeleti yapısı
 7. Antioksidan aktivitesi
 8. Kas yapısı
 9. Peroksidaz aktivitesi
 10. Oksidoredüktaz aktivitesi



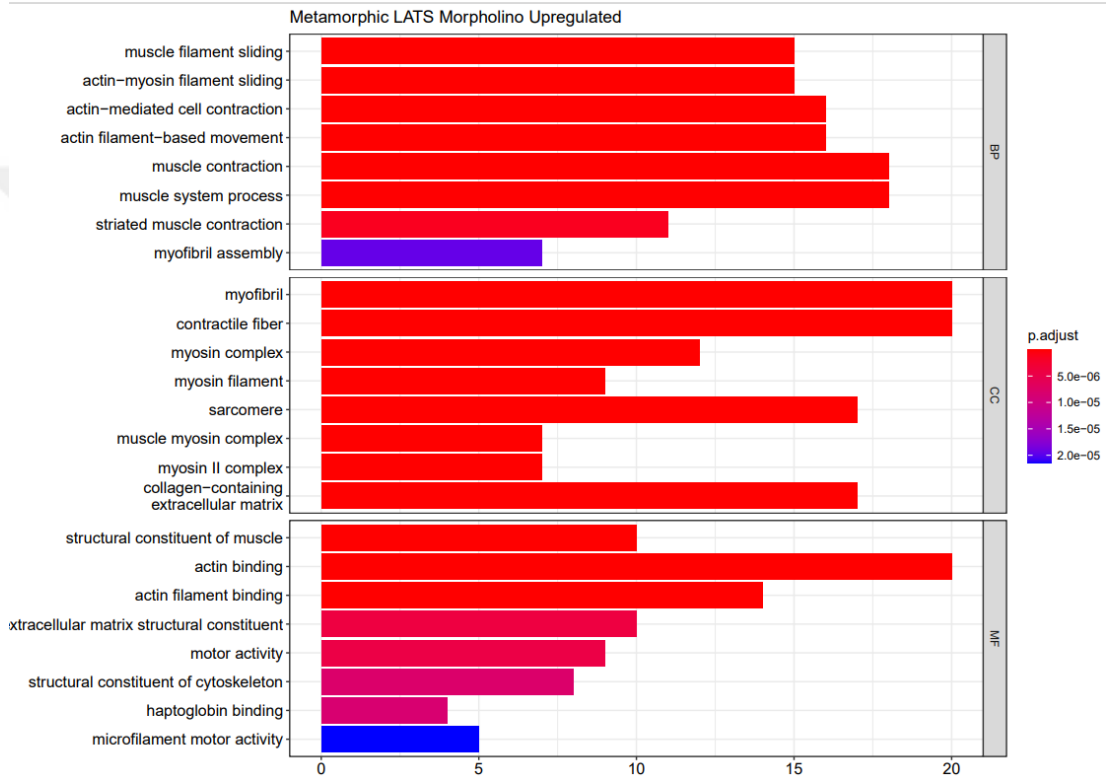
Şekil 6.7.4.6. Metamorfik YAP morfolino verilen grupta kontrol grubuna göre anlamlı azalan biyolojik süreçler (BP), moleküler fonksiyonlar (MF) ve hücresel bileşenler (CC).

Metamorfik LATS morfolino verilen grupta kontrol grubuna göre anlamlı artan biyolojik süreçler (BP), moleküler fonksiyonlar (MF) ve hücresel bileşenler (CC)

Şekil 6.7.4.7’dedir ve şunlardır:

- BP
 1. Kas filaman kayması
 2. Aktin-miyozin kas kayması
 3. Aktin-bağımlı hücre kasılması
 4. Aktin-bağımlı hareket
 5. Kas kasılması
 6. Kas sistem işleme
 7. Çizgili kas kasılması
 8. Miyofibril düzenlenmesi
- CC
 1. Miyofibril
 2. Kasılan fiber
 3. Miyozik kompleksi
 4. Miyozin filamanı
 5. Sarkomer
 6. Kas miyozin kompleksi
 7. Kollajen içeren hücre dışı matriks

- MF
 1. Kas içerik yapısı
 2. Aktin bağlanması
 3. Aktin filaman bağlanması
 4. Hücre dışı yapı içeriği
 5. Motor aktivite
 6. Hücre iskeleti yapısı
 7. Haptogloblin bağlanması
 8. Mikrofilaman motor aktivitesi

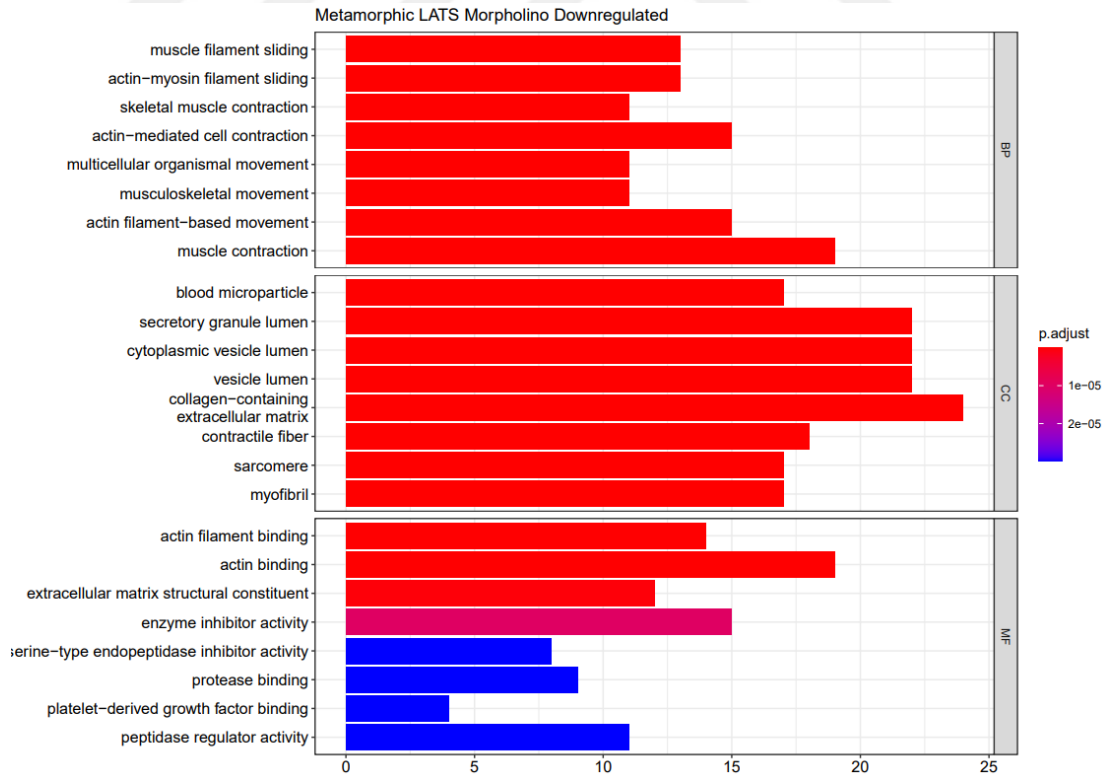


Şekil 6.7.4.7. Metamorfik LATS morfolino verilen grupta kontrol grubuna göre anlamlı artan biyolojik süreçler (BP), moleküler fonksiyonlar (MF) ve hücresel bileşenler (CC).

Metamorfik LATS morfolino verilen grupta kontrol grubuna göre anlamlı azalan biyolojik süreçler (BP), moleküler fonksiyonlar (MF) ve hücresel bileşenler (CC) Şekil 6.7.4.8'dedir ve şunlardır:

- BP
 1. Kas filamanı kayması
 2. Aktin-miyozin filaman kayması
 3. İskelet kası kasılması
 4. Aktin-bağımlı hücre kasılması
 5. Çoklu hücre hareket
 6. Kas iskelet hareketi

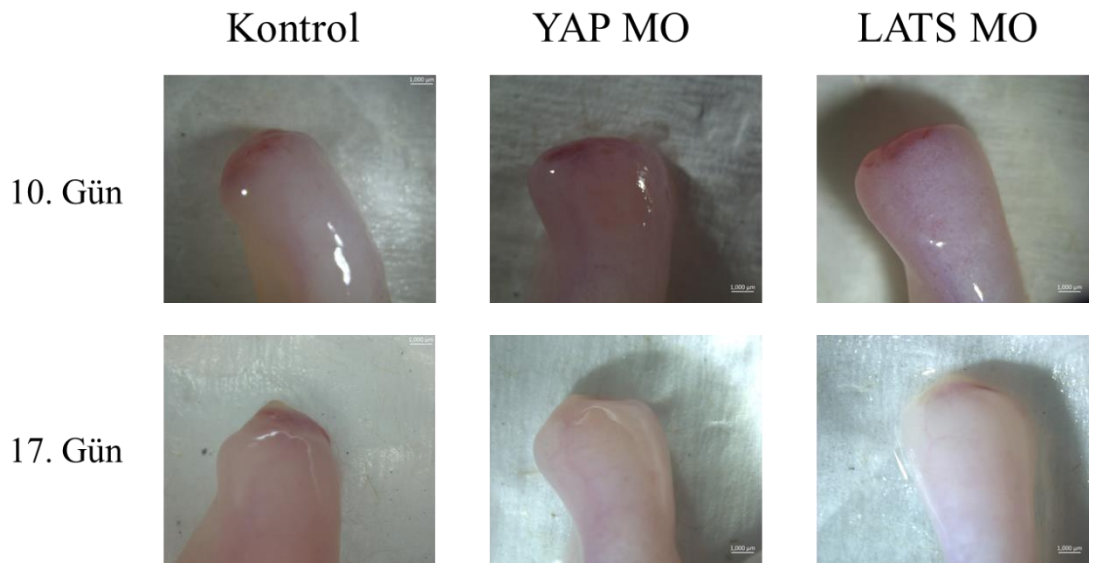
7. Aktin-bağımlı hareket
 8. Kas kasılması
- CC
 1. Kan mikropartikülleri
 2. Salgılayıcı granül lümeni
 3. Sitoplazmik vezikül lümeni
 4. Vezikül lümeni
 5. Kollajen içeren hücre dışı matriks
 6. Kasılan fiber
 7. Sarkomer
 8. Miyofibril
 - MF
 1. Aktin filaman bağlanması
 2. Aktin bağlanması
 3. Hücre dışı matriks yapısı
 4. Enzim inhibitör aktivitesi
 5. Serin-tip endopeptidaz inhibitör aktivitesi
 6. Proteaz aktivitesi
 7. Platelet kökenli büyüme faktörü bağlanması
 8. Peptidaz düzenleyici aktivite

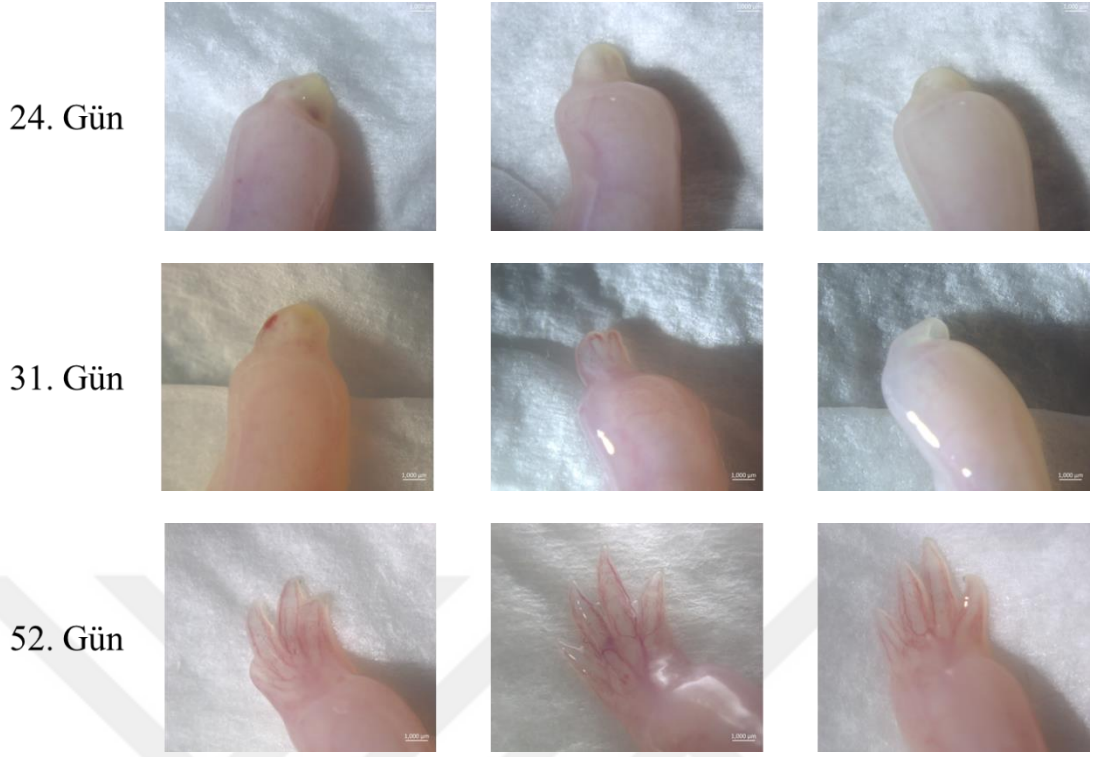


Şekil 6.7.4.8. Metamorfik LATS morfolino verilen grupta kontrol grubuna göre anlamlı azalan biyolojik süreçler (BP), moleküler fonksiyonlar (MF) ve hücresel bileşenler (CC).

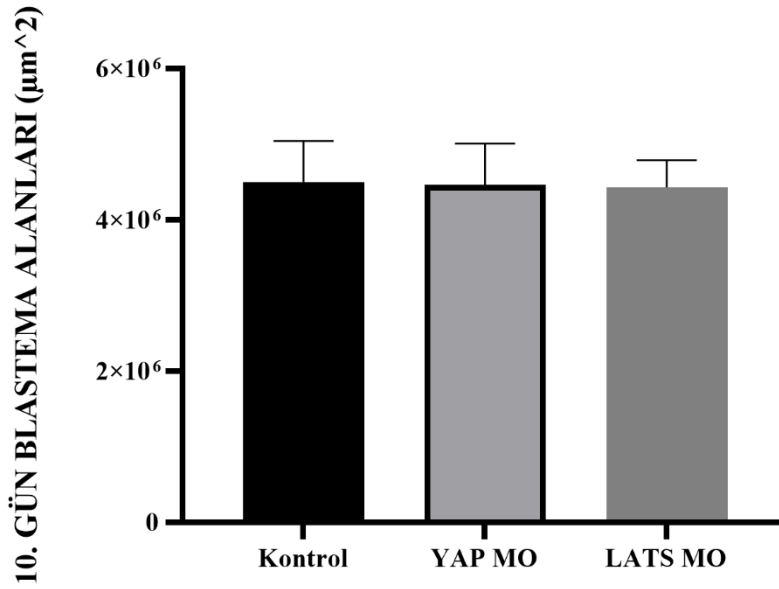
6.8. Uzun Dönem İnhibisyonlu Neotonik Hayvanların Kol Görüntüleri

Metamorfik hayvanlarda metamorfoz sonrası uzun süre beklenmesi sonucunda çok sayıda ölüm gözlemlendi. Bu ölümler göze alındığında metamorfik hayvanlarda inhibisyon sonucunda uzun dönem gözlem yapılamadı. Neotonik hayvanlarda kol kesimi sonrası 10. günde YAP ve LATS mRNA inhibisyonları yapıldı; sonrasında uzun dönem kol yenilenmeleri takip edildi. Bu amaçla, kontrol grubunda, YAP morfolino (MO) grubunda ve LATS morfolino (MO) grubunda 10., 17., 24., 31., ve 52. gün fotoğrafları çekildi (**Resim 6.8.1**). Çekilen bu fotoğraflarda μm^2 cinsinden blastema alan ölçümleri yapıldı. Kol kesiminden sonra 10. Günde yani morfolino enjeksiyonu öncesi blastema alanlarında anlamlı fark görülmedi (**Şekil 6.8.1**). Kol kesiminden 17 gün sonra yani morfolino enjeksiyonu sonrası 7. günde blastema alanları arasında anlamlı fark bulundu. Kontrol grubuna kıyasla yapılan ölçümde kontrol grubunda yeni oluşan blastema alanı inhibisyonlu gruplara göre daha fazla olduğu görüldü (**Şekil 6.8.2**). Kol kesiminden 24 gün sonra yani morfolino enjeksiyonu sonrası 14. günde yenilenen doku alanları arasında anlamlı fark bulundu. Kontrol grubuna göre YAP MO grubu anlamlı farklı iken; YAP MO ve LATS MO grupları birbirlerine göre anlamlı farklı idi (**Şekil 6.8.3**). Kol kesiminden 31 gün sonra yani morfolino enjeksiyonu sonrası 21. günde yenilenen doku alanları arasında anlamlı fark bulundu. Kontrol grubuna göre LATS MO grubu anlamlı farklı idi (**Şekil 6.8.4**). Kol kesiminden 52 gün sonra yani morfolino enjeksiyonu sonrası 4. günde yenilenen doku alanları arasında anlamlı fark bulundu. Bütün gruplardaki ölçümler birbirlerine göre anlamlı farklı idi (**Şekil 6.8.5**). Aynı zamanda 120. Günde bilgisayarlı tomografi kullanılarak inhibisyonlu hayvanların yenilenen kemiklerinde hasar olup olmadığına bakıldı (**Resim 6.8.2**). 120. günde kontrol grubu ile inhibisyonlu gruplar arasında fark gözlemlenmedi.



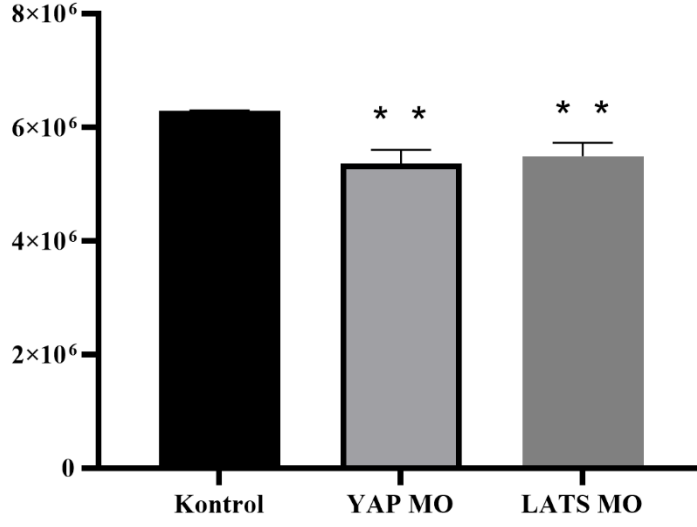


Resim 6.8.1. Neotonik hayvanlarda kol kesiminden sonra uzun dönem aydınlık alan görüntüleri. Kol kesiminden 10 gün sonra morfolinolar (YAP ve LATS) enjekte edildi. Kol kesiminden sonra 10., 17., 24., 31., ve 52. gün fotoğrafları çekildi. 52. günde kolların yenilediği görüldü. Yenilenmede zamansal olarak fark gözlenmedi. Referans çubuğu 1000 µm'yi göstermektedir.



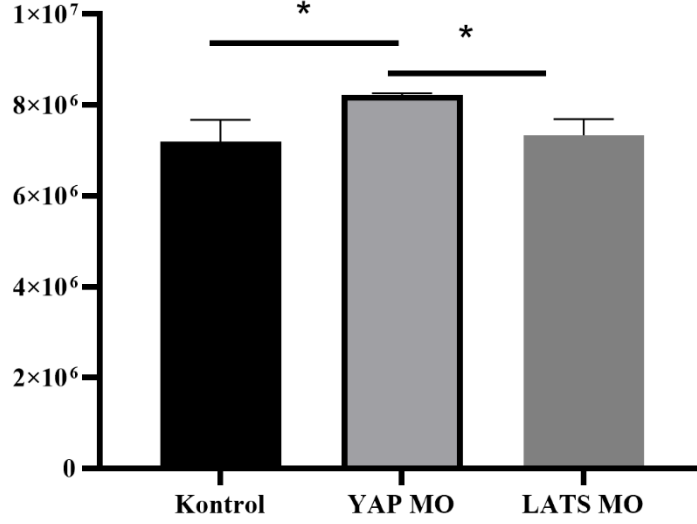
Şekil 6.8.1. Kol kesiminden sonra 10. Günde (morfolino enjeksiyonu yapılan gün) blastema alanlarının karşılaştırılması. İnhibisyonlu gruplarda kontrol grubuna göre anlamlı fark görülmedi.

17. GÜN BLASTEMA ALANLARI (μm^2)



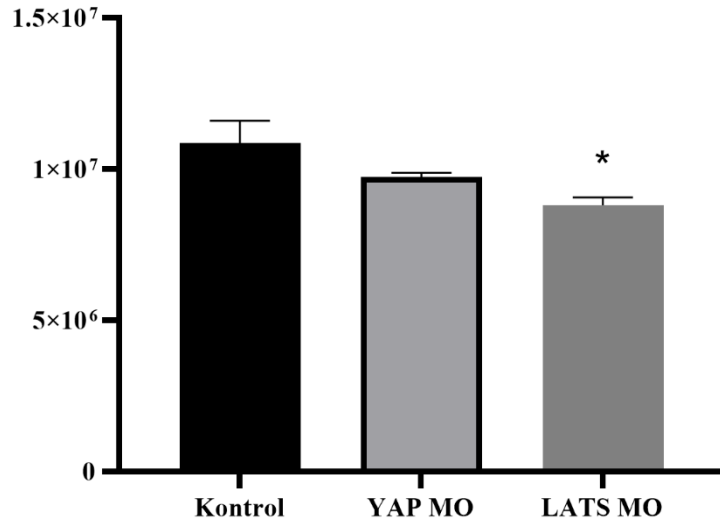
Şekil 6.8.2. Kol kesiminden sonra 17. Günde (morfolino enjeksiyonundan sonrası 7. gün) blastema alanlarının karşılaştırılması. İnhibisyonlu gruplarda kontrol grubuna göre anlamlı fark görüldü. Kontrol grubunda ölçülen alan YAP MO ve LATS MO gruplarına göre daha fazla idi.

24. GÜN YENİLENEN DOKU ALANLARI (μm^2)



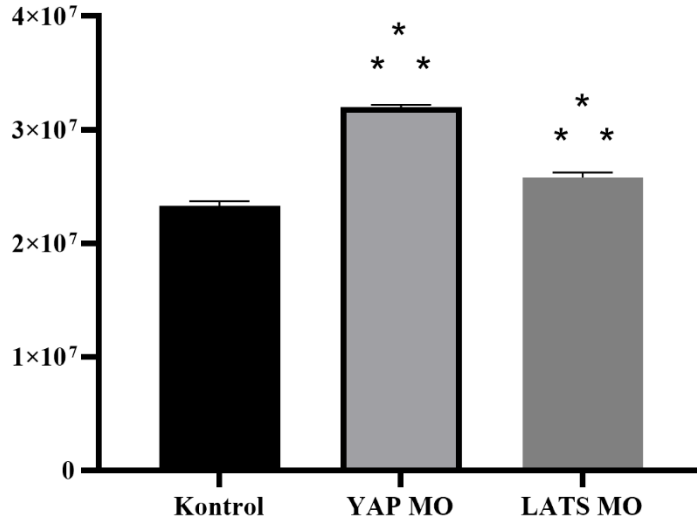
Şekil 6.8.3. Kol kesiminden sonra 24. Günde (morfolino enjeksiyonundan sonrası 14. gün) yenilenen doku alanlarının karşılaştırılması. YAP MO grubu, kontrol grubuna göre anlamlı fark görüldü. Aynı zamanda YAP MO grubu, LATS MO grubuna göre de anlamlı farklı idi. YAP MO grubunda ölçülen yenilenen doku alanı diğer gruplara göre fazla idi.

31. GÜN YENİLENEN DOKU ALANLARI (μm^2)

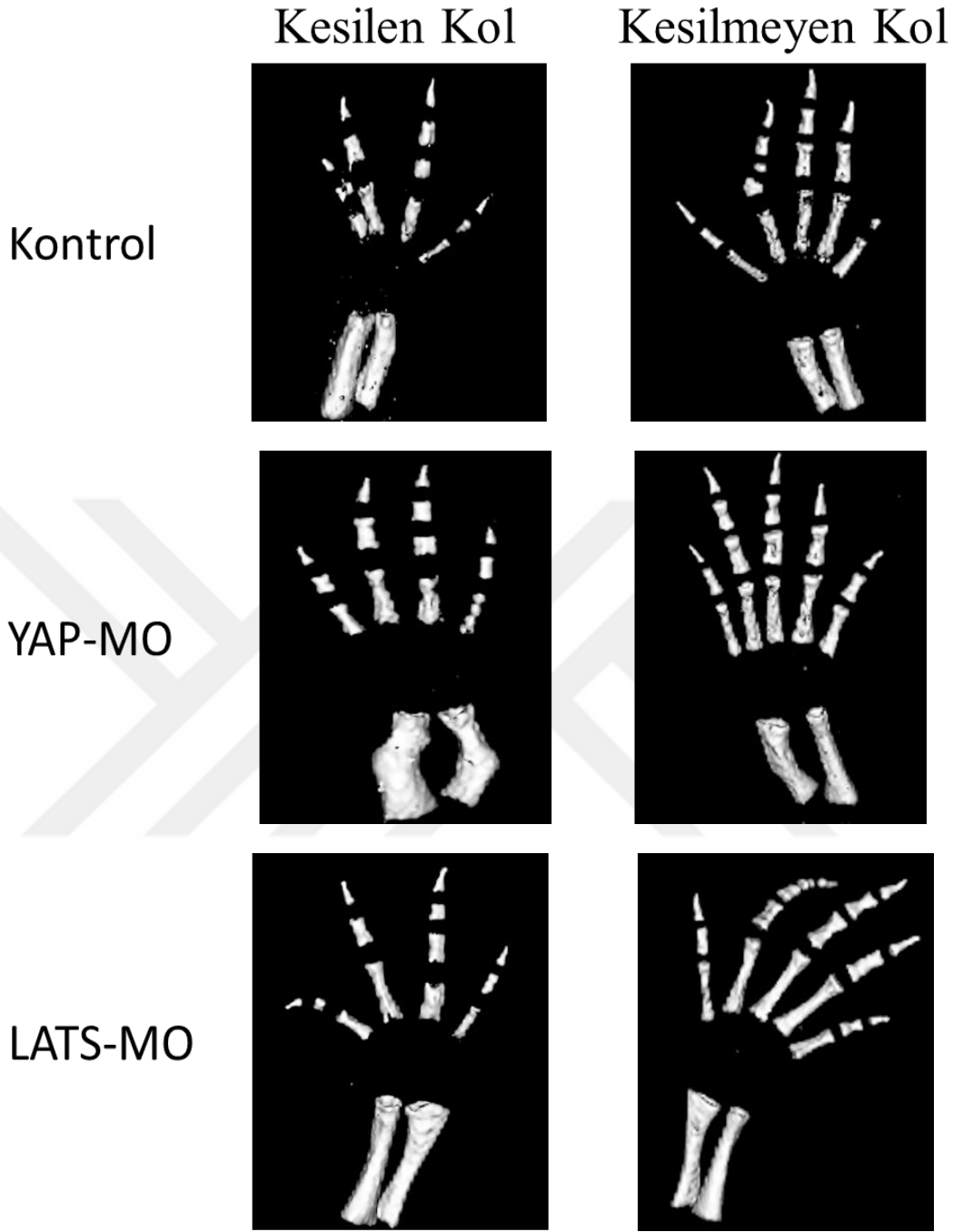


Şekil 6.8.4. Kol kesiminden sonra 31. Günde (morfolino enjeksiyonundan sonrası 21. gün) yenilenen doku alanlarının karşılaştırılması. LATS MO grubunda, kontrol grubuna göre anlamlı fark görüldü. Kontrol grubunda ölçülen yenilenen doku alanı diğer gruplara göre fazla idi.

52. GÜN YENİLENEN DOKU ALANLARI (μm^2)



Şekil 6.8.5. Kol kesiminden sonra 52. Günde (morfolino enjeksiyonundan sonrası 42. gün) yenilenen doku alanlarının karşılaştırılması. Bütün gruplar birbirlerine göre anlamlı farklı idi.



Resim 6.8.2. Neotonik hayvanlarda kol kesiminden sonra 120. Gündeki tomografi görüntüleri. Kol yenilenmelerine müteakip bir süre daha beklendi. Yenilenme tamamlandıktan sonra inhibisyonların kemik gelişimine etkisi olup olmadığına bilgisayarlı tomografi ile bakıldı. YAP MO grubunda kemiklerde sapma mevcuttu. Diğer yandan kontrol grubu da dahil her grupta kesim sonrası 4 parmak çıktığı görüldü.

7. TARTIŞMA VE SONUÇ

Hippo yolağı, farklılaşma, rejenerasyon, hücre göçü, organ büyümesi, apoptoz, hücre döngüsü gibi birçok hücreyel olayda etkin rol oynamaktadır. Bu yolağın en önemli proteinleri ise YAP/TAZ proteinleridir (7). Fosforile olan YAP/TAZ sitoplazmada ayrı görevler üstlenirken; fosfor kopunca nukleusa göç etmektedir (15). Hücre çekirdeğine göç eden bu proteinler spesifik genlerin ekspresyonunu sağlarlar. Wnt yolağı, reseptör tirozin kinaz yolağı gibi birçok yolağla da bağlantı halindedir. YAP/TAZ proteinlerini fosforilleyen en önemli proteinler ise LATS1/LATS2 proteinleridir (7). Hücrelerin değişik kondüsyonlarına göre YAP/TAZ proteinlerinin hücreyel lokalizasyonu da değişmektedir. Örneğin yüksek hücre yoğunluğunda sitoplazmada iken; düşük hücre yoğunluğunda çekirdekte lokalize olmaktadır (15). Hippo yolağı, türler arasında korunmuş gen dizi bilgilerine sahiptir (12). Aksolotl ise rejenerasyon kapasitesi açısından eşsiz bir model organizmadır (8). Literatürde bilinen Hippo yolağı görevleri göz önüne alındığında bu yolağın aksolotl kol yenilenmesinde etkin rolü olması beklenmektedir. Morfolino bir mRNA inhibisyon sistemidir (130). Aksolotl gibi canlılarda yenilenmeyi aydınlatmak adına sıkça kullanılan tekniklerden biridir (127).

Bu tez çalışmasında, aksolotl kol yenilenmesinde Hippo yolağının rollerinin aydınlatılması için metamorfoz geçirmiş (metamorfik) ve geçirmemiş (neotonik) aksolotllarda kol hasarı yapılmıştır. Kol hasarı sonrası 10. Günde doku örnekleri toplanmıştır. Bu doku örneklerinde YAP, fosfo-YAP, fosfo-LATS ve PCNA immünohistokimya deneyleri yapılmıştır. Gen inhibisyonu yapılan grupta ise, metamorfik ve neotonik hayvanlarda kol hasarından sonra 10 gün beklenilip 10. Günde morfolino sistemi kullanılarak YAP ve LATS proteinlerinin inhibisyonu yapılmıştır. 6 gün beklenildikten sonra dokular izole edilip; YAP, fosfo-YAP, fosfo-LATS ve PCNA immünohistokimya deneyleri yapılmıştır. Bununla birlikte inhibisyonlu gruplarda 16. Günde blastema alanları tespit edilmiştir.

Aynı zamanda proje önerisinde eksik olarak görülen morfolino enjeksiyonunun başarısı ile ilgili yapılan eleştiri kapsamında kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu deneyi yapılmıştır. Kol kesiminden 10 gün sonra morfolino enjeksiyonları yapılmıştır. 2 gün beklendikten sonra deney yapılmıştır. Morfolinoların transferi için kullanılan elektroporasyonun etkinliği *in vivo* ve *in vitro* gösterilmiştir. Morfolinonun

etkinliğini göstermek için yapılan gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonunda YAP yaklaşık 4 kat; LATS yaklaşık 2 kat azaldığı görülmüştür.

Blastema alanları ölçüm sonuçlarına göre neotonik hayvanlarda YAP ve LATS inhibisyonları sonucu alan azalırken; metamorfik hayvanlarda inhibisyonlar sonrası alan değişimi tespit edilmemiştir. İmmunohistokimya sonuçları ise pozitif hücreler sayılarak elde edilmiştir. Neotonik hayvanlardaki 10. Gün, 16. Gün, 16. Gün YAP morfolino (MO) ve 16. Gün LATS morfolino (MO) gruplarındaki YAP, fosfo-YAP ve fosfo-LATS antikoru bakımından pozitiflik oranları ve metamorfik hayvanlardaki 10. Gün, 16. Gün, 16. Gün YAP morfolino (MO) ve 16. Gün LATS morfolino (MO) gruplarındaki YAP, fosfo-YAP ve fosfo-LATS antikoru bakımından pozitiflik oranları sonuç kısmında verilmiştir. Bu sonuçlara göre inhibisyonun 6 gün sonra da korunduğu tespit edilmiştir.

Tez çalışmamıza en yakın çalışmada *Xenopus laevis* model organizmasında yapılmıştır. Hippo yolağının *Xenopus laevis* uzuv yenilenmesindeki rolleri Hippo yolağının temel proteini olan YAP1 proteini üzerinden aydınlatılmaya çalışılmıştır. Bu proteinin işlevini belirlemek için bu proteinin baskın negatif (dominant-negative) YAP1 formunu ifade eden hayvanlar transgenik olarak oluşturulmuştur. Transgenik hayvan oluşturulması için ısı-şok (heat-shock) protomotörü içeren plazmid kullanılmıştır. Baskın-negatif formuna sahip hayvanlarda hücre proliferasyonunun azaldığı, ektoptik apoptozun indüklendiği ve uzuv modelleme genlerinin ekspresyon profillerinin bozulduğu gözlemlenmiştir. Aynı zamanda hayvanlarda yenilenen uzuvlarda kusurlar tespit edilmiştir. Bu sonuçlar, YAP1'in uzuv rejeneratif kapasitesini kontrol etmede çok önemli bir role sahip olduğunu göstermiştir (92). Bu sonuçlar ele alındığında, çalışmamızda daha uzun süreli gözlemlere ihtiyaç duyulduğu anlaşılmaktadır. Ayrıca aksolotllarda da birçok farklı transgenik hayvan hatları oluşturulması üzerine daha fazla çalışma yapılması gerektiği ön görülmektedir.

Aynı çalışmada YAP1 proteininin *Xenopus laevis* blastemasında aktivitesinin arttığı gösterilmiştir. Ayrıca blastema hücrelerinde YAP1 mRNA seviyeleri artmış ve protein düzeyinde çekirdeğe geçtiği görülmüştür. YAP proteinin çekirdeğe göçü ise aktif hale geldiğini göstermektedir. YAP proteini aynı zamanda hücre-hücre ve hücre hücre dışı matris (extracellular matrix) etkileşimlerinde önemli rol oynamaktadır ve bu etkileşimlerde hücrelerde YAP proteininin hücre çekirdeğine göç ettiği

görülmektedir. Yenilenme sürecinde hücre-ECM etkileşimi çok önemli rol oynamaktadır. Çalışmada bu etkileşimden dolayı uzuv kaybının olabileceği belirtilmektedir (23, 142). Yine bu noktada çalışmamızda uzun süreli gözlemlere ihtiyaç olduğu sonucu çıkarılabilmektedir. Ayrıca baskın-negatif YAP blastemalara elektropore edilirse benzer sonucun aksotollarda görülmesi beklenmektedir.

Çalışmamızda YAP proteini genellikle hücre sitoplazmasında görülmüştür. Bu çalışmanın aksine rejenere dokuda çekirdekte YAP çoğu yerde görülmemiştir. Fakat fosfo-YAP proteini literatürün aksine (fosfo-YAP'ın çekirdekte olabileceğini gösteren yayınlar olsa da) hücre çekirdeğinde görülmüştür. Bu da aydınlatılması gereken farklı bir mekanizma olabileceği sorusunu akla getirmektedir.

PCNA ve fosfo-YAP antikoru ile yapılan boyamalar literatürdeki çoğu boyamaya ters düşmektedir. İki boya için uygulanan protokolün çalıştığı düşünülmektedir. Fakat teknik sorunlardan dolayı da bu sonuçlar görüntülenmiş olabileceği düşünülmektedir. Diğer antikorların çalıştığı protokolde bu ihtimalin düşük olduğu tahmin edilmektedir. Bu antikorlar daha önce aksotoll deney modelinde denenmediği için literatürde referans alınacak sonuçlar da bulunmamaktadır. Fakat hem PCNA proteininin sitoplazmadaki rollerine hem de fosfo-YAP proteininin çekirdekteki rollerine dair literatür bilgileri de bulunmaktadır.

Çoğalan hücre nükleer antijeni (PCNA) proteini için, çekirdekte geniş bir fonksiyon yelpazesi bulunmaktadır. Bununla birlikte, sitoplazmada önemli miktarda PCNA da bulunur, ancak işlevleri tam olarak aydınlatılmamıştır. PCNA, DNA replikasyonu ve tamiri, transkripsiyon, kromozom ayrılması ve hücre döngüsü gibi birçok önemli hücresel süreçlerde etkin rol almaktadır. PCNA-kanser ilişkisi çokça çalışılmaktadır. PCNA kanser hücrelerinde normal hücrelere göre anlamlı şekilde fazladır. PCNA, kanser hücrelerinde onkogenik gelişim ve ilerlemesi için elzemdir. Yapılan çalışmada, ilginç bir şekilde PCNA proteininin 6 tane glikolitik enzimle ilişkili olduğu gösterilmiştir. Glikoliz de sitoplazmada gerçekleştiği için PCNA proteininin sitoplazmada çok önemli roller olduğu söylenebilir. Glikolize ek olarak PCNA malat dehidrogenaza bağlanmaktadır. Malat dehidrogenaz da mitokondride enerji üretim sistemi için elzemdir. Ayrıca PCNA proteini, hücre iskeleti bütünlüğü ve gerekli hücresel sinyallerinin düzenlenmesi gibi hücresel süreçlerde de sitoplazma ve membran proteinlerine bağlanarak rol oynamaktadır. Bu proteinler arasında annexin

A2, sarcolectin, elongation factor 2 gibi proteinler bulunmaktadır (143). Ayrıca sitoplazmik PCNA akut myelom lösemi kanser tipinde de glikoliz ve hücre hayatta kalımları ile de ilişkilidir. Ek olarak, PCNA proteininin sitoplazmik lokalizasyonu olgun nötrofillerde de görülmektedir. Ve bu sitoplazmik lokalizasyon nötrofillerin hayatta kalması ve farklılaşması için önemli belirteçlerden biridir (144). Literatürdeki bu bilgiler, projeden alınan PCNA protein verilerine ışık tutabileceğini göstermektedir. PCNA, aksolotlda da glikoliz için gerekli enzimlerle sitoplazmada ilişkili olabilir. Bunun ispatı için daha ileri çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Ayrıca aksolotlda sitoplazmada görülmesinin sebeplerinden birisi de aksolotl kanser metabolizması olabilir.

YAP proteininin hücre çekirdeği ve sitoplazmasındaki bulunma durumları proteinlerin aktivitesini düzenlemektedir. Fosfo-YAP proteininin çekirdekdeki rollerine dair çok kısıtlı literatür bilgileri bulunmaktadır. Bunlardan birisi Fas reseptörünün aktive olması ile YAP proteininin normal şartlarda olduğu gibi sitoplazmada fosforillenmesidir. RASSF1A proteini fosfo-YAP'ın çekirdeğe girmesini indüklemektedir. Bu da pro-apoptoz genlerinin aktivitesini sağlamaktadır. Mekanizmada, YAP fosforilasyonu yapılan amino asit tirozindir. Bu mekanizmada P73 transkripsiyon faktörü de aktifleşmektedir (145). Proje raporunda görülen çekirdekdeki fosfo-YAP boyaması da buna benzer bir mekanizmadan kaynaklanıyor olabileceği düşünülmektedir.

Kolanjiyoma kanser hücrelerinde (CCA) ve dokularında YAP'ın çekirdekdeki fosforilasyonu çalışılmıştır. CCA hücrelerinde, YAP proteininin çekirdekdeki tirozin fosforilasyonu normal kolanjiyositlere göre artmıştır. Daha da önemlisi, bir SRC kinaz ailesi (SFK) inhibitörü olan dasatinib YAP proteininin tirozin fosforilasyonunu bloklamıştır. Aynı zamanda dasatinib YAP'ın nükleustan sitoplazmaya geçişini indüklemiştir ve YAP hedef genlerinin ekspresyon seviyelerini azaltmıştır. Sonuçlar bu geçişin serin fosforilasyonundan bağımsız olduğunu göstermiştir. Ve yeni bir hücrel YAP mekanizması ortaya çıkarmıştır. SFK inhibisyonu bu mekanizma üzerinden CCA hücre ölümlerini *in vitro* ve *in vivo* artırmıştır (146). Bu sonuçlardan yola çıkarak aksolotlda kendiliğinden böyle bir çekirdek YAP-fosforilasyon mekanizması olabileceği ve bu aksolotlın tümör geliştirmemesini açıklayabilecek mekanizmalardan biri olabileceği ön görülmektedir.

Tezde yapılan KGZ-PZR sonuçları ilginç veriler sunmuştur. Yapılan bu deneyler metamorfik ve neotonik hayvanlar karşılaştırılarak yapılmıştır. Ayrıca inhibisyonlardan sonrası altıncı günde de bu karşılaştırmalar mRNA düzeyinde yapılmıştır. 7. günde yapılan karşılaştırmalara göre metamorfik hayvanda YAP ve LATS mRNA seviyeleri fazlayken; 10. ve 16. günlerde neotonik hayvanlarda YAP ve LATS mRNA seviyeleri fazladır. Metamorfik hayvanda 7. günde YAP 1005 kat; LATS 810 kat fazladır. Bu durum 16. günde neotonik hayvan lehine dönmüştür. Bu da yenilenme sırasında farklı günlerde YAP ve LATS mRNA düzeylerinin farklı düzenlenmeleri olduğunu ortaya çıkarmıştır. Ayrıca metamorfik hayvanlarda YAP ve LATS inhibisyonlarından sonra bu proteinlerin mRNA seviyelerinin kontrol gruplarına göre anlamlı derecede farklı olduğu görülmektedir. Bu fark ise metamorfik aksolotlların inhibisyona verdiği moleküler tepkiyi yansıtmaktadır. Neotonik hayvanlarda YAP inhibisyonundan sonra YAP ve LATS seviyeleri artarken; LATS inhibisyonundan sonra YAP ve LATS seviyeleri azalmıştır. Bu da LATS inhibisyonunun 6 gün sonra bile kalıcı olduğunu göstermektedir. Metamorfik ve neotonik hayvanlardaki inhibisyonlar sonucu mRNA seviyesindeki bu artış aksolotlın metamorfoz geçirse bile bu yolakta bazı moleküler yolları koruduğu fikrini ortaya çıkarmaktadır. İnhibisyon sonrası bu yolak aktive olsa da mRNA her zaman proteine dönememektedir. Hakeza yapılan proteomiks sonuçlarına göre mRNA işlemesi konularında da artış ya da azalış görülmektedir. Sonuç olarak; neotonik ve metamorfik kontrol gruplarında bu derece fark görülmesi bu iki aksolotl tipi için önemli işaretler taşımaktadır. Neotonik ve metamorfik aksolotllarda, protein düzeyinde yapılabilecek inhibisyonların mRNA düzeyinde hangi etkiyi oluşturacağı bilinmemektedir. Sonuç kısmında belirtildiği üzere boyama sonuçları ve KGZ-PZR sonuçları birçok noktada ters düşmektedir. Bunun sebebi olarak bütün mRNA'ların proteine dönememesi gösterilebilir.

Proteomiks verilerinden işaretle yara iyileşmesi önemli bir tartışma konusu olarak karşımıza çıkmaktadır. Fiziksel travma, yaşlanma veya çeşitli hastalıklar dokularda ve tüm organlarda kalıcı hasara neden olabilmektedir (147). Bu yıkıcı koşullar hayat kalitesini düşürmekle birlikte, toplum üzerinde ağır bir yaşamsal yüke neden olmaktadır. Bu sebeple, yaralı doku veya organların yenilenerek normal işlevlerini yeniden kazanması hayat kalitesini tekrardan arttıracığı gibi oluşan

kısıtlamaları da hafifletebileceğine inanılmaktadır (148). Çoğu memeli dokusunun yenilenme potansiyeli oldukça sınırlıdır veya yenilenme potansiyeli hiç yoktur. Memelilerde dokunun kendini yenilemesi son derece kısıtlıyken semenderler, bu durumun aksine hem yapısal hem de işlevsel olarak bazı uzuvlarını ve organlarını (kalp, omurilik ve belirli beyin bölgeleri gibi karmaşık biyolojik yapıları dahil) yenileyebilme özelliğine sahiptirler . Ayrıca semenderler, tüm tetrapodlar arasında en yüksek rejeneratif yeteneğe sahip canlılardır . Bu nedenle, bir semender türü olan *Ambystoma mexicanum*'da (aksolotl) rejenerasyonu mümkün kılan mekanizmaları incelemek, bu doğal sürecin nasıl işlediğine dair yeni moleküler yaklaşımlar kazanılmasına yardımcı olacaktır (149).

Semenderler de görülen uzuv yenilenme kapasiteleri, yaklaşık 250 yıldır bilim insanlarının ilgisini çekmiştir ve uzun yıllardır kapsamlı bir şekilde incelenmektedir. Bu epimorfik rejenerasyon, yaralanma bölgesinde oluşan heterojen bir hücre kütleli olan blastema dokusunun oluşumunu içermektedir. Blastema dokusu, kayıp uzvu oluşturmak için doku büyümesinin kontrolünü ve hücrelerel farklılaşmaların düzenlenmesini yönetmektedir. Ekstremitte rejenerasyonu sırasında ise buna ek olarak epidermal doku da kritik bir rol oynamaktadır . Ampütasyondan sonra, ampütasyon bölgesini kaplayan bir yara epiteli oluşmaktadır ve bu yara epiteli apikal epidermal kep (AEK) adı verilen çok tabakalı bir epidermal dokuya dönüşmektedir. AEK dokusu oluşmadan rejenerasyon gerçekleşmemektedir. Benzer şekilde, memelilerin de belirli koşullar altında kopmuş parmak uçlarını ve ayak parmaklarını yenileyebildikleri görülsede, semenderlerin aksine, memeliler tüm uzuvlarını yeniden oluşturamazlar. Bu durumun sebeplerinden birisi AEK dokusunun oluşmamasıdır. Bununla beraber, memelilerde bu birimleri yeniden büyütmek için kullanılan moleküler mekanizmalar, aksolotl tarafından kullanılan moleküler mekanizmalarla benzerlik göstermektedir (150). Bu nedenle semenderlerin tüm uzuvlarını verimli ve başarılı bir şekilde yenilemek için benzer mekanizmaları nasıl kullandıklarını anlamak, insan ampütasyonlarının da benzer şekilde tedavi edilmesine yardımcı olabilecektir.

Türler arası korunmuş birçok moleküler yolak, hasardan sonra oluşan rejeneratif yanıtta rol oynamaktadır ve bu yolakların epidermal doku gelişimindeki ve ön ekstremitte rejenerasyonu sırasındaki rollerinin bazıları aksolotlda incelenmiştir.

Fakat epidermal büyümedeki ve rejenerasyondaki temel rolleri bilinen Hippo yolağı, aksotl uzuv rejenerasyonu sırasında oluşan özelleşmiş epidermiste (yara epiteli ve AEK) henüz çalışılmamıştır. Hippo yolağı, hedef genlerin transkripsiyonel aktivasyonu veya baskılanması için çok sayıda yukarı akış (upstream) girdisi taşıyan ve türler arasında oldukça iyi korunmuş olduğu bilinen bir sinyal iletim yoludur . Bu hedef genler, hücre döngüsünün, hücre göçünün ve hücre kaderinin düzenleyicilerini içermektedir. Bu şekilde, Hippo yolağı bir dizi hayati hücrel karara aracılık edebilmektedir. Yolağın ana bileşenleri, bir kinaz kaskadından ve aşağı akış (downstream) efektörleri olan YAP (Yes Aktive edici Protein) ve TAZ (PDZ Bağlayıcı Proteini)' dan oluşmaktadır . Fosforile edilmemiş YAP ve TAZ, hedef genlerinin ifadesini sürdürmek veya baskılamak için bir transkripsiyon faktörü olan TEAD ile bir kompleks oluşturarak çekirdekte lokalize olmaktadır. YAP ve TAZ'ın Hippo yolağının temel kinazları tarafından fosforilasyonu, bu iki proteinin nükleer lokalizasyonunu ve işlevini inhibe etmektedir. Bu nedenle, Hippo kinazları YAP / TAZ aktivitesini engellemektedir ve Hippo yolunun transkripsiyonel çıktısını baskılamaktadır. Homolog transkripsiyon koaktivatörleri olan YAP ve TAZ, yapısal ve fonksiyonel olarak ilişkilidir ve biyolojik fonksiyonları büyük ölçüde örtüşmektedir. Bununla birlikte, her birinin ayrı biyolojik işlevleri de bulunmaktadır. İlginç bir şekilde, YAP ve TAZ'ın indüklenmiş aktivasyonu, farelerde zayıf rejeneratif potansiyele sahip organlarda rejenerasyonu teşvik edebildiği görülmektedir. Hippo yolağı, normal epidermal homeostaz ve yaralanma sonrası yara kapanması için gerekli olduğundan (151), ekstremite rejenerasyonu sırasında yara epitelinin ve AEK'in oluşumu için Hippo yolunun uygun şekilde düzenlenmesinin gerekli olduğu düşünülmektedir. Memelilerde vücut bölümlerinin kısıtlı rejenerasyonlarına ve uygun bir AEK oluşturamamalarına karşın, aksotl uzuv rejenerasyonunda AEK oluşumu oldukça önemlidir ve bu sebeple semenderlerde AEK oluşumunu yönlendiren moleküler mekanizmaları anlamak önem arz etmektedir. Bu bağlamda, mevcut terapötik manipülasyonların geliştirilmesine yardımcı olabileceği için, aksotlda ekstremite rejenerasyonu sırasında Hippo yolunun nasıl düzenlendiğini anlamak ve epidermal işlevini araştırmak önem arz etmektedir.

Son zamanlarda, Hippo yolağı genlerinin düzenlenebilmesi, gen hedefleme teknolojileri ve aksotl genomunun yayınlanması gibi olumlu gelişmeler sayesinde

aksolotlda Hippo yolağı çalışmaya uygun hale gelmiştir. Bu sebeple, Hippo yolu efektör proteinleri YAP / TAZ'ın indüklenebilir gen ekspresyon modellerini oluşturmak için bu kaynakları önceden var olan yöntemlerle birlikte kullanmayı ve devamında da oluşturulan bu modelleri, aksolotlda uzuv rejenerasyonu sırasında Hippo yolağının epidermal fonksiyonunu incelemek için kullanmayı amaçlanabilir (152).

Yeni proje önerilerindeki nihai özgünlük hedef, aksolotldaki planlanan araştırmalar için bazı translasyonel uygulamalar bulmaktır. Bu nedenle, elde edilen bulguların test edilebileceği bir 'insan' sistemine ihtiyaç duyulmaktadır. Bu sistemi elde etmek için, insan hücrelerindeki mevcut ve gelecekteki bulguların/hipotezin test edilebileceği bir hücre kültürü sisteminin kurulması planlanmalıdır. Fibroblast kökenli hücreler blastemada aşırı temsil edildiğinden, aksolotl ve insan fibroblast hücreleri arasındaki eksternal pro-rejenerasyon sinyallerine hücreler tarafından verilecek yanıtların gözlemlenmesi hedeflenmektedir. İnsan ve aksolotl fibroblast hücre hatları ticari olarak satın alınabilmektedir. Bu basitleştirilmiş kültürü kullanarak blastema oluşumu ile ilgili bazı hipotezler test edilebilecektir. Örneğin; bu hücreler genetik olarak kolaylıkla manipüle edilebilecektir. Böylece, farklı genler ifade edilebilecek ve farklı konumsal kökenler taklit edilebilecektir. Bu hücreler, blastema oluşumuna katılacak diğer hücrelerle (muhtemelen bağışıklık hücreleriyle) birlikte kültüre edilebilecektir (8). Bu sistemi kurarken, aksolotl AEK organotipik kültürleri ile zenginleştirilmiş besiyerinin aksolotl ve insan fibroblastlarında erken blastema belirteçlerinin ekspresyonunu indükleyip indükleyemeyeceğinin test edilmesi hedeflenmelidir.

Proteomiks verileri ve bilgisayarlı tomografi verileri, YAP mRNA inhibisyonunun aksolotl kol yenilenmesindeki kemik gelişiminde etkili olduğunu ortaya koymuştur. Hippo yolağının kemik gelişimindeki rolleri oldukça çok çalışılmış konulardan birisidir (95). Dominant negatif (fonksiyon azaltıcı) ve sürekli aktif (fonksiyon artırıcı – constitutive active) YAP klonlamaları yapılarak aksolotl blastemasına enjekte edilebilir. Bu plazmidlerin blastemaya entegre olması dahilinde morfolino sisteminden daha etkili bir bloklama yapması düşünülmektedir. Sürekli aktif olan formunda ise daha hızlı rejenerasyon görüleceği ön görülebilmektedir.

Sonuç olarak, aksolotl model organizması kullanılarak mRNA düzeyinde Hippo yolağı efektör proteinlerini inhibe ettiğimiz bu çalışmada, metamorfik ve neotonik aksolotllarda inhibisyonun aynı derecede etkili olduğu görülmüştür. Kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu, immünohistokimya, western blot, proteomiks ve bilgisayarlı tomografi gibi güncel teknikler kullanılarak yapılan bu çalışmada elde ettiğimiz sonuçlar aşağıdaki şekilde sıralanabilir:

1-Literatürde ilk defa aksolotlda bu yolak çalışılmıştır.

2-Yine literatürde ilk defa neotonik ve metamorfik aksolotllarda karşılaştırma yapılarak insan yenilenmesine daha fazla yakın bilgi üretilmiştir.

3- Yine literatürde ilk defa hem neotonik hem metamorfik hayvanlarda Hippo yolağı proteinleri inhibe edilmiştir.

4-İmmünohistokimya deneyleri sonuçlarına göre; morfolino verilen hayvanlardaki pozitif hücre sayılarının daha az olduğu görülmüştür. Bu bilgilerden inhibisyonun kalıcı olduğu sonucuna varılmıştır. Fakat bazı gruplarda bu protein düzeyindeki sonuçlar mRNA düzeyindeki sonuçlara kıyasla farklı görülmüştür.

5-Uzun süreli bekletilen hayvanlarda, YAP mRNA inhibisyonundan sonra neotonik aksolotl yenilenen kolunda kemik dezenformasyonu görülmüştür. Bu da sonraki birçok çalışmaya ilham verecek nitelikte bir veridir.

8. KAYNAKLAR

- 1.Lane SW, Williams DA, Watt FM. Modulating the stem cell niche for tissue regeneration. *Nature biotechnology*. 2014;32(8):795-803.
- 2.Wang Y, Yu A, Yu FX. The Hippo pathway in tissue homeostasis and regeneration. *Protein & cell*. 2017;8(5):349-59.
- 3.Meng Z, Moroishi T, Guan KL. Mechanisms of Hippo pathway regulation. *Genes & development*. 2016;30(1):1-17.
- 4.Goulev Y, Fauny JD, Gonzalez-Marti B, Flagiello D, Silber J, Zider A. SCALLOPED interacts with YORKIE, the nuclear effector of the hippo tumor-suppressor pathway in *Drosophila*. *Current biology : CB*. 2008;18(6):435-41.
- 5.Wu S, Liu Y, Zheng Y, Dong J, Pan D. The TEAD/TEF family protein Scalloped mediates transcriptional output of the Hippo growth-regulatory pathway. *Developmental cell*. 2008;14(3):388-98.
- 6.Zhang L, Ren F, Zhang Q, Chen Y, Wang B, Jiang J. The TEAD/TEF family of transcription factor Scalloped mediates Hippo signaling in organ size control. *Developmental cell*. 2008;14(3):377-87.
- 7.Moya IM, Halder G. Hippo-YAP/TAZ signalling in organ regeneration and regenerative medicine. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2018.
- 8.McCusker C, Bryant SV, Gardiner DM. The axolotl limb blastema: cellular and molecular mechanisms driving blastema formation and limb regeneration in tetrapods. *Regeneration*. 2015;2(2):54-71.
- 9.De Groef B, Grommen SVH, Darras VM. Forever young: Endocrinology of paedomorphosis in the Mexican axolotl (*Ambystoma mexicanum*). *General and comparative endocrinology*. 2018;266:194-201.
- 10.Schnapp E, Tanaka EM. Quantitative evaluation of morpholino-mediated protein knockdown of GFP, MSX1, and PAX7 during tail regeneration in *Ambystoma mexicanum*. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*. 2005;232(1):162-70.
- 11.Zhu W, Pao GM, Satoh A, Cummings G, Monaghan JR, Harkins TT, et al. Activation of germline-specific genes is required for limb regeneration in the Mexican axolotl. *Dev Biol*. 2012;370(1):42-51.

- 12.Varelas X. The Hippo pathway effectors TAZ and YAP in development, homeostasis and disease. *Development*. 2014;141(8):1614-26.
- 13.Franklin JM, Guan KL. YAP/TAZ phase separation for transcription. *Nature cell biology*. 2020;22(4):357-8.
- 14.Hayashi S, Yokoyama H, Tamura K. Roles of Hippo signaling pathway in size control of organ regeneration. *Development, growth & differentiation*. 2015;57(4):341-51.
- 15.Pancieria T, Azzolin L, Cordenonsi M, Piccolo S. Mechanobiology of YAP and TAZ in physiology and disease. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2017;18(12):758-70.
- 16.Meng Z, Moroishi T, Mottier-Pavie V, Plouffe SW, Hansen CG, Hong AW, et al. MAP4K family kinases act in parallel to MST1/2 to activate LATS1/2 in the Hippo pathway. *Nat Commun*. 2015;6:8357.
- 17.Fan F, He Z, Kong LL, Chen Q, Yuan Q, Zhang S, et al. Pharmacological targeting of kinases MST1 and MST2 augments tissue repair and regeneration. *Science translational medicine*. 2016;8(352):352ra108.
- 18.Munoz Ruiz M, Regueiro JR. New tools in regenerative medicine: gene therapy. *Advances in experimental medicine and biology*. 2012;741:254-75.
- 19.Yin H, Kanasty RL, Eltoukhy AA, Vegas AJ, Dorkin JR, Anderson DG. Non-viral vectors for gene-based therapy. *Nature reviews Genetics*. 2014;15(8):541-55.
- 20.Goodell MA, Nguyen H, Shroyer N. Somatic stem cell heterogeneity: diversity in the blood, skin and intestinal stem cell compartments. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2015;16(5):299-309.
- 21.Schlegelmilch K, Mohseni M, Kirak O, Pruszek J, Rodriguez JR, Zhou D, et al. Yap1 acts downstream of alpha-catenin to control epidermal proliferation. *Cell*. 2011;144(5):782-95.
- 22.Elbediwy A, Vincent-Mistiaen ZI, Spencer-Dene B, Stone RK, Boeing S, Wculek SK, et al. Integrin signalling regulates YAP and TAZ to control skin homeostasis. *Development*. 2016;143(10):1674-87.
- 23.Dupont S, Morsut L, Aragona M, Enzo E, Giulitti S, Cordenonsi M, et al. Role of YAP/TAZ in mechanotransduction. *Nature*. 2011;474(7350):179-83.

24. Huang J, Wu S, Barrera J, Matthews K, Pan D. The Hippo signaling pathway coordinately regulates cell proliferation and apoptosis by inactivating Yorkie, the *Drosophila* Homolog of YAP. *Cell*. 2005;122(3):421-34.
25. Koontz LM, Liu-Chittenden Y, Yin F, Zheng Y, Yu J, Huang B, et al. The Hippo effector Yorkie controls normal tissue growth by antagonizing scalloped-mediated default repression. *Developmental cell*. 2013;25(4):388-401.
26. Fernandez BG, Gaspar P, Bras-Pereira C, Jezowska B, Rebelo SR, Janody F. Actin-Capping Protein and the Hippo pathway regulate F-actin and tissue growth in *Drosophila*. *Development*. 2011;138(11):2337-46.
27. Sansores-Garcia L, Bossuyt W, Wada K, Yonemura S, Tao C, Sasaki H, et al. Modulating F-actin organization induces organ growth by affecting the Hippo pathway. *The EMBO journal*. 2011;30(12):2325-35.
28. Sudol M, Bork P, Einbond A, Kastury K, Druck T, Negrini M, et al. Characterization of the mammalian YAP (Yes-associated protein) gene and its role in defining a novel protein module, the WW domain. *The Journal of biological chemistry*. 1995;270(24):14733-41.
29. Kanai F, Marignani PA, Sarbassova D, Yagi R, Hall RA, Donowitz M, et al. TAZ: a novel transcriptional co-activator regulated by interactions with 14-3-3 and PDZ domain proteins. *The EMBO journal*. 2000;19(24):6778-91.
30. Boggiano JC, Vanderzalm PJ, Fehon RG. Tao-1 phosphorylates Hippo/MST kinases to regulate the Hippo-Salvador-Warts tumor suppressor pathway. *Developmental cell*. 2011;21(5):888-95.
31. Poon CL, Lin JI, Zhang X, Harvey KF. The sterile 20-like kinase Tao-1 controls tissue growth by regulating the Salvador-Warts-Hippo pathway. *Developmental cell*. 2011;21(5):896-906.
32. Callus BA, Verhagen AM, Vaux DL. Association of mammalian sterile twenty kinases, Mst1 and Mst2, with hSalvador via C-terminal coiled-coil domains, leads to its stabilization and phosphorylation. *The FEBS journal*. 2006;273(18):4264-76.
33. Praskova M, Xia F, Avruch J. MOBKL1A/MOBKL1B phosphorylation by MST1 and MST2 inhibits cell proliferation. *Current biology : CB*. 2008;18(5):311-21.

- 34.Hergovich A, Schmitz D, Hemmings BA. The human tumour suppressor LATS1 is activated by human MOB1 at the membrane. *Biochemical and biophysical research communications*. 2006;345(1):50-8.
- 35.Yin F, Yu J, Zheng Y, Chen Q, Zhang N, Pan D. Spatial organization of Hippo signaling at the plasma membrane mediated by the tumor suppressor Merlin/NF2. *Cell*. 2013;154(6):1342-55.
- 36.Zhao B, Wei X, Li W, Udan RS, Yang Q, Kim J, et al. Inactivation of YAP oncoprotein by the Hippo pathway is involved in cell contact inhibition and tissue growth control. *Genes & development*. 2007;21(21):2747-61.
- 37.Zheng Y, Wang W, Liu B, Deng H, Uster E, Pan D. Identification of Happyhour/MAP4K as Alternative Hpo/Mst-like Kinases in the Hippo Kinase Cascade. *Developmental cell*. 2015;34(6):642-55.
- 38.Liu CY, Zha ZY, Zhou X, Zhang H, Huang W, Zhao D, et al. The hippo tumor pathway promotes TAZ degradation by phosphorylating a phosphodegron and recruiting the SCF β -TrCP E3 ligase. *The Journal of biological chemistry*. 2010;285(48):37159-69.
- 39.Zhao B, Li L, Tumaneng K, Wang CY, Guan KL. A coordinated phosphorylation by Lats and CK1 regulates YAP stability through SCF(beta-TRCP). *Genes & development*. 2010;24(1):72-85.
- 40.Liang N, Zhang C, Dill P, Panasyuk G, Pion D, Koka V, et al. Regulation of YAP by mTOR and autophagy reveals a therapeutic target of tuberous sclerosis complex. *The Journal of experimental medicine*. 2014;211(11):2249-63.
- 41.Zhao B, Ye X, Yu J, Li L, Li W, Li S, et al. TEAD mediates YAP-dependent gene induction and growth control. *Genes & development*. 2008;22(14):1962-71.
- 42.Ma S, Meng Z, Chen R, Guan KL. The Hippo Pathway: Biology and Pathophysiology. *Annual review of biochemistry*. 2019;88:577-604.
- 43.Fabian D, Guillermo Prieto Eibl MDP, Alnahhas I, Sebastian N, Giglio P, Puduvalli V, et al. Treatment of Glioblastoma (GBM) with the Addition of Tumor-Treating Fields (TTF): A Review. *Cancers (Basel)*. 2019;11(2).
- 44.Hansen CG, Moroishi T, Guan KL. YAP and TAZ: a nexus for Hippo signaling and beyond. *Trends in cell biology*. 2015;25(9):499-513.

45. Halder G, Johnson RL. Hippo signaling: growth control and beyond. *Development*. 2011;138(1):9-22.
46. Salah Z, Alian A, Aqeilan RI. WW domain-containing proteins: retrospectives and the future. *Frontiers in bioscience*. 2012;17:331-48.
47. Sudol M. YAP1 oncogene and its eight isoforms. *Oncogene*. 2013;32(33):3922.
48. Webb C, Upadhyay A, Giuntini F, Eggleston I, Furutani-Seiki M, Ishima R, et al. Structural features and ligand binding properties of tandem WW domains from YAP and TAZ, nuclear effectors of the Hippo pathway. *Biochemistry*. 2011;50(16):3300-9.
49. Ye F, Zhang M. Structures and target recognition modes of PDZ domains: recurring themes and emerging pictures. *The Biochemical journal*. 2013;455(1):1-14.
50. Oka T, Sudol M. Nuclear localization and pro-apoptotic signaling of YAP2 require intact PDZ-binding motif. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms*. 2009;14(5):607-15.
51. Remue E, Meerschaert K, Oka T, Boucherie C, Vandekerckhove J, Sudol M, et al. TAZ interacts with zonula occludens-1 and -2 proteins in a PDZ-1 dependent manner. *FEBS letters*. 2010;584(19):4175-80.
52. Oudhoff MJ, Freeman SA, Couzens AL, Antignano F, Kuznetsova E, Min PH, et al. Control of the hippo pathway by Set7-dependent methylation of Yap. *Developmental cell*. 2013;26(2):188-94.
53. Jang EJ, Jeong H, Han KH, Kwon HM, Hong JH, Hwang ES. TAZ suppresses NFAT5 activity through tyrosine phosphorylation. *Molecular and cellular biology*. 2012;32(24):4925-32.
54. Calvo F, Ege N, Grande-Garcia A, Hooper S, Jenkins RP, Chaudhry SI, et al. Mechanotransduction and YAP-dependent matrix remodelling is required for the generation and maintenance of cancer-associated fibroblasts. *Nature cell biology*. 2013;15(6):637-46.
55. Rosenbluh J, Nijhawan D, Cox AG, Li X, Neal JT, Schafer EJ, et al. beta-Catenin-driven cancers require a YAP1 transcriptional complex for survival and tumorigenesis. *Cell*. 2012;151(7):1457-73.
56. Levy D, Adamovich Y, Reuven N, Shaul Y. Yap1 phosphorylation by c-Abl is a critical step in selective activation of proapoptotic genes in response to DNA damage. *Molecular cell*. 2008;29(3):350-61.

57. Gordon M, El-Kalla M, Zhao Y, Fiteih Y, Law J, Volodko N, et al. The tumor suppressor gene, RASSF1A, is essential for protection against inflammation -induced injury. *PLoS One*. 2013;8(10):e75483.
58. Chen L, Chan SW, Zhang X, Walsh M, Lim CJ, Hong W, et al. Structural basis of YAP recognition by TEAD4 in the hippo pathway. *Genes & development*. 2010;24(3):290-300.
59. Li Z, Zhao B, Wang P, Chen F, Dong Z, Yang H, et al. Structural insights into the YAP and TEAD complex. *Genes & development*. 2010;24(3):235-40.
60. Hau JC, Erdmann D, Mesrouze Y, Furet P, Fontana P, Zimmermann C, et al. The TEAD4-YAP/TAZ protein-protein interaction: expected similarities and unexpected differences. *Chembiochem : a European journal of chemical biology*. 2013;14(10):1218-25.
61. Basu S, Totty NF, Irwin MS, Sudol M, Downward J. Akt phosphorylates the Yes-associated protein, YAP, to induce interaction with 14-3-3 and attenuation of p73-mediated apoptosis. *Molecular cell*. 2003;11(1):11-23.
62. Ho KC, Zhou Z, She YM, Chun A, Cyr TD, Yang X. Itch E3 ubiquitin ligase regulates large tumor suppressor 1 stability [corrected]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011;108(12):4870-5.
63. Salah Z, Melino G, Aqeilan RI. Negative regulation of the Hippo pathway by E3 ubiquitin ligase ITCH is sufficient to promote tumorigenicity. *Cancer Res*. 2011;71(5):2010-20.
64. Li W, Cooper J, Zhou L, Yang C, Erdjument-Bromage H, Zagzag D, et al. Merlin/NF2 loss-driven tumorigenesis linked to CRL4(DCAF1)-mediated inhibition of the hippo pathway kinases Lats1 and 2 in the nucleus. *Cancer cell*. 2014;26(1):48-60.
65. Ma B, Chen Y, Chen L, Cheng H, Mu C, Li J, et al. Hypoxia regulates Hippo signalling through the SIAH2 ubiquitin E3 ligase. *Nature cell biology*. 2015;17(1):95-103.
66. Bae SJ, Kim M, Kim SH, Kwon YE, Lee JH, Kim J, et al. NEDD4 controls intestinal stem cell homeostasis by regulating the Hippo signalling pathway. *Nat Commun*. 2015;6:6314.

- 67.Chen Q, Zhang N, Xie R, Wang W, Cai J, Choi KS, et al. Homeostatic control of Hippo signaling activity revealed by an endogenous activating mutation in YAP. *Genes & development*. 2015;29(12):1285-97.
- 68.Moroishi T, Park HW, Qin B, Chen Q, Meng Z, Plouffe SW, et al. A YAP/TAZ-induced feedback mechanism regulates Hippo pathway homeostasis. *Genes & development*. 2015;29(12):1271-84.
- 69.Gregorieff A, Liu Y, Inanlou MR, Khomchuk Y, Wrana JL. Yap-dependent reprogramming of Lgr5(+) stem cells drives intestinal regeneration and cancer. *Nature*. 2015;526(7575):715-8.
- 70.Mokalled MH, Patra C, Dickson AL, Endo T, Stainier DY, Poss KD. Injury-induced ctgfa directs glial bridging and spinal cord regeneration in zebrafish. *Science*. 2016;354(6312):630-4.
- 71.Pancieria T, Azzolin L, Fujimura A, Di Biagio D, Frasson C, Bresolin S, et al. Induction of Expandable Tissue-Specific Stem/Progenitor Cells through Transient Expression of YAP/TAZ. *Cell Stem Cell*. 2016;19(6):725-37.
- 72.Gong R, Yu FX. Targeting the Hippo Pathway for Anti-cancer Therapies. *Current medicinal chemistry*. 2015;22(35):4104-17.
- 73.Barker N. Adult intestinal stem cells: critical drivers of epithelial homeostasis and regeneration. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2014;15(1):19-33.
- 74.Barry ER, Morikawa T, Butler BL, Shrestha K, de la Rosa R, Yan KS, et al. Restriction of intestinal stem cell expansion and the regenerative response by YAP. *Nature*. 2013;493(7430):106-10.
- 75.Moroishi T, Hayashi T, Pan WW, Fujita Y, Holt MV, Qin J, et al. The Hippo Pathway Kinases LATS1/2 Suppress Cancer Immunity. *Cell*. 2016;167(6):1525-39 e17.
- 76.Lee DH, Park JO, Kim TS, Kim SK, Kim TH, Kim MC, et al. LATS-YAP/TAZ controls lineage specification by regulating TGFbeta signaling and Hnf4alpha expression during liver development. *Nat Commun*. 2016;7:11961.
- 77.Zhang N, Bai H, David KK, Dong J, Zheng Y, Cai J, et al. The Merlin/NF2 tumor suppressor functions through the YAP oncoprotein to regulate tissue homeostasis in mammals. *Developmental cell*. 2010;19(1):27-38.

78. Yi J, Lu L, Yanger K, Wang W, Sohn BH, Stanger BZ, et al. Large tumor suppressor homologs 1 and 2 regulate mouse liver progenitor cell proliferation and maturation through antagonism of the coactivators YAP and TAZ. *Hepatology*. 2016;64(5):1757-72.
79. Yimlamai D, Christodoulou C, Galli GG, Yanger K, Pepe-Mooney B, Gurung B, et al. Hippo pathway activity influences liver cell fate. *Cell*. 2014;157(6):1324-38.
80. Camargo FD, Gokhale S, Johnnidis JB, Fu D, Bell GW, Jaenisch R, et al. YAP1 increases organ size and expands undifferentiated progenitor cells. *Current biology : CB*. 2007;17(23):2054-60.
81. Porrello ER, Mahmoud AI, Simpson E, Hill JA, Richardson JA, Olson EN, et al. Transient regenerative potential of the neonatal mouse heart. *Science*. 2011;331(6020):1078-80.
82. Fialho AM, Salunkhe P, Manna S, Mahali S, Chakrabarty AM. Glioblastoma multiforme: novel therapeutic approaches. *ISRN neurology*. 2012;2012:642345.
83. Bond AM, Ming GL, Song H. Adult Mammalian Neural Stem Cells and Neurogenesis: Five Decades Later. *Cell Stem Cell*. 2015;17(4):385-95.
84. Huang Z, Hu J, Pan J, Wang Y, Hu G, Zhou J, et al. YAP stabilizes SMAD1 and promotes BMP2-induced neocortical astrocytic differentiation. *Development*. 2016;143(13):2398-409.
85. Cao X, Pfaff SL, Gage FH. YAP regulates neural progenitor cell number via the TEA domain transcription factor. *Genes & development*. 2008;22(23):3320-34.
86. Poitelon Y, Lopez-Anido C, Catignas K, Berti C, Palmisano M, Williamson C, et al. YAP and TAZ control peripheral myelination and the expression of laminin receptors in Schwann cells. *Nature neuroscience*. 2016;19(7):879-87.
87. Nye HL, Cameron JA, Chernoff EA, Stocum DL. Regeneration of the urodele limb: a review. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*. 2003;226(2):280-94.
88. Stocum DL. *Regenerative biology and medicine*. Amsterdam ; Boston: Elsevier Academic Press; 2006. x, 448 p. p.
89. Beck CW, Izpisua Belmonte JC, Christen B. Beyond early development: *Xenopus* as an emerging model for the study of regenerative mechanisms. *Developmental*

- dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists. 2009;238(6):1226-48.
- 90.Slack JM, Lin G, Chen Y. The *Xenopus* tadpole: a new model for regeneration research. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 2008;65(1):54-63.
- 91.Hayashi S, Ochi H, Ogino H, Kawasumi A, Kamei Y, Tamura K, et al. Transcriptional regulators in the Hippo signaling pathway control organ growth in *Xenopus* tadpole tail regeneration. *Dev Biol*. 2014;396(1):31-41.
- 92.Hayashi S, Tamura K, Yokoyama H. Yap1, transcription regulator in the Hippo signaling pathway, is required for *Xenopus* limb bud regeneration. *Dev Biol*. 2014;388(1):57-67.
- 93.Tanaka EM, Ferretti P. Considering the evolution of regeneration in the central nervous system. *Nature reviews Neuroscience*. 2009;10(10):713-23.
- 94.Varelas X, Miller BW, Sopko R, Song S, Gregorieff A, Fellouse FA, et al. The Hippo pathway regulates Wnt/beta-catenin signaling. *Developmental cell*. 2010;18(4):579-91.
- 95.Kovar H, Bierbaumer L, Radic-Sarikas B. The YAP/TAZ Pathway in Osteogenesis and Bone Sarcoma Pathogenesis. *Cells*. 2020;9(4).
- 96.Konsavage WM, Jr., Kyler SL, Rennoll SA, Jin G, Yochum GS. Wnt/beta-catenin signaling regulates Yes-associated protein (YAP) gene expression in colorectal carcinoma cells. *The Journal of biological chemistry*. 2012;287(15):11730-9.
- 97.Heallen T, Zhang M, Wang J, Bonilla-Claudio M, Klysik E, Johnson RL, et al. Hippo pathway inhibits Wnt signaling to restrain cardiomyocyte proliferation and heart size. *Science*. 2011;332(6028):458-61.
- 98.Lin G, Slack JM. Requirement for Wnt and FGF signaling in *Xenopus* tadpole tail regeneration. *Dev Biol*. 2008;316(2):323-35.
- 99.Fernandez LA, Northcott PA, Dalton J, Fraga C, Ellison D, Angers S, et al. YAP1 is amplified and up-regulated in hedgehog-associated medulloblastomas and mediates Sonic hedgehog-driven neural precursor proliferation. *Genes & development*. 2009;23(23):2729-41.
- 100.Kumar A, Godwin JW, Gates PB, Garza-Garcia AA, Brockes JP. Molecular basis for the nerve dependence of limb regeneration in an adult vertebrate. *Science*. 2007;318(5851):772-7.

- 101.Vieira WA, Wells KM, McCusker CD. Advancements to the Axolotl Model for Regeneration and Aging. *Gerontology*. 2019:1-11.
- 102.Petranka JW. Salamanders of the United States and Canada: Smithsonian Books; 2010.
- 103.Voss SR, Epperlein HH, Tanaka EM. *Ambystoma mexicanum*, the axolotl: a versatile amphibian model for regeneration, development, and evolution studies. *Cold Spring Harbor protocols*. 2009;2009(8):pdb emo128.
- 104.Schreckenber GM, Jacobson AG. Normal stages of development of the axolotl. *Ambystoma mexicanum*. *Dev Biol*. 1975;42(2):391-400.
- 105.Sobkow L, Epperlein HH, Herklotz S, Straube WL, Tanaka EM. A germline GFP transgenic axolotl and its use to track cell fate: dual origin of the fin mesenchyme during development and the fate of blood cells during regeneration. *Dev Biol*. 2006;290(2):386-97.
- 106.Haas BJ, Whited JL. Advances in Decoding Axolotl Limb Regeneration. *Trends in genetics : TIG*. 2017;33(8):553-65.
- 107.Bryant DM, Johnson K, DiTommaso T, Tickle T, Couger MB, Payzin-Dogru D, et al. A Tissue-Mapped Axolotl De Novo Transcriptome Enables Identification of Limb Regeneration Factors. *Cell reports*. 2017;18(3):762-76.
- 108.Whited JL, Tsai SL, Beier KT, White JN, Piekarski N, Hanken J, et al. Pseudotyped retroviruses for infecting axolotl in vivo and in vitro. *Development*. 2013;140(5):1137-46.
- 109.Carlson BM. Principles of regenerative biology. Amsterdam ; Burlington, Mass.: Elsevier/Academic Press; 2007. xix, 379 p. p.
- 110.Galliot B, Ghila L. Cell plasticity in homeostasis and regeneration. *Molecular reproduction and development*. 2010;77(10):837-55.
- 111.Mescher AL, Neff AW. Regenerative capacity and the developing immune system. *Advances in biochemical engineering/biotechnology*. 2005;93:39-66.
- 112.Godwin JW, Brockes JP. Regeneration, tissue injury and the immune response. *Journal of anatomy*. 2006;209(4):423-32.
- 113.Gilbert EA, Payne SL, Vickaryous MK. The anatomy and histology of caudal autotomy and regeneration in lizards. *Physiological and biochemical zoology : PBZ*. 2013;86(6):631-44.

114. Endo T, Bryant SV, Gardiner DM. A stepwise model system for limb regeneration. *Dev Biol.* 2004;270(1):135-45.
115. McCusker CD, Gardiner DM. Positional information is reprogrammed in blastema cells of the regenerating limb of the axolotl (*Ambystoma mexicanum*). *PLoS One.* 2013;8(9):e77064.
116. Ferris DR, Satoh A, Mandefro B, Cummings GM, Gardiner DM, Rugg EL. Ex vivo generation of a functional and regenerative wound epithelium from axolotl (*Ambystoma mexicanum*) skin. *Development, growth & differentiation.* 2010;52(8):715-24.
117. Tanner K, Ferris DR, Lanzano L, Mandefro B, Mantulin WW, Gardiner DM, et al. Coherent movement of cell layers during wound healing by image correlation spectroscopy. *Biophysical journal.* 2009;97(7):2098-106.
118. Godwin JW, Pinto AR, Rosenthal NA. Macrophages are required for adult salamander limb regeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2013;110(23):9415-20.
119. Vieira WA, Wells KM, Raymond MJ, De Souza L, Garcia E, McCusker CD. FGF, BMP, and RA signaling are sufficient for the induction of complete limb regeneration from non-regenerating wounds on *Ambystoma mexicanum* limbs. *Dev Biol.* 2019;451(2):146-57.
120. Iwata R, Makanae A, Satoh A. Stability and plasticity of positional memory during limb regeneration in *Ambystoma mexicanum*. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists.* 2020;249(3):342-53.
121. Nowoshilow S, Schloissnig S, Fei JF, Dahl A, Pang AWC, Pippel M, et al. The axolotl genome and the evolution of key tissue formation regulators. *Nature.* 2018;554(7690):50-5.
122. Monaghan JR, Stier AC, Michonneau F, Smith MD, Pasch B, Maden M, et al. Experimentally induced metamorphosis in axolotls reduces regenerative rate and fidelity. *Regeneration.* 2014;1(1):2-14.
123. Demircan T, Ovezmyradov G, Yildirim B, Keskin I, Ilhan AE, Fescioglu EC, et al. Experimentally induced metamorphosis in highly regenerative axolotl (*ambystoma mexicanum*) under constant diet restructures microbiota. *Sci Rep.* 2018;8(1):10974.

- 124.Sanor LD, Flowers GP, Crews CM. Multiplex CRISPR/Cas screen in regenerating haploid limbs of chimeric Axolotls. *eLife*. 2020;9.
- 125.Fei JF, Lou WP, Knapp D, Murawala P, Gerber T, Taniguchi Y, et al. Application and optimization of CRISPR-Cas9-mediated genome engineering in axolotl (*Ambystoma mexicanum*). *Nature protocols*. 2018;13(12):2908-43.
- 126.Bai X, Wang Y, Man L, Zhang Q, Sun C, Hu W, et al. CD59 mediates cartilage patterning during spontaneous tail regeneration. *Sci Rep*. 2015;5:12798.
- 127.Leigh ND, Sessa S, Dragalzew AC, Payzin-Dogru D, Sousa JF, Aggouras AN, et al. von Willebrand factor D and EGF domains is an evolutionarily conserved and required feature of blastemas capable of multitissue appendage regeneration. *Evolution & development*. 2020.
- 128.Wilbie D, Walther J, Mastrobattista E. Delivery Aspects of CRISPR/Cas for in Vivo Genome Editing. *Accounts of chemical research*. 2019;52(6):1555-64.
- 129.Ablain J, Zon L. Tissue-specific gene targeting using CRISPR/Cas9. *Methods in cell biology*. 135: Elsevier; 2016. p. 189-202.
- 130.Norris A, Streit A. Morpholinos: studying gene function in the chick. *Methods*. 2014;66(3):454-65.
- 131.Blum M, De Robertis EM, Wallingford JB, Niehrs C. Morpholinos: Antisense and Sensibility. *Developmental cell*. 2015;35(2):145-9.
- 132.Summerton JE. Morpholino, siRNA, and S-DNA compared: impact of structure and mechanism of action on off-target effects and sequence specificity. *Current topics in medicinal chemistry*. 2007;7(7):651-60.
- 133.Coots PS, Seifert AW. Thyroxine-induced metamorphosis in the axolotl (*Ambystoma mexicanum*). *Methods Mol Biol*. 2015;1290:141-5.
- 134.Kragl M, Tanaka EM. Axolotl (*Ambystoma mexicanum*) limb and tail amputation. *Cold Spring Harbor protocols*. 2009;2009(8):pdb prot5267.
- 135.Wong ML, Medrano JF. Real-time PCR for mRNA quantitation. *BioTechniques*. 2005;39(1):75-85.
- 136.Sader F, Denis JF, Laref H, Roy S. Epithelial to mesenchymal transition is mediated by both TGF-beta canonical and non-canonical signaling during axolotl limb regeneration. *Sci Rep*. 2019;9(1):1144.

- 137.Cevik O, Baykal AT, Sener A. Platelets Proteomic Profiles of Acute Ischemic Stroke Patients. *PLoS One*. 2016;11(6):e0158287.
- 138.Distler U, Kuharev J, Navarro P, Levin Y, Schild H, Tenzer S. Drift time-specific collision energies enable deep-coverage data-independent acquisition proteomics. *Nat Methods*. 2014;11(2):167-70.
- 139.Huber W, Carey VJ, Gentleman R, Anders S, Carlson M, Carvalho BS, et al. Orchestrating high-throughput genomic analysis with Bioconductor. *Nat Methods*. 2015;12(2):115-21.
- 140.Team RC. R: A language and environment for statistical computing. 2013.
- 141.Vartanian A, Agnihotri S, Wilson MR, Burrell KE, Tonge PD, Alamsahebpour A, et al. Targeting hexokinase 2 enhances response to radio-chemotherapy in glioblastoma. *Oncotarget*. 2016;7(43):69518-35.
- 142.Wada K, Itoga K, Okano T, Yonemura S, Sasaki H. Hippo pathway regulation by cell morphology and stress fibers. *Development*. 2011;138(18):3907-14.
- 143.Naryzhny SN, Lee H. Proliferating cell nuclear antigen in the cytoplasm interacts with components of glycolysis and cancer. *FEBS letters*. 2010;584(20):4292-8.
- 144.Ohayon D, De Chiara A, Chapuis N, Candalh C, Mocek J, Ribeil JA, et al. Cytoplasmic proliferating cell nuclear antigen connects glycolysis and cell survival in acute myeloid leukemia. *Sci Rep*. 2016;6:35561.
- 145.Bertini E, Oka T, Sudol M, Strano S, Blandino G. YAP At the crossroad between transformation and tumor suppression. *Cell Cycle*. 2009;8(1):49-57.
- 146.Sugihara T, Werneburg NW, Hernandez MC, Yang L, Kabashima A, Hirsova P, et al. YAP Tyrosine Phosphorylation and Nuclear Localization in Cholangiocarcinoma Cells Are Regulated by LCK and Independent of LATS Activity. *Mol Cancer Res*. 2018;16(10):1556-67.
- 147.Baddour JA, Sousounis K, Tsonis PA. Organ repair and regeneration: an overview. *Birth Defects Res C Embryo Today*. 2012;96(1):1-29.
- 148.Shergalis A, Bankhead A, 3rd, Luesakul U, Muangsin N, Neamati N. Current Challenges and Opportunities in Treating Glioblastoma. *Pharmacol Rev*. 2018;70(3):412-45.
- 149.Maden M. The evolution of regeneration - where does that leave mammals? *Int J Dev Biol*. 2018;62(6-7-8):369-72.

150. Seifert AW, Muneoka K. The blastema and epimorphic regeneration in mammals. *Dev Biol.* 2018;433(2):190-9.
151. Rognoni E, Walko G. The Roles of YAP/TAZ and the Hippo Pathway in Healthy and Diseased Skin. *Cells.* 2019;8(5).
152. Whited JL, Lehoczy JA, Tabin CJ. Inducible genetic system for the axolotl. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2012;109(34):13662-7.



9. ETİK KURUL ONAYI



T.C.
İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı

E-İmzalıdır

Sayı : 38828770-604.01.01-E.14550
Konu : Etik Kurulu Kararı

29/04/2019

Sayın Sadık BAY

Üniversitemiz Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kuruluna yapmış olduğunuz "Hippo Yolağının Aksolotl Kol Yenilenmesindeki Rolü" isimli başvurunuz incelenmiş olup, etik kurulu kararı ekte sunulmuştur.

Bilgilerinize rica ederim.

Prof. Dr. Hanefi ÖZBEK
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu
(İMÜ-HADYEK) Başkanı

Ek:
-Karar Formu (1 sayfa)

Bu belge 5070 sayılı e-İmza Kanununa göre Prof. Dr. Hanefi ÖZBEK tarafından 29.04.2019 tarihinde e-İmzalanmıştır.
Evrakınızı <https://ebys.medipol.edu.tr/e-imza> linkinden 35D0252CX1 kodu ile doğrulayabilirsiniz.

İstanbul Medipol Üniversitesi
Kavaçık Mah. Ekinçler Cad. No.19 Kavaçık Kavşağı - Beykoz
34810 İstanbul

Tel: 444 85 44
İnternet: www.medipol.edu.tr
Ayrıntılı Bilgi İçin : bilgi@medipol.edu.tr



T.C.
İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (İmü-Hadyek)

Toplantı Tarihi	Karar No	İlgi	Proje
24/04/2019	19		S

“Hippo Yolağının Aksolotl Kol Yenilenmesindeki Rolü” başlıklı kurulumuzda görüşülmüş olup, çalışmanın etik kurallara uygun olduğu karar verilmiştir.

Etik Onay Geçerlilik Süresi: 01.06.19 – 01.06.20- 1 YIL

GÖREVİ	ADI SOYADI
Başkan	Prof. Dr. Hanefi ÖZBEK
Üye	Dr. Öğr. Üyesi Turan DEMİRCAN
Üye	Dr. Öğr. Üyesi Sultan Sibel ERDEM
Üye	Dr. Öğr. Üyesi Mehmet OZANSOY
Üye	Dr. Öğr. Üyesi Taha KELEŞTEMUR
Üye	Uzm.Vet. Hek. Ekrem Musa ÖZDEMİR
Üye	Cem GÜNEŞ
Üye	Burak Sefa DERİBAŞ