

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**PURİNERJİK RESEPTÖRLER İLE
WNT/ β -KATENİN SİNYAL YOLAĞI
ARASINDAKİ İLİŞKİSİNİN ZEBRABALIĞI
MODELİNDE ARAŞTIRILMASI**

İSMAİL KÜÇÜKAYLAK

TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK
YÜKSEK LİSANS TEZİ

İZMİR – 2017

TEZ KODU: DEU.HSI.MSC-2014970103

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**PURİNERJİK RESEPTÖRLER İLE
WNT/ β -KATENİN SİNYAL YOLAĞI
ARASINDAKİ İLİŞKİSİNİN ZEBRABALIĞI
MODELİNDE ARAŞTIRILMASI**

TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK
YÜKSEK LİSANS TEZİ

İSMAİL KÜÇÜKAYLAK

Danışman Öğretim Üyesi: Doç. Dr. Güneş Özhan

Bu araştırma TÜBİTAK tarafından 114Z192 ve 215Z365 numaralı projeler ile desteklenmiştir.

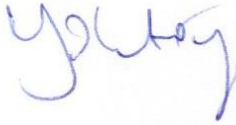
TEZ KODU: DEU.HSI.MSc-2014970103

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Yüksek Lisans programı öğrencisi İsmail Küçükaylak '**Purinerjik Reseptörler ile Wnt/ β -katenin Sinyal Yolu Arasındaki İlişkinin Zebrabalığı Modelinde Araştırılması**' konulu Yüksek Lisans tezini 5 Haziran 2017 tarihinde başarılı olarak tamamlamıştır.



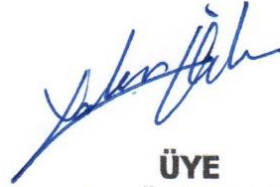
BAŞKAN

Doç. Dr. Güneş Özhan
Dokuz Eylül Üniversitesi
Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı



ÜYE

Yrd. Doç. Dr. Yavuz Oktay
Dokuz Eylül Üniversitesi
Tıbbi Biyoloji ve Genetik
Anabilim Dalı



ÜYE

Yrd. Doç. Dr. Özden Yalçın Özuysal
İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü
Moleküler Biyoloji ve Genetik
Anabilim Dalı

YEDEK ÜYE

Yrd. Doç. Dr. Şerif Şentürk
Dokuz Eylül Üniversitesi
Tıbbi Biyoloji ve Genetik
Anabilim Dalı

YEDEK ÜYE

Yrd. Doç. Dr. Gülistan Meşe Özçivici
İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü
Moleküler Biyoloji ve Genetik
Anabilim Dalı

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER	i
TABLolar DİZİNİ	v
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vi
KISALTMALAR	viii
TEŞEKKÜR	x
ÖZET	1
ABSTRACT	3
1. GİRİŞ VE AMAÇ	5
2. GENEL BİLGİLER	7
2.1. Wnt Sinyal İletim Yolağı	7
2.1.1. β -katenin-bağımlı Sinyal İletim Yolağı.....	8
2.1.2. β -katenin-bağımsız Sinyal İletim Yolağı	12
2.1.3. Wnt Sinyal İletim Yolağı Düzenleyicileri	13
2.2. Wnt Sinyal İletim Yolağı ve Rejenerasyon.....	14
2.3. Purinerjik Sinyal İletim Yolağı	15
2.3.1. P2X Pürinerjik Reseptörleri	16
2.4. Model Organizma Olarak Zebrabalığı	18
3. GEREÇ VE YÖNTEM	19
3.1. Araştırmanın Tipi	19
3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı.....	19
3.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi	19
3.4. Çalışma Materyali.....	19
3.5. Araştırmanın Değişkenleri.....	19
3.6. Veri Toplama Araçları.....	20
3.6.1. Malzeme ve Cihazlar	20
3.6.2. Besi Yeri ve Solüsyonlar	23
3.6.3. Yöntemler	28
3.6.3.1. Primer Dizaynı	28
3.6.3.2. Balıkların Çiftleştirilmesi ve Embryoların Toplanması	29
3.6.3.3. RNA İzolasyonu	30
3.6.3.3.1 Zymo Research Direct-zol™ RNA MiniPrep Kiti ile İzolasyon	30

3.6.3.3.2 Manual RNA İzolasyonu	30
3.6.3.4. Revers Transkriptaz (RT) Polimeraz Zincir Reaksiyonu	31
3.6.3.5. Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu	32
3.6.3.6. Klonlama	32
3.6.3.6.1. Primer Dizaynı	32
3.6.3.6.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu	34
3.6.3.6.3. Restriksiyon Enzimleri ile Kesim	35
3.6.3.6.4. Ligasyon	35
3.6.3.6.5. Transformasyon	36
3.6.3.6.6. Tek Koloni Seçimi ve Plasmid İzolasyonu	36
3.6.3.6.6.1. Manuel Plasmid İzolasyonu	37
3.6.3.7. Hücre Kültürü	38
3.6.3.7.1. Hücrelerin Açılması	38
3.6.3.7.2. Hücrelerin Pasajlanması	38
3.6.3.7.3. Hücre Sayımı	39
3.6.3.7.4. Hücrelerin Dondurulması	39
3.6.3.7.5. Wnt3a Koşullu Ortamının Hazırlanması	40
3.6.3.8. Lüsiferaz Raportör Analizi	41
3.6.3.8.1. Transfeksiyon	41
3.6.3.8.2. Wnt3a Koşullu Ortam ile İndüksiyon	42
3.6.3.8.3. Lüminometrik Analiz	42
3.6.3.9. RNA Prob Sentezi	42
3.6.3.10. In Situ Hibridizasyon	44
3.6.3.11. Mikroenjeksiyon	47
3.6.3.12. İn vitro transkripsiyon	48
3.6.3.13. TA Klonlama	48
3.6.3.14. Dokun – Uyar (Touch – Evoke) Deneyi	50
3.6.3.15. Larvaların Kuyruk Yüzgeçlerinin Kesilmesi	50
3.6.3.16. Faloidin Boyaması	51
3.6.3.17. Gateway Klonlama Yöntemi	51
3.6.3.17.1. Primer Dizaynı ve PZR	52
3.6.3.17.2. BP reaksiyonu	54

3.6.3.17.3. LR Reaksiyonu	55
3.7. Araştırma Planı ve Takvim	57
3.8. Verilerin Değerlendirilmesi	58
3.9. Araştırmanın Sınırlılıkları	58
3.10. Etik Kurul Onayı	58
4. BULGULAR	59
4.1. Yeni Nesil RNA Dizileme Verileri Sonucu Aday Genlerin Seçilmesi	59
4.2. Wnt/ β -katenin sinyal iletim yolağının zebrabalığı <i>p2rx8</i> geni ekspresyonu üzerindeki etkisine q-PCR ile bakılması	60
4.3. Zebrabalığı <i>p2rx8</i> , <i>p2rx5</i> ve insan ortologu <i>p2rx5</i> genlerinin klonlanması	61
4.4. Lüsiferaz Raportör Analizi	64
4.4.1. HEK293T hücrelerinde z_ <i>p2rx8</i> , z_ <i>p2rx5</i> ve h_ <i>p2rx5</i> aşırı ekspresyonu ve Wnt3a koşullu ortam ile indüklenmesi	64
4.4.1. SH-SY5Y hücrelerinde z_ <i>p2rx8</i> , z_ <i>p2rx5</i> ve h_ <i>p2rx5</i> aşırı ekspresyonu ve Wnt3a koşullu ortam ile indüklenmesi	65
4.5. Zebrabalığı <i>p2rx5</i> geninin gelişimsel süreçte ekspresyonu ve rolü	66
4.5.1. Zebrabalığı <i>p2rx5</i> geninin gelişimsel süreçte ekspresyonu	66
4.5.2. Wnt/ β -katenin sinyal iletim yolağının zebrabalığı <i>p2rx5</i> geni üzerinde etkisi	66
4.5.3. Zebrabalığı <i>p2rx5</i> geninin Wnt/ β -katenin sinyal iletim yolağı üzerinde etkisi	67
4.5.4. Zebrabalığı <i>p2rx5</i> geninin aşırı ekspresyonu nöroektodermal paterni anteriorlaştırması	68
4.5.5. Zebrabalığı <i>p2rx5</i> geninin aşırı ekspresyonunun somit oluşumunda etkisi	69
4.5.6. Zebrabalığı <i>p2rx5</i> geninin aşırı ekspresyonunun kas oluşumunda etkisi	70
4.5.7. Zebrabalığı <i>p2rx5</i> geninin aşırı ekspresyonunun yüzme yeteneği üzerinde etkisi	71
4.6. Tüm Tanımlanmış Zebrabalığı P2X Genlerinin Klonlanması	72
4.7. P2X Genlerinin Wnt/ β -katenin sinyal iletim yolağı üzerinde etkisi	73
4.7.1. HEK293T hücrelerinde P2X genlerinin aşırı ekspresyonu ve Wnt3a koşullu ortam ile indüklenmesi	73
4.7.2. Zebrabalığı P2X genlerinin Wnt/ β -katenin sinyal iletim yolağı üzerinde etkisi	74
4.8. Tüm Tanımlanmış Zebrabalığı P2X Genlerinin Kuyruk Rejenerasyonu Sırasında Rolü	75
4.9. Transgenik Zebrabalığı Üretimi	77

5. TARTIŞMA	78
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	81
7. KAYNAKLAR	82
8. EKLER.....	92
8.1. Etik Kurul Raporu.....	92
8.2. Özgeçmiş	93



TABLÖLAR DİZİNİ

	Sayfa No
Tablo 1. Araştırmada kullanılan kimyasal, reaktif ve kitlerin listesi.....	20
Tablo 2. Araştırmada kullanılan ekipmanların listesi.....	22
Tablo 3. Kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu için primerler.....	28
Tablo 4. Klonlama için kullanılan primerler.....	32
Tablo 5. Embriyoların Proteinaz K ile inkübasyon zamanları.....	45
Tablo 6. Gateway klonlama yönteminde kullanılan primerler.....	52

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1. β -katenin-bağımlı sinyal iletim yolağı.....	10
Şekil 2. β -katenin-bağımsız sinyal iletim yolağı.....	13
Şekil 3. Purinerjik sinyal iletimi.....	16
Şekil 4. Tek hücreli zebrabalığı embriyosuna mikroenjeksiyon gösterimi ve agar tabaka.....	47
Şekil 5. Zebrabalığı larvaları kuyruklarının kesiminin şematik gösterimi.....	50
Şekil 6. BP reaksiyonu şematik gösterimi.....	54
Şekil 7. LR reaksiyonu şematik gösterimi.....	55
Şekil 8. Wnt/ β -katenin sinyal iletim yolağının ısı şoku transgenik embriyolarında fonksiyon kazanımı ve kaybı ile manipule edilmesi.....	59
Şekil 9. Yeni nesil RNA dizileme verileri sonucu Wnt sinyal iletim yolağının bir çok bilinen geribildirim düzenleyicilerinin bulunması.....	60
Şekil 10. q-PCR yöntemi ile <i>p2rx8</i> geninin ekspresyon değişimi analizi.....	61
Şekil 11. Klonlanan genlerin haritaları.....	62
Şekil 12. Klonlama stratejisi.....	63
Şekil 13. HEK293T hücrelerinde <i>z_p2rx8</i> , <i>z_p2rx5</i> ve <i>h_p2rx5</i> genlerinin aşırı ekspresyonu ve Wnt aktivasyonu üzerinde etkisine lusiferaz raportör analizi ile bakılması.....	64
Şekil 14. SH-SY5Y hücrelerinde <i>z_p2rx8</i> , <i>z_p2rx5</i> ve <i>h_p2rx5</i> genlerinin aşırı ekspresyonu ve Wnt aktivasyonu üzerinde etkisine lusiferaz raportör analizi ile bakılması.....	65
Şekil 15. Zebrabalığı <i>p2rx5</i> geninin gelişimsel süreçte ekspresyonuna in situ hibridizasyon tekniği ile bakılması.....	66

Şekil 16. Wnt/ β -katenin sinyal iletim yolağının fonksiyon kaybı ile manipule edilmesi sonucu embriyolarda zebrabalığı <i>p2rx5</i> geni ekspresyonuna in sitü hibridizasyon tekniği ile bakılması.....	67
Şekil 17. (A) Wnt/ β -katenin sinyal iletim yolağı raportör transgeniğinin şematik gösterimi, (B) GFP ya da <i>z_p2rx5</i> aşırı eksprese edildiğinde Wnt/ β -katenin sinyal iletim yolağının aktivitesine in sitü hibridizasyon tekniği ile bakılması.....	68
Şekil 18. GFP ya da <i>z_p2rx5</i> aşırı eksprese edildiğinde nöroektodermal belirteçlere in sitü hibridizasyon tekniği ile bakılması.....	69
Şekil 19. GFP ya da <i>z_p2rx5</i> aşırı eksprese edildiğinde gelişimsel belirteçlere in sitü hibridizasyon tekniği ile bakılması.....	70
Şekil 20. GFP ya da <i>z_p2rx5</i> aşırı eksprese edildiğinde faloidin boyaması ile kaslara bakılması.....	71
Şekil 21. GFP ya da <i>z_p2rx5</i> aşırı eksprese edildiğinde yüzme yeteneklerinin karşılaştırılması.....	72
Şekil 22. Klonlanan genlerin haritaları.....	73
Şekil 23. HEK293T hücrelerinde zebrabalığı P2X genlerinin aşırı ekspresyonu ve Wnt aktivasyonu üzerinde etkisine lusiferaz raportör analizi ile bakılması.....	74
Şekil 24. GFP ya da P2X genleri aşırı eksprese edildiğinde Wnt/ β -katenin sinyal iletim yolağının aktivitesine in sitü hibridizasyon tekniği ile bakılması.....	75
Şekil 25. P2X reseptörlerinin larva kuyruk rejenerasyonundaki rolü.....	76
Şekil 26. Transgenik zebrabalığı belirteci <i>cm/lc2:EGFP</i> gösterimi.....	77

KISALTMALAR

ADP: Adenosine 5'-diphosphate

APC: Adenomatosis polyposis coli

ATP: Adenosine 5'-triphosphate

CAMKII: Ca²⁺/calmodulin-bağımlı protein kinaz II

CK1α: Kasein kinaz 1α

CK2: Kasein kinaz 2

CNS: Merkezi sinir sistemi

DKK: Dickkopf proteinleri

ER: Endoplazmik retikulum

FRET: Flöresan rezonans enerji transfer

GPCR: G protein-eşleşmiş reseptör

GSK3: Glikojen sentaz kinaz

HEK: İnsan embriyonik böbrek hücresi

ISH: İn sitü hibridizasyon

LEF: Lenfoid çoğaltan- bağlanma faktörü

NFAT: Aktive T hücrelerin nükleer faktörü

PCP: Düzlemsel hücre kutuplaşması

PKA: Siklik AMP-bağımlı protein kinaz

PKC: Protein kinaz C

PZR: Polimeraz zincir reaksiyonu

RB: Rohon-Beard

RNF43: E3 ligaz Ring finger protein 3

RSPO: R-spondin

SH-SY5Y: İnsan nöroblastoma hücresi

SOST: Sclerostin

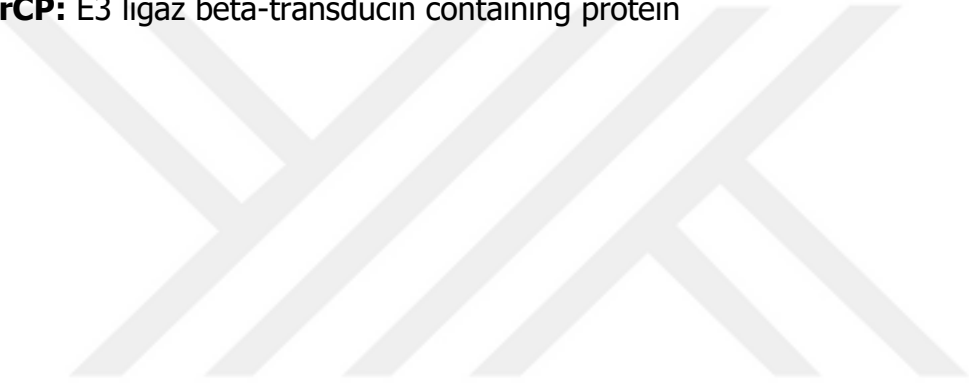
TCF: T hücresi faktörü

Wg: Wingless

Wise: Yüzey ektodermdeki Wnt modulatörleri

ZNFR3: Zin ve ring finger 3

β -TrCP: E3 ligaz beta-transducin containing protein



TEŞEKKÜR

İlk olarak, en derin minnettarlığımı danışman öğretmenim Doç. Dr. Güneş Özhan'a sunmak isterim. Yüksek lisans eğitimim boyunca bilimsel anlamda rehberliğinin yanı sıra bir arkadaş olarak da dertlerimizi dinleyip yol gösterdiği, laboratuvara geldiğim ilk günden itibaren bir aile gibi hissettirdiği, akademik alanda kendimi geliştirmemi ve yeni teknikler öğrenmem konusunda destekleri, bizimle çalışırken gösterdiği sabrı için sevgi ve teşekkürlerimi iletirim.

Laboratuvar ailemizin diğer üyesi, yüksek lisans eğitimim boyunca yaptığım tüm deneylerde rehberliği ve desteği için Dr. Gülçin Çakan Akdoğan'a teşekkür ederim. Karşılaştığımız tüm sorunlarda büyük bir sabırla bilgilerini bize aktardığı ve yardımları için minnetlerimi sunarım.

Yüksek lisans eğitimime aynı saatte başladığım ve büyük olasılıkla aynı saatte bitireceğim, arkadaşım Betül Haykır'a teşekkür ederim. Onunla birlikte çalışmak, karşılaştığımız problemleri yaratıcı fikirlerle çözmek yüksek lisans eğitimimin çok daha mutlu geçmesini sağladı. Ayrıca, aramıza daha sonra katılan Dr. Ansarullah'a hem laboratuvar içinde hem de dışında bir ağabey gibi rehberliği için teşekkür ederim. Diğer laboratuvar arkadaşlarım, Aslı Kartal, Yağmur Azbazdar, Esra Katkat ve Yeliz Demirci'ye ayrıca teşekkürlerimi sunmak isterim.

Yeni sahip olduğum bir diğer aile, kan bağımlı olmadan kardeşlerim olan, her anımda destekleri için Ezgi Bağırsakçı, Aybike Erdoğan, Dehan Çömez, Hamdullah Yanık'a içten teşekkürlerimi sunarım. Özellikle Ataberk Özcan'a hayatıma kattığı değerler için teşekkür ederim.

Son olarak ama tüm teşekkürlerin de üstünde, bana gösterdikleri sürekli sevgileri ve destekleri için anne ve babama en özel ve içten teşekkürlerimi sunmak isterim.

PURİNERJİK RESEPTÖRLER İLE WNT/ β -KATENİN SİNYAL YOLAĞI ARASINDAKİ İLİŞKİSİNİN ZEBRABALIĞI MODELİNDE ARAŞTIRILMASI

**İsmail Küçükaylak, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji ve Genetik
Anabilim Dalı, Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Yerleşkesi Balçova 35340
İzmir/Türkiye**

kucukaylakismail@gmail.com

ÖZET

Wnt/ β -katenin sinyal iletim yolağı, gelişimde, nöral büyüme, diferansiyasyonda ve rejenerasyonda önemli rollere sahiptir. Dolayısıyla, yolağın hatalı işleyişi pek çok kanser türüyle, kalıtsal hastalıkla ve nörodejeneratif bozuklukla ilişkilendirilmiştir. Bir çok çalışma yolak bileşenlerini aydınlatmasına rağmen yolağın ayrıntılı regülasyonu hala tam olarak bilinmemektedir. Wnt sinyal iletim mekanizmalarının ayrıntılı araştırılması yolağın hastalık oluşumundaki rollerini aydınlatacaktır.

Bu çalışmada, sinaptik iletimde ve rejenerasyonda önemli rolleri olduğu bilinen purinerjik reseptörlerin Wnt/ β -katenin yolağı ile bağlantısı araştırılmıştır. Yeni nesil RNA dizileme verileri arasından seçilen aday Wnt/ β -katenin sinyal iletim yolağı hedef genleri olan zebrabalığı *p2rx8* ve *p2rx5* genlerinin gelişimsel süreçte rolleri araştırılarak *p2rx5* geninin aşırı eksprese edildiğinde Wnt/ β -katenin sinyal iletim yolağı aktivitesini engellediği ve gelişim sırasında somit oluşumu için gerekli olduğu tespit edilmiştir.

Ardından tüm tanımlanmış P2X purinerjik reseptörlerinin aşırı ekspresyonunun Wnt/ β -katenin sinyal iletim yolağı üzerindeki etkisi araştırılmış ve *p2rx1*, *p2rx3a*, *p2rx5*, *p2rx7* genlerinin Wnt/ β -katenin sinyal iletim yolağı aktivitesini engellediği hem zebrabalığı embriyolarında hem de iki farklı insan hücre hattında gösterilmiştir. Son olarak, purinerjik reseptörler ile Wnt/ β -katenin sinyal iletim yolağı arasındaki ilişkinin erişkin zebrabalığı kuyruk rejenerasyonunda incelenmesi için *Tg(hsp70l:p2rx3a:EGFP)* ve *Tg(hsp70l:p2rx7:EGFP)* transgenik balıkları üretilmeye başlanmıştır.

Bu çalışmayla birlikte nörodejeneratif hastalıklarda önemli rolleri olan purinerjik reseptörler ile Wnt/ β -katenin sinyal iletim yolağı arasındaki ilişki, önemli bir rejenerasyon modeli olan zebrabalığında araştırılmış ve purinerjik reseptörlerin Wnt/ β -katenin sinyal iletim yolağı hedef genleri olduğu ve purinerjik reseptörlerin de geri bildirim yoluyla Wnt/ β -katenin sinyal iletim yolağını düzenlediği gösterilmiştir. Bu bulgular ile Alzheimer gibi nörodejeneratif hastalıkların mekanizmalarının anlaşılmasına ve hedeflenen tedavilerin geliştirilmesine katkı sağlanması hedeflenmiştir.

Anahtar kelimeler: Wnt/ β -katenin sinyal iletim yolağı, P2X reseptörleri, Zebrabalığı, Rejenerasyon

CHARACTERIZATION OF THE INTERACTION OF A PURINERGIC RECEPTOR IN
REGULATION OF WNT/ β -CATENIN SIGNALING PATHWAY USING ZEBRAFISH MODEL

**İsmail Küçükaylak, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji ve Genetik
Anabilim Dalı, Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Yerleşkesi Balçova 35340
İzmir/Türkiye**

kucukaylakismail@gmail.com

ABSTRACT

Wnt/ β -catenin signalling pathway has essential roles in development, neural growth, differentiation and regeneration. Therefore, malfunctioning in the pathway has been associated with different types of cancer, genetic diseases and neurodegenerative disorders. Although most studies enlighten the pathway components, there are still unknown about its detailed regulation. Detailed research about Wnt signalling pathway and its mechanism will reveal pathway's critical roles in diseases.

In our studies, the interaction between Wnt/ β -catenin signalling pathway and purinergic receptors, which their significant role is known in synaptic transmission and regeneration, is investigated. Zebrafish *p2rx8* and *p2rx5* genes, which are chosen candidates from RNA sequencing data for regulation of Wnt/ β -catenin signalling pathway, were investigated in development. It was observed that Wnt/ β -catenin signalling pathway is inhibited when zebrafish *p2rx5* gene is overexpressed and it is necessary for proper somitogenesis during the development.

Then, all identified P2X purinergic receptors were investigated and it was observed that overexpression of *p2rx1*, *p2rx3a*, *p2rx5*, *p2rx7* genes inhibits Wnt/ β -catenin signalling pathway activity in both embryos and cell culture. Lastly, we started to generate *Tg(hsp70l:p2rx3a:EGFP)* and *Tg(hsp70l:p2rx7:EGFP)* transgenic zebrafish lines in order to investigate the interaction between Wnt/ β -catenin signalling pathway and purinergic receptors in zebrafish caudal fin regeneration.

Our study demonstrated that purinergic receptors, associated with their important roles in neurodegenerative diseases, are novel targets of Wnt/ β -catenin signalling pathway and they also act as a negative feedback regulator. We aimed with this findings to contribute to understand better the mechanism of neurodegenerative diseases such as Alzheimer and develop new therapies.

Keywords: Wnt/ β -catenin signalling pathway, P2X receptors, Zebrafish, Regeneration



1. GİRİŞ VE AMAÇ

Wnt sinyal iletim yolağının düzgün kontrol edilememesi durumunda gelişimsel bozukluklar, kanser, dejeneratif ve metabolik hastalıklar görülür. Ayrıca, Wnt sinyal iletim yolağı rejenerasyon sırasında da önemli sinyal yollarından bir tanesidir. Wnt sinyal yollarından en iyi anlaşılmış olan Wnt/ β -katenin sinyal iletim yolağıdır. Bu yolak, homeostatik aralık içinde, hücre kaderini, bölünmeyi, kök hücrelerin ve progenitör hücrelerin kendilerini yenilemesini düzenler. Son zamanlarda yapılan çalışmalar moleküler mekanizmaları daha da açığa kavuşturmasına rağmen sinyal iletiminin düzenlenmesine ilişkin yanıtlanamamış sorular vardır. Bu nedenle, ilişkili hastalıkların hedeflenen tedavisi henüz mümkün değildir. Wnt/ β -katenin sinyal iletim yolağının ayrıntılı olarak araştırılması hastalık mekanizmalarının anlaşılmasına ve hedeflenen tedavilerin geliştirilmesine katkı sağlayacaktır.

Purinerjik reseptörler (purinoseptörler) hemen her memeli dokusunda bulunan plazma membran molekülleri ailesi üyeleridir. Genel olarak öğrenme, hafıza, lokomotor ve beslenme davranışı ve uyku ile bağlantısı olduğu düşünülen purinoseptörler, nöral kök hücrelerin proliferasyonu ve migrasyonu, vasküler reaktivite, apoptoz ve sitokin salgılanması gibi birçok hücre fonksiyonu ile ilişkilendirilmiştir.

Purinerjik reseptörler, aktivasyon prensiplerine ve yapısal özelliklerine göre üç gruba ayrılmaktadır: P1, P2X ve P2Y reseptörleri. P1 ve P2Y grupları G-protein-eşleşmiş reseptörlerden oluşurken P2X grubu reseptörler ligand-kapılı iyon kanallarıdır. P1 grubunun adenosin ile P2 grubunun ise nükleotidler (ATP/ADP veya UTP/UDP) ile aktive olduğu bilinmektedir.

Zebrabalığının model organizma olarak kullanılması hızla yayılan ve omurgalı gelişimini anlamak için çok değerli model sistemlerden biridir. Vücut uzantılarının rejenerasyonu hakkındaki bilgilerin çoğu zebrabalığı gibi canlılardan gelmektedir. Zebrabalığı kuyruk rejenerasyonunda, bir çok Wnt ligandı ekspresyonu, β -katenin hedef genleri ve transgenik raportörlerinin transkripsiyonel aktivitesi artar. Wnt sinyal iletim yolağı inhibe edildiğinde zebrabalığı kuyruk rejenerasyonunun engellenmesine

ek olarak, β -katenin sinyal iletim yolağı aktive edildiğinde uzuv rejenerasyonunun güçlenir.

Bu çalışmada, purinerjik reseptörler ile Wnt/ β -katenin sinyal iletim yolağı arasındaki ilişkisinin zebrabalığı modelinde araştırılması ve yolağın düzenlenmesindeki potansiyel rollerinin zebrabalığı embriyolarında ve memeli hücre kültüründe moleküler düzeyde karakterize edilmesi amaçlanmıştır.

Çalışmanın amaçları sırasıyla şunlardır:

Amaç 1: Purinerjik reseptörlerin Wnt hedef genleri olarak doğrulanması

Amaç 2: Purinerjik reseptörler ile Wnt/ β -katenin yolağı arasındaki ilişkinin araştırılması

Amaç 3: Wnt/ β -katenin yolağının aktivasyonunun ya da inhibisyonunun purinerjik reseptörler üzerindeki etkisinin araştırılması

Amaç 4: Purinerjik reseptör fonksiyonunun araştırılması

Amaç 5: Purinerjik sinyal iletiminin kuyruk rejenerasyonu sürecindeki aktivasyonunun araştırılması

Amaç 6: Transgenik balık üretimi

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Wnt Sinyal İletim Yolağı

İlk olarak Int-1 olarak adlandırılan Wnt1, meme kanserlerinde fare memeli tümör virusü için entegrasyon bölgesi olarak tanımlandı [1]. Ardından, Wnt1'in *Drosophila* memeli homologu bulundu ve wingless (wg) olarak adlandırıldı [2]. *Wg* mutant sinek embriyolarında düzgün kanat gelişiminin olmaması gibi önemli eksiklikler görüldü ve bu fenotip glikojen sentaz kinaz (GSK3), Dishevelled ve β -katenin eksikliklerinde görülen fenotiplerle benzerlik gösterdi. Sonraki deneylerle, bu genlerin gelişim için gerekli sinyal yolaklarından biri olduğu anlaşıldı [3, 4] ve wg ve Int-1 isimlerinden esinlenerek Wnt sinyal iletim yolağı olarak adlandırıldı [5]. Aynı zamanlarda adenomatosis polyposis coli (APC)'nin de β -katenin ile etkileşimi olduğu bulundu [6].

Wnt sinyal iletim yolağı süngerlerden insanlara kadar çok hücreli organizmalarda aksiller oluşumu düzenler [7, 8]. Doku döngüsünde ve hasar ya da zarar verildiğinde, Wnt sinyal iletim yolağı normal vücudun ya da dokunun tekrar oluşmasını düzenler ve yaşam boyunca önemli roller üstlenir [9].

Wnt proteinleri gelişim sürecinde ve erişkinlikte çeşitli süreçleri düzenleyen, reseptör aracılı sinyal yolaklarında ligand olarak görev alan oldukça korunmuş glikoproteinlerdir [10, 11]. Wnt sinyal iletim yolağının düzgün kontrol edilememesi durumunda gelişimsel bozukluklar ve kanser, dejeneratif ve metabolik hastalıklar, endokrin fonksiyonunda bozukluklar ve otoimmün hastalıklar görülür [12].

Wnt'in kristal yapısı incelendiğinde, korunmuş sistein aminoasitlerinin Wnt molekülünün C- ve N-uçlarında intermoleküler disülfat bağları oluşturduğu görüldü [13]. Bu disülfat bağlarının bozulması, intramoleküler disülfat bağlarıyla Wnt oligomerlerinin oluşmasını indükler [14]. N-ucundaki korunmuş sisteinlerin mutasyona uğratıldığında Wnt aktivitesinin yok olduğu ve düzgün bir fonksiyon için bu disülfat bağlarının önemli olduğu gösterildi. Wnt proteinleri 40 kDA sistein-zengin olan proteinlerdir ve Frizzled proteinlerine bağlanması için bu bölgede sistein palmitulasyonu olması gerekir [15].

Endoplazmik retikulum (ER) transmembran protein olan Porcupine, O-acyl transferaz bölgesi içerir ve Wnt'in lipid modifikasyonları için gerekli olan enzimdir [16]. Daha sonraki çalışmalarda da Wnt'in posttranslasyonel modifikasyonlarından da sorumlu olduğu gösterildi [17]. Bu proteinin aktivitesinin IWP2 tarafından engellenmesi, Wnt sinyal iletim yolağını engellemek için kullanılan yaygın yöntemlerdendir [18].

Wnt sinyal iletim yolağı başlıca β -katenin-bağımlı ve β -katenin-bağımsız olarak ikiye ayrılır. Kanonikal Wnt sinyal iletim yolağı olarak da adlandırılan Wnt/ β -katenin sinyal iletim yolağında Wnt ligandının bağlanmasıyla β -katenin stabilizasyonu sağlanır. β -katenin-bağımsız yollar ise Wnt/ Ca^{2+} yolağı ve düzlemsel hücre kutuplaşması (PCP) yollarıdır [19, 20].

2.1.1. β -katenin-bağımlı Sinyal İletim yolağı

Wnt sinyal yollarından en iyi anlaşılmış olan Wnt/ β -katenin sinyal iletim yolağıdır. Bu yolk, homeostatik aralık içinde, hücre kaderini, bölünmeyi, kök hücrelerin ve progenitör hücrelerin kendilerini yenilemesini düzenler [21, 22]. β -katenin-bağımlı sinyal iletim yolağı, hücre proliferasyonu, hücre ölümü, hücre göçü ve kutuplaşması gibi çok çeşitli hücresel fonksiyonlarda görev alır.

Son zamanlarda yapılan çalışmalar moleküler mekanizmaları daha da açığa kavuşturdu. Özellikle, Wnt ligandlarının olmadığı durumda, glikojen sentaz kinaz 3 (GSK3), kasein kinaz 1 α (CK1 α), Axin ve adenomatous polyposis coli (APC)'den oluşan bir degradasyon kompleksi oluşur. Bu protein kompleksi β -katenin'in fosforillenmesine ve daha sonra ubiquitin eklenmesine öncü olur ve β -katenin 26S proteozom tarafından degradasyona uğrar [23]. Wnt sinyal iletim yolağının aktif olmadığı durumda, degradasyon kompleksine E3 ligaz beta-transducin containing protein (β -TrCP) bağlanır. Bu ligaz β -katenin'in ubiquitinlenmesini sağlar ve bu nedenle proteazomların hedefi haline gelir [24].

Wnt/ β -katenin sinyal iletim yolağı ile G-protein sinyal iletim yolağı arasındaki ilişki ilk kez Malbon ve arkadaşları tarafından kanıtlandı [25]. β -katenin-bağımlı

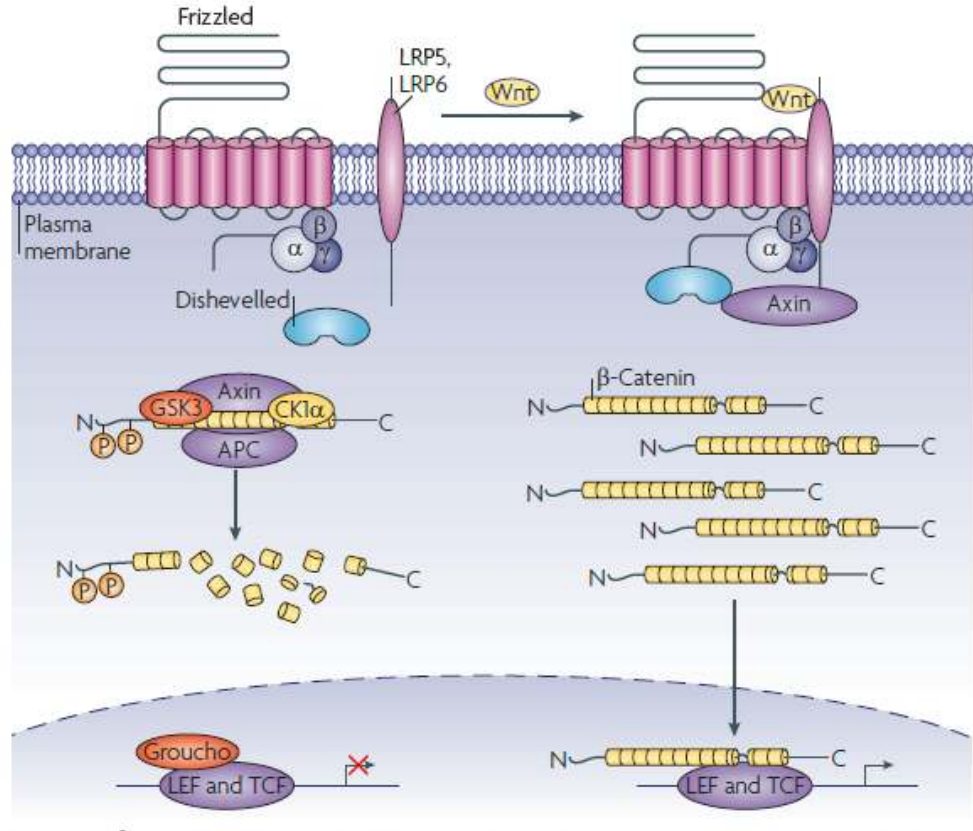
transkripsiyonun aktivasyonu birincil endoderm kaderini indükler çünkü Wnt'in hücre kaderi üzerindeki etkisi G proteinlerinin G_{q1} ve G_{q0} alt ünitelerinin inhibitörleri tarafından engellenir. Daha yakın zamanda, Frizzled reseptörlerinin G_{q0} ile eşleştiği biyokimyasal olarak kanıtlandı [26]. Frizzled aktivasyonundan sonra 5 dakika içerisinde, GSK3 β hızlıca Axin'den ayrılır ve Frizzled reseptörlerinin G_{q0} ile eşleşmesi azalır. GSK3 β ve Axin arasındaki etkileşimin düzenlenmesi ve bunun sonucunda β -katenin stabilizasyonun sağlanması G proteinlerine bağımlı olduğu gösterildi.

Daha sonra yapılan biyokimyasal deneyler, Frizzled reseptörlere ek olarak, Wnt ligandların da LRP reseptörlerin amino uçlarına bağlandığını ve Frizzled-LRP-Wnt üçlü kompleksi indüklediğini ya da stabilize ettiğini gösterdi [27].

Axin, LRP5 ko-reseptörün karboksi ucuna bağlanır ve Wnt proteinlerinin bu etkileşimi başlatması Wnt sinyal iletim yolağının sitoplazmada nasıl başladığını açıklar [28]. Flöresan rezonans enerji transfer (FRET) tekniğiyle, Frizzled aktivasyonundan sonra 4 dakika içerisinde Axin moleküllerinin LRP5 ucunda biriktiği gösterildi. Mekanik olarak, Axin'in LRP ko-reseptöründe stoklanması, LRP5 ve LRP6 proteinlerinin sitoplazmik bölümlerinde bulunan beş tane Pro-Pro-Ser-Pro tekrarlarıyla düzenlenir [29]. Bu beş tane Pro-Pro-Ser-Pro tekrarlarının mutasyon analizinde, β -katenin'in tam olarak indüklenebilmesi için LRP6 ko-reseptöründeki bu motiflerin en az 4 tanesinin bulunması gerektiği gösterildi [30]. Normal hücre içeriğinde, Axin'in LRP5 ya da LRP6 ko-reseptörlerine bağlanması için yüksek bağlanma eğiliminin, Wnt-stimülasyonu sonrası LRP'deki Pro-Pro-Ser-Pro motifinin fosforillenmesi sayesinde gerçekleştiği savunulur. Buna ek olarak, CK1 γ ve GSK3 β , LRP5 ve LRP6 ko-reseptörlerinin fosforillenmesinde rol alan kinazlar olduğu tanımlandı [31]. Bu çalışmalarda, CK1 γ - ve GSK3 β -bağımlı LRP5 ve LRP6 C-ucunun fosforilasyonun, Axin için yüksek bağlanma eğilimi yarattığı savunulur. Hücre içinde çok düşük düzeyde bulunan Axin'in LRP5 ve LRP6 tarafından ayrılması, Axin'in β -katenin degradasyon kompleksindeki rolünü baskılayarak, nükleer β -katenin'in fonksiyonunu aktive eder [32].

Frizzled proteinleri, filogenetik olarak G protein-eşleşmiş reseptörler (GPCRs) ailesine üye olan yedi transmembran hücre yüzeyi reseptörleridir [33]. Frizzled reseptörleri homomerik ya da heteromerik kompleksler halinde diğer Frizzled

ailesindeki proteinler ile bulunurlar [34]. Wnt/Frizzled etkileşimleri ve sintal artması ya da engellenmesi, R-spondin (RSPO), Dishevelled ve E3 ligaz Ring finger protein 3 (RNF43) ve Zin ve ring finger 3 (ZNFR3) gibi moleküller tarafından düzenlenir.



Şekil 1. β-katenin-bağımlı sinyal iletim yolağı [35]

Frizzled reseptörleri, LRP5 ya da LRP6 yokluğunda da Wnt ligandları tarafından uyarılabilir ve bu durumda β-katenin-bağımsız (non-canonical) yolları aktive edilir. Omurgalılarda, bu β-katenin-bağımsız sinyal yolları kohlear saç hücrelerinin düzlemsel hücre kutuplaşmasını [36], yakınsak ekstansiyon hareketlerini [37], doku sınırlarının oluşmasını ve gastrulasyon sırasında dorsoventral biçimlenmesini kontrol eder [38].

Yedi hidrofobik katmanlara ek olarak Frizzled reseptörleri, prototipikal GPCR'ler ile siklik AMP-bağılantılı protein kinaz (PKA)'ın, protein kinaz C (PKC)'nin ve kasein kinaz

2 (CK2)'nin glikolizasyon ve fosforilasyon yerlerinin aynı olması özelliğini de paylaşmaktadır. Ancak, Frizzled reseptörleri G protein eşleşmesi için gereken ve GPCR'lerin ikincil hücre içi yapısında bulunan korunmuş Asp-Arg-Tyr motiflerini içermez. Ek olarak Frizzled reseptörleri, GPCR'lerin yedi transmembran katmanının sonunda bulunan Asn-Pro-X-X-Tyr motifini de içermez.

Wnt ligandlarının Frizzled reseptörleriyle ve düşük yoğunluklu lipoprotein reseptör-bağılantılı protein 5 ya da 6 ile etkileşmesi, Dishevelled sitoplazmik fosfoproteinleri aktive eder. Bu proteinler de degradasyon kompleksini inhibe ederek β -katenin'in yıkımını engeller. Daha sonra β -katenin nükleus içerisinde birikir ve lenfoid çoğaltan- bağlanma faktörü (LEF) ve T hücresi faktörü (TCF) proteinlerine bağlanır. Bu durum hedef genlerin ekspresyonu düzenlemek için transkripsiyonun başlamasını sağlar.

Dishevelled, β -katenin-bağımlı ve β -katenin-bağımsız sinyal yolları arasındaki moleküler dallanma noktasıdır. Dishevelled proteinleri Wnt sinyal iletim yolağı tarafından plazma membranının sitoplazmik tarafında aktive edilen ilk proteinlerden biridir [39]. Wnt/ β -katenin sinyal iletim yolağında Dishevelled, Axin aracılığıyla β -katenin degradasyon kompleksini inaktive ettiği düşünülür [40]. Ek olarak Dishevelled, Wnt tarafından LRP5 ve LRP6 ko-reseptörlerinin fosforillenmesinde de rol aldığı düşünülür [41].

Bir hipotez ise, Wnt ligandlarına cevap olarak Dishevelled'in Frizzled reseptörlerine bağlandığı ve Axin-GSK3 β kompleksinin bağlanmasını başlattığı ve GSK3 β tarafından LRP6 fosforillenmesinde önemli bir adım olduğu savunulur. Birlikte, Dishevelled, Axin ve GSK3 β 'ün, Wnt tarafından LRP6 fosforillenmesi için hepsinin gerekli olduğu gösterilir.

Gerçek zamanlı görüntüleme deneylerinde, değişik dalgalarda eksitasyon yapan yeşik flöresan proteinlerle etiketlenen LRP6 ko-reseptörü ve Axin'in bu süreçteki görevi daha aydınlatıldı. Dingin durumda, Axin hücre içinde noktalı gözüktürken, LRP6 plazma membranında eşit olarak dağılmış durumdadır. Wnt proteinleri ile stimülasyondan sonra 15 dakika içinde ise, LRP6 ve Axin membranda kümeleşir [42]. Daha sonraki

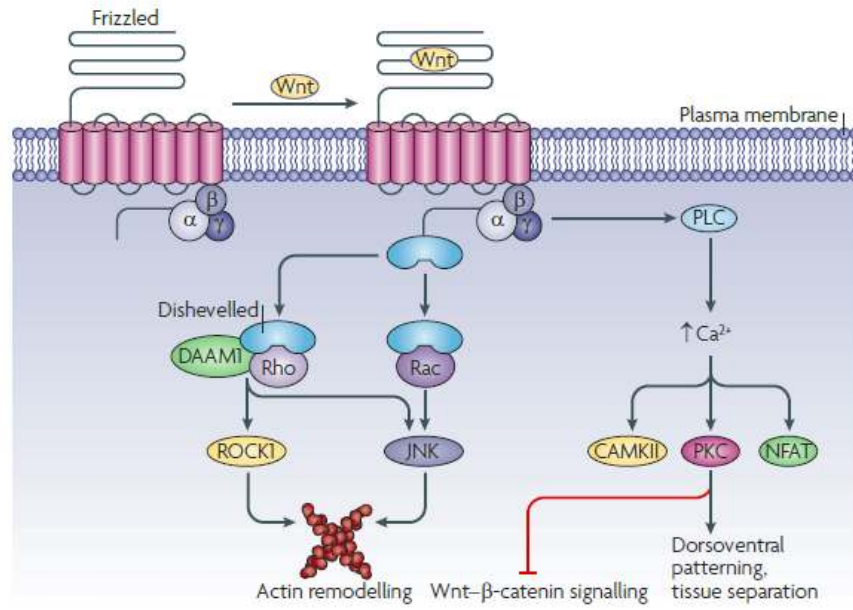
alışmalarla, Wnt-indüklenmiş sinyalozomların fosforillenmiş LRP6, Dishevelled, Frizzled ve GSK3β içerdiği gösterildi.

2.1.2. β-katenin-bağımsız Sinyal İletim Yolağı

Zebrabalıklarında β-katenin-bağımsız Wnt yolaklarında Frizzled reseptörlerinin G protein sinyal iletim yolağıyla ilişki olduğu gösterildi [43]. Bu deneylerde, zebrabalığı embriyolarında Wnt5a ya da frizzled2'ye cevap olarak Ca²⁺ akışının değişiminin G proteinler tarafından engellendiği gösterildi [44]. Farklı sistemlerde Ca²⁺-bağımlı proteinlerden Ca²⁺/calmodulin-bağımlı protein kinaz II (CAMKII), PKC ve aktive T hücrelerin nükleer faktörü (NFAT)'lerin Wnt5a aktivasyonu G proteinlere bağımlıdır [45].

Ayrıca, omurgalılarda β-katenin-bağımsız Wnt sinyal iletim yolağının, Wnt/β-katenin sinyal iletim yolağını aleyhine çevirdiği hakkında bir fikir birliği vardır [46]. Bu karşıtlık, filogenetik olarak doku rejenerasyonunda [47], uzuv gelişiminde [48] ve öncül timositlerin varlığını sürdürmesinde belirgindir [49].

ROR2'de Wnt-bağlanan Cys-zengin bölgesinin ve RYK'de Wnt-inhibitör faktör modülünün tanımlanmasıyla, Wnt sinyalinin Frizzled reseptörleri de olmadan aktarıldığı dşnld [50]. ROR2'nun overekspresyonunda, non-canonical Wnt yolağındaki gibi dorsal mezodermin ve nöroektodermin yakınsak hücre hareketlerini engellediği görüldü. ROR2'nun fonksiyon kaybı fenotipi ile Wnt5a mutantlarının fenotipinin benzediği görüldü [51]. Wnt3a-bağımlı β-katenin aktivasyonunun Wnt5a tarafından engellemesi, fare Ror2 genini sürekli eksprese eden insan HEK293 hücrelerinde daha da güçlendirmesi ROR2'nun β-katenin sinyal iletim yolağına karşıt çalıştığını gösterir [52]. Zıt olarak Wnt5a sinyali β-katenin-bağımsız yolağın, frizzled 4 ve LRP5 overeksprese edilerek β-katenin-bağımlı yolakla etkisinin saptırıldığı gösterildi.



Şekil 2. β-katenin-bağımsız sinyal iletim yolağı [35]

Mitoz bölünme sırasında Wnt fonksiyonları transkripsiyondan bağımsızdır. Wnt'in yokluğunda, GSK3 aktif olarak mitotik etkenleri ubiquitinleyerek degrade olmaları için etiketler [53]. Bu yeni keşfedilen sinyal iletim yolağı proteinin Wnt/stabilizasyonu (STOP) sinyal iletim yolağı olarak adlandırıldı. Bu sinyal iletim yolağı β-katenin-bağımsız olmasına rağmen bu yolak için GSK3 gereklidir.

2.1.3. Wnt Sinyal İletim Yolağı Düzenleyicileri

Salgılanan Frizzled-ilişkili proteinler ve Wnt inhibitör faktörü (WIF) direk olarak Wnt'e bağlanır ve reseptöre bağlanmasını engeller. Dickkopf proteinleri (DKK), yüzey ektodermdaki Wnt modulatörleri (Wise) ve Sclerostin (SOST) LRP'ye bağlanır ve Wnt'in ona bağlanmasını engeller [54, 55].

Norrin Frizzled'a bağlanır ve FZD/LRP kompleksinin oluşmasını indükleyerek Wnt sinyal iletim yolağını indükler [56]. Özel olarak Wnt7 yolağını aktive eden bir diğer protein ise adezyon G protein eşleşmiş reseptör 124 (GPR124)'tür [57].

2.2. Wnt Sinyal İletim Yolağı ve Rejenerasyon

Rejenerasyon farklılaşmış hücrelerin proliferasyonu, erişkin hücrelerin köken-kısıtlı öncül hücrelere tekrar farklılaşmasıyla, farklılaşmış hücrelerin başka bir tip hücreye farklılaşmasıyla ya da var olan kök hücrelerin aktivasyonu ile gerçekleşir.

Farklı sistemler farklı hücresel prensipler kullanarak zarar gören yapılara tekrar hücre sağlar [58]. Bazı sistemlerde rejenerasyon, homeostazi sırasındaki dokularda bulunan kök hücrelerin aktivasyonu ile olur.

Zebrabalığı kuyruk rejenerasyonunda osteoblastlar, erişkin hücrelerden tekrar farklılaşarak unipotent olan öncül hücrelere dönüşür [59]. Zebrabalığında, erişkin kardiyomiyositler rejenere olan kalp kaslarının öncülleridir [60].

Wnt sinyal iletim yolağı rejenerasyon sırasında önemli sinyal yollarından bir tanesidir. Özellikle β -katenin sinyal iletim yolağı hidra kafalarının rejenerasyonunda gereklidir [61]. Ayrıca, semender lens rejenerasyonunda [62], amniyot retina rejenerasyonunda [63], memeli pankreas rejenerasyonunda [64] ve akciğer tamirinde [65] Wnt sinyal iletim yolağı örnek gösterilebilir.

Planaryalarda, doku homeostazi ve rejenerasyon, tüm vücut boyunca var olan neoblast olarak adlandırılan kök hücreler aracılığıyla gerçekleşir. Ampütasyon sonrası neoblastlar, blastema olarak adlandırılan farklılaşmamış hücre topluluğunu oluşturur [66]. Kafa ya da kuyruk hayvandan çıkarıldığında iki yapı da rejenere olur. Wnt/ β -katenin sinyal iletim yolağı engellendiğinde ise kuyruk yarısından kafa oluşur [67]. Buna karşın olarak da APC kompleksini engelleyerek Wnt/ β -katenin sinyal iletim yolağı aktive edildiğinde anterior yarada kuyruk oluşur [68]. Sonuç olarak, planaryalarda β -katenin sinyal iletim yolağı anterior-posterior vücut kutuplaşması oluşması için gerekli bir sinyal iletim yolağıdır.

Vücut uzantılarının rejenerasyonu hakkındaki bilgilerin çoğu amfibiler, zebrabalığı gibi canlılardan gelmektedir. Bu sistemlerde verilen zarardan sonra blastema oluşur. Kemik erişkin osteoblastlardan tekrar farklılaşarak blastemada öncül hücreleri oluşturur [59, 69]. Zebrabalığı kuyruk rejenerasyonunun araştırılması, blastema oluşumunu ve fonksiyonunu kontrol eden moleküler sinyalleri anlamak için aydınlatıcı

olmuştur [47, 70]. Vücut uzantısı rejenerasyonunda Wnt/ β -katenin sinyal iletim yolağının önemli bir rolü olduğu anlaşıldığı gibi β -katenin-bağımsız sinyal iletim yolağının da rolü olduğu görüldü [71].

Zebrabalığı kuyruk rejenerasyonunda bir çok Wnt ligand ekspresyonu, β -katenin hedef genleri ve transgenik raportörlerinin transkripsiyonel aktivitesi artar [47]. Isı-şoku ile indüklenebilir ya da adenovirüs-aracılı olarak Dickkopf1 overeksprese edildiğinde zebrabalığı kuyruk rejenerasyonunun engellendiği görüldü [72]. Uzun rejenerasyonu için epidermis ve blastemal mezenkim arasında Wnt sinyal iletim yolağını da içeren kompleks iki taraflı sinyal iletim yolağı etkileşimlerinin gerekli olduğu gösterildi [73].

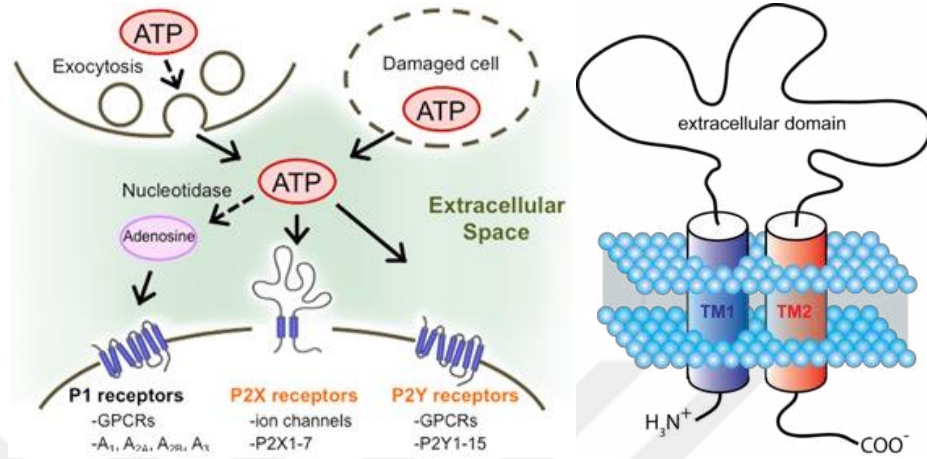
Wnt sinyal iletim yolağı inhibe edildiğinde zebrabalığı kuyruk rejenerasyonunun engellenmesine ek olarak, β -katenin sinyal iletim yolağı aktive edildiğinde uzun rejenerasyonunun güçlenir. İndüklenebilir β -katenin sinyal iletim yolağı aktivatörü Wnt8 hattında zebrabalığı kuyruk rejenerasyonunda blastema oluşumunun güçlendiği ve Axin1'in engellendiği transgenik hattında rejeneratif büyümenin hızlandığı görüldü [47].

β -katenin-bağımsız sinyal iletim yolağı da zebrabalığı kuyruk rejenerasyonu sırasında rol alır. β -katenin-bağımsız sinyal iletim yolağı aktive eden Wnt5a ve Wnt5b genlerinin ekspresyonunun artar ve Wnt5b geninin overekspresyonunun zebrabalığı kuyruk rejenerasyonunda blastema bölünmesini engeller. Ek olarak, Wnt5b mutanti zebrabalığında fin rejenerasyonunun hızlandığı görüldü [47].

2.3. Purinerjik Sinyal İletim Yolağı

Pürinerjik sinyal iletim yolağı hücre dışı sinyal molekülü adenosine 5'-triphosphate (ATP) tarafından aktive edilen bir sinyal iletim yolağı olduğu 1972'de iddia edildi [74]. Ardından 1976'da ATP molekülünün periferik ve merkezi sinir sistemindeki (CNS) çoğu sinirde kotransmitter olduğu bulundu [75, 76]. Pürinler daha sonra, adenosine tarafından aktive edilen P1 reseptörleri, ATP ya da adenosine 5'-diphosphate (ADP) tarafından aktive edilen P2 reseptörleri olarak iki aileye ayrıldı [77]. Adenozin P1 reseptörlerinin dört alt türü (A_1 , A_{2A} , A_{2B} , A_3), iyon kanalı reseptörü P2X reseptörlerinin

yedi alt türü (P2X1-7) ve G protein eşli P2Y reseptörlerinin sekiz alt türü (P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆, P2Y₁₁, P2Y₁₂, P2Y₁₃, P2Y₁₄) bulunur [78].



Şekil 3. Purinerjik sinyal iletimi [79]

Adenozin merkezi sinir sistemindeki transmitter salınımı için predominant, presinaptik düzenleyicidir ancak ATP de presinaptik olarak görev alır [80]. Adenozin salınmış ATP'nin ectoenzimatik yıkımı sonucu oluşur ama beyindeki nöronların alt topluluklarında ya da astrositlerde adenozinin direk salındığı görülür [81].

Çeşitli P1 ve P2 reseptörleri astrositlerde, oligodendritlerde ve mikroglialarda ekspres edilir [82, 83]. ATP hem kısa süreli kalsiyum sinyal olaylarını ve hem de uzun süreli proliferasyon, farklılaşma ve gliyaların ölümünü kontrol eder [84]. Ek olarak, purinerjik reseptörlerin erişkin nöronal kök hücrelerde de ekspresyonu görülür [85].

2.3.1. P2X Purinerjik Reseptörleri

Hücre dışı ATP tarafından aktive edilen trimerik P2X reseptörlerinin, acı algılama [86], inflamasyon [87], tat [88], nörotransmitter salınımının düzenlenmesi [89] gibi fizyolojik ve patolojik olaylarda rolü vardır.

P2X reseptörlerinin aktivasyonu hücre içi trofik sinyalleri indükler. P2X reseptörleri hücre adezyon molekülleri ile etkileşebilir, nikotinik, GABA ya da 5-HT₃ kanalları gibi diğer reseptör kanalları ile fiziksel olarak konuşabilir ya da G protein eşli reseptörler ile etkileşebilirler [90]. Nükleotitler P2X reseptörleri aracılığıyla hızlıca etkilerini gösterirler. Bu homomerik ya da heteromerik reseptörler NA⁺, K⁺ ve Ca²⁺ iyonlarını geçirir ve membran potansiyelini hızlıca değiştirirler [91, 92].

P2X2, P2X4 ve P2X6 reseptörleri heteromultimer oluşturur. P2X1 reseptörleri beyin serebellum gibi bazı bölgelerinde ekspres edilirken, P2X3 reseptörleri beyin kökünde ekspres edilir. P2X7 reseptörleri çoğunlukla presinaptiktir [93]. P2X7 haricindeki tüm aile üyeleri başlıca dorsal kök gangliyonu ve trigeminal gangliyalarda eksprese edilir [94].

Zebrabalığında yüksek homolojisi olan dokuz p2rx reseptörü izole edildi; p2rx1, p2rx2, p2rx3.1, p2rx3.2, p2rx4.1, p2rx4.2, p2rx5, p2rx7, p2rx8 (diğer adı p2rx514) [95]. Memelilerde olduğu gibi bu reseptörlerin bazıları elektrofizyolojik özelliklerine göre homodimer ya da heterodimerler halinde bulunur. Zebrabalığı embriyolarında, çeşitli p2rx alt türleri kafatası duyu gangliyonları ve omurilikteki Rohon-Beard (RB) hücreleri gibi duyu nöronlarında eksprese olur (bou 00, egan 00, kuce 06). Zebrabalığında dört p2rx üyesi (p2rx2, p2rx3.1, p2rx3.2, p2rx8) RB nöronlarında trigeminal gangliyada ve daha sonra kafatası sinirlerinde benzer ekspresyon gösterir. p2rx1 döllenmeden sonra 32. ve 48. saatlerde gözlerin arkasında daha çok hipotalamusun kuyruğuna doğru kısıtlı bir alanda ekspresyon gösterir. p2rx5 gelişiminin ilk üç gününde somatik kaslarda ekspresyon gösterirken, p2rx7 beyinde, özellikle orta beyin arka beyin sınırında ekspresyon gösterir. Döllenmeden sonra 32. saatte p2rx8 hipotalamusta ekspresyon gösterir [95].

P2X7 reseptörleri bazı ikincil haberci molekülleri ve Akt, c-Jun N-terminal kinaz 1 ve 2, ERK'leri ve p38 MAP kinaz gibi enzim basamaklarını aktive edebilir. Ek olarak, protein tirozin fosforlanmasını artırarak MAP kinaz yolağını aktive eder ve porlarını açarak plazma membranında iyon geçişini sağlar ve hücreyi ölüme götürür [96, 97].

Kas rejenerasyonu sırasında P2X5, P2Y1 VE P2X2 reseptörleri sıralı olarak eksprese olur. P2X5 ve P2Y1 reseptörleri ilk olarak aktive satelit hücrelerinde, P2Y1 reseptörü infiltratif immün hücrelerinde eksprese olur [98].

2.4. Model Organizma Olarak Zebrabalığı

Zebrabalığının model organizma olarak kullanılması hızla yayılan ve omurgalı gelişimini anlamak için çok değerli model sistemlerden biridir. 1980’lerde model organizma olarak kullanılmaya başlanan zebrabalığı ile bir çok görüntüleme ve erken gelişimsel sürecini değiştirebilme teknikleri gelişti. Zebrabalığı ile insanları da içine alan diğer omurgalıların arasındaki genomik ve moleküler benzerlikler, zebrabalığındaki buluşların insanlar için uygulanabilmesine olanak sağlamıştır. Zebrabalığının gelişimi dışsal, hızlı ve gözle görülebilirdir. Embriyo ve koryonu şeffaftır ve ilk 5 gün içinde bütün ana organlar gelişir. Zebrabalığı yılın her zamanı üreyebilir ve haftada yüzlerce embriyo üretebilirler [99].

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Araştırmanın Tipi

Araştırma deneysel bir nitelik taşımaktadır.

3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı

Araştırma, Dokuz Eylül Üniversitesi, İzmir Uluslararası Biyotıp ve Genom Enstitüsü (İBG-izmir) laboratuvarlarında Eylül 2014 ve Mayıs 2017 tarihleri arasında gerçekleştirilmiştir.

3.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi

Araştırmada insan üzerinde bir çalışma yapılmamıştır.

3.4. Çalışma Materyali

Araştırmada Dokuz Eylül Üniversitesi İBG Deney Hayvanları Laboratuvarı'ndan sağlanacak olan Wild Type (Yabanıl Tip), Wnt/ β -katenin sinyal iletim yolağı raportörü *Tg(7xTCF.siam:mCherry)*, Wnt/ β -katenin sinyal iletim yolağı aktivatörü *Tg(hs:Wnt8GFP)*, Wnt/ β -katenin sinyal iletim yolağı inhibitörü *Tg(hs:Dkk1GFP)* ve *Tg(hs:Axin1GFP)* transgenik zebrabalıkları kullanılmıştır. Ayrıca araştırmada, HEK293T insan embriyonik böbrek hücreleri ve SH-SY5Y insan nöroblastoma hücreleri kullanılmıştır.

3.5. Araştırmanın Değişkenleri

Wild Type (Yabanıl Tip), *Tg(7xTCF.siam:mCherry)*, *Tg(hs:Wnt8GFP)*, *Tg(hs:Dkk1GFP)* ve *Tg(hs:Axin1GFP)* transgenik zebrabalıkları bağımsız değişkenler iken bu balıkların çiftleştirilmesi ve embriyolarının toplanması bağımlı değişkenlerdir.

Embriyolara mikroenjeksiyon yapılması bağımsız değişkenler iken bu embriyolara mikroenjeksiyon ile verilen capped RNA'nın ekspresyonu bağımlı değişkenlerdir.

İnsan embriyonik böbrek (HEK293T) ve insan nöroblastoma (SH-SY5Y) hücre hatları bağımsız değişkenler iken bu hücrelere yapılan transfeksiyon ve genlerin ekspresyon düzeyleri bağımlı değişkenlerdir.

Larvaların kuyruklarının kesilmesi bağımsız değişkenler iken bu kuyrukların rejenerasyonu bağımlı değişkenlerdir.

3.6. Veri Toplama Araçları

3.6.1. Malzeme ve Cihazlar

Tablo 1. Araştırmada kullanılan kimyasal, reaktif ve kitlerin listesi

Malzeme Adı	Firma	Katalog numarası
Phusion High-Fidelity DNA Polymerase	Thermo Scientific	F-534L
Ribozol RNA Extraction kimyasalı	Amresco Katalog	N580-200
Ribozol	Amresco	N580-200ML
Direct-zol™ RNA MiniPrep Kiti	Zymo Research	R2050
Chloroform	Merck	102445
Isopropanol	Merck	K47798334
Etanol	Merck	K45636683426
DNase/RNase-siz su	Gibco	10977023
iScript™ cDNA Synthesis Kit	Bio-Rad	170-8891
KiloGreen 2X qPCR MasterMix-No Dye	ABM	MasterMix-KS
BamHI-HF	NEB	R3136L
XhoI	Thermo Scientific	FD0694
XbaI	Thermo Scientific	FD0684
EcoRI	Thermo Scientific	FD0274
KpnI	Thermo Scientific	FD0524
NcoI	Thermo Scientific	ER0575

T4 DNA Ligase	ABM	G467
Yeast Extract	Merck	1037530500
Sodyum Klorür	Bioshop	S0D001.1
L-Tryptophan	Sigma	T0254-5G
Agar	Merck	VM623914347
NucleoSpin Plasmid Miniprep Kiti	Macherey-Nagel	740588.50
P1, P2 ve P3 solüsyonları	Qiagen	19052
Dulbecco's Modified Eagle Medium	Gibco	41965-039
Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12	Gibco	1623179
Fetal Bovine Serum	Biological Industries	04-222-1A-US
Penicillin-Streptomycin	Gibco	15140122
Trypsin-EDTA (0.25%), phenol red	Gibco	25200-056
DMSO	Fisher Scientific	146738
L-Glutamine	Biological Industries	03-020-1B
Trypan Mavisi	Biological Industries	03-102-1B
Aquaguard-1	Biological Industries	01-867-1B
Aquaguard-2	Biological Industries	01-916-1E
GeneRuler™ DNA Ladder Mix	Thermo Scientific	SM0331
GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder	Thermo Scientific	SM0311
SafeView Classic	ABM	G108
Lipofectamine 2000	Thermo Fisher Scientific	11668019
Dual Luciferase Reporter Assay	Promega	E1910
Gel Extraction Kit	Macherey-Nagel	740609.50
Paraformaldehit	Merck	K45535705424
Methanol	Sigma	32213-2.5L
Formamide-deionized	Amresco	0606-100ML
Tween-20	Amresco	0777-1L
Heparin Sodium	Serva	24590

Ribonucleic acid from torula yeast Type VI	Sigma-Aldrich	R6625-25G
Tris	Amresco	0826_1KG
mMESSAGE mMACHINE® SP6 Transcription Kit	Thermo Fisher Scientific	AM1340
PCR Clean-up kiti	Macherey-Nagel	740609.50
Taq DNA Polymerase	Geneaid	XN18104
pGEM-T Easy Vector System I kiti	Promega	A1360
IPTG	Thermo Scientific	R1171
Gliserol	Amresco	0854-1L
Gateway® BP Clonase® II Enzyme	Invitrogen	11789020
Gateway® LR Clonase® II Enzyme	Invitrogen	11791020

Tablo 2. Araştırmada kullanılan ekipmanların listesi

Ekipmanın Adı	Firma	Katalog numarası
Vorteks	Thermo Scientific	88880018
İmmünofloresan mikroskobu	Olympus	BX61
Çalkalayıcı(shaker)	Thermo Scientific	88880620
CO2 İnkübatörü	Memmert	INCO153
Santrifüj(falkon tüp)	Eppendorf	05-413-327
Biyogüvenlik seviye 2 kabini	Thermo Scientific	51026637
Thermal Cyler	Applied Biosystems	A24811
Aspiratör	Megasan Medikal	13102
Su banyosu	Nüve Z10.NB	
Hemositometri	Marienfield Superior	0630010
NanoDrop	Thermo Scientific	ND2000
Tartı	Sartorius	8221S
Mekanik karıştırıcı	Stuart	80001490

Jel Elektroforez sistemi	Thermo Scientific	D2
MicroCL 17R(mikro santrifüj)	Thermo Scientific	75002455
pH metre	Hanna Instruments	HI8521
-80°C Derin Dondurucu	Thermo Scientific	
Sıvı Azot Hücre Saklama Tankı	Thermo	Cryoplus 2
Microplaka Okuyucu	Thermo	Varioskan® Flash
Konfokal mikroskop (780 Upright FCS/Confocal Microscope)	Zeiss	
Hücre kültürü 10 cm petri dish	Corning	
24 kuyulu hücre kültürü plaka	Corning	
6 kuyulu hücre kültürü plaka	Corning	

3.6.2. Besi Yeri ve Solüsyonlar

<u>Tam besiyeri</u>	<u>Son konsantrasyon</u>
DMEM	1X
FBS	%10
P/S	%1
L-Glutamin	%1

<u>Fiksasyon solüsyonu (%4 PFA)</u>	<u>500 mL için</u>
1X PBS*	500 mL'e kadar
Paraformaldehit	16 gram

* 400 mL 1X PBS 65°C'ye getirildikten sonra 16 gram paraformaldehit eklenir ve ısıtılarak karıştırılır. NaOH ile pH 7.4'e ayarlanır ve ardından 500 mL'e 1X PBS ile tamamlanır.

<u>RNA agaroz jel</u>	<u>100 mL için</u>	<u>Son konsantrasyon</u>
Agaroz	1.2 gram	%1.2
10X MOPS	10 mL	1X
DEPC-muamele edilmiş su	87 mL	
%40 Formaldehit	3 mL	%1.2

<u>TAE (50X)</u>	<u>1L için</u>
Tris baz	242 g
0,5 M EDTA	100 mL
Glacial acetic acid	57.1 mL
dH ₂ O	1 L'ye kadar

<u>E3 ortamı (60X)</u>	<u>2L için</u>
NaCl	34.8 g
KCl	1.6 g
CaCl ₂ ·2H ₂ O	5.8 g
MgCl ₂ ·6H ₂ O	9.78 g
dH ₂ O	2 L'ye kadar

* Tüm malzemeler su içinde çözüldükten sonra pH NaOH ile 7.2'ye ayarlanır ve ardından 1X yapıldığında %1 metilen mavisi eklenir.

<u>LB</u>	<u>1L için</u>
Yeast Extract	5 g
NaCl	10 g
Tryptone	10 g
dH ₂ O	1 L'ye kadar

<u>LB Agar</u>	<u>1L için</u>
Yeast Extract	5 g
NaCl	10 g
Tryptone	10 g
Agar	15 g
dH ₂ O	1 L'ye kadar

<u>SOB</u>	<u>Son konsantrasyon</u>
Tryptone	%2
Yeast Extract	%0.5
NaCl	10 mM
KCl	2.5 mM
MgCl ₂	10 mM
MgSO ₄	10 mM

<u>PBST (1X)</u>	<u>1L için</u>
NaCl	8 g
KCl	0.2 g
Na ₂ HPO ₄	1.44 g
KH ₂ PO ₄	0.24 g
dH ₂ O	1 L'ye kadar

* Tüm malzemeler çözüldükten sonra pH HCl ile 7.4'e ayarlanır ve %0.1 Tween20 eklenir

<u>NTMT solüsyonu</u>	<u>20 mL için</u>
Tris HCl (pH 9.5, 1M)	2 mL
MgCl ₂ (1M)	1 mL
NaCl (1M)	2 mL
Tween20 (%10)	200 µL
dH ₂ O	14.8 mL

<u>SSC (20X)</u>	<u>1L için</u>
Sodium Chloride	175.3 g
Sodium Citrate	88.2 g
dH ₂ O	1 L'ye kadar

*pH 7 olacak şekilde ayarlanır.

NBT

50 mg Nitro Blue Tetrazolium (NBT), 0.7 mL N-N, dimethyl formamide içinde çözülür ve ardından 0.3 mL su eklenir.

BCIP

50 mg 5-Bromo 4-Chloro 3-Indolyl Phosphate (BCIP), 1 mL N-N, dimethyl formamide içinde çözülür.

<u>Hibridizasyon solüsyonu</u>	<u>50 mL için</u>	<u>Son konsantrasyon</u>
Formamide (deionized)	25 mL	%50
SSC (20X)	12.5 mL	5X
Tween20 (%20)	0.25 mL	%0.1
Heparin (5 mg/mL)	0.5 mL	50 µg/mL
tRNA (50 mg/mL)	0.5 mL	500 µg/mL
Citric acid (1M)	0.46 mL	
dH ₂ O	50 mL'ye kadar	

<u>Phosphate solüsyonu</u>	<u>500 mL için</u>
NaH ₂ PO ₄ (0.5M)	46 mL
Na ₂ HPO ₄ (0.5M)	4 mL

<u>STOP solüsyonu</u>	<u>Son konsantrasyon</u>
Phosphate solüsyonu	0.05 M
EDTA	1 mM
Tween20	%0.1

3.6.3. Yöntemler

3.6.3.1. Primer Dizaynı

Kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu tekniğinde kullanılmak üzere yeni nesil RNA dizileme verileri sonucundan elde edilen aday gene (purinerjik reseptör P2X, ligand kapılı iyon kanalı 8 (p2rx8)) özgü primerler dizayn edildi. Bu primerlerin bağlanma sıcaklığının 60-61 °C olmasına, primer uzunluklarının 21-25 baz olmasına, GC içeriğinin %50-55 arasında olmasına, son beş baz dizisinde üçten fazla G ya da C bazının olmamasına dikkat edildi. Ardından NCBI Primer Blast çevrimiçi programı kullanılarak dizayn edilen primerlerin genlere özgü olup olmadığı kontrol edildi. Kantitatif polimeraz zincir reaksiyonunda normalizasyon için ise referans gen olarak β -actin geni seçildi.

Tablo 3. Kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu için primerler

Genler	Primer Yönü	Primer Sekansları
z_p2rx1	Forward	CATGACGGGCAGGTGTATGAA
	Reverse	CCTGACTACATCAAACCTGGGGA
z_p2rx2	Forward	TGGTCAAAGAACAGGACGGTG
	Reverse	TAATGGCCTGTTCCAAAGCCG
z_p2rx3a	Forward	GGAAAGCCAATGCACGAGGT
	Reverse	AAAGATGGGACAGAACGGATGG
z_p2rx3b	Forward	GAAGTCCAGCCAAACCCCAT
	Reverse	CCCCACTTTGAATATCGGGCAA
z_p2rx4a	Forward	AATTGTCGATCCCCCGAACC
	Reverse	GATTGGACAGTCAGGATCCGTT
z_p2rx4b	Forward	AATTCGTGGCAATGGCGTTC
	Reverse	CGCTCAAAAGAGCAGGCTTTG
z_p2rx5	Forward	AGGATTTGGCAACAAGGGGT
	Reverse	GTGACCGAGTGCTGTGAGTT
z_p2rx7	Forward	GGCTGCATCTATCACCGCTA
	Reverse	G TTCAGGTCACAGTCCCAGT

z_p2rx8	Forward	TGCTCGCTATTCCAGTGATGC
	Reverse	AAAGTAAGAACGGAGGCGACAT
z_sp5l	Forward	GCTTCACGCAGGTGTGGAT
	Reverse	TTCTGGAGATGAGCTGGGAGT
z_rpl13a	Forward	TCTGGAGGACTGTAAGAGGTATGC
	Reverse	AGACGCACAATCTTGAGAGCAG
h_p2rx5	Forward	CCTCACTATTCTTTTAGCCGTCTGG
	Reverse	GGTAGATGAGTACCAGGTCGCAGA
h_rpl13a	Forward	CCGCCCTACGACAAGAAA
	Reverse	CAGGGTGGCTGTCACTGC
mcherry	Forward	GAACGGCCACGAGTTCGAGA
	Reverse	CTTGGAGCCGTACATGAACTGAGG

3.6.3.2. Balıkların Çiftleştirilmesi ve Embryoların Toplanması

Deneyde kullanılmak üzere Wnt/ β -catenin sinyal iletim yolağı inhibitör hatları *Tg(hsp70l:axin1:YFP)*, *Tg(hsp70l:dkk1:EGFP)* ve Wnt/ β -catenin sinyal iletim yolağı aktivatör hattı *Tg(hsp70l:wnt8:EGFP)* transgenik erişkin zebrabalıkları kullanıldı. Erişkin zebrabalıkları ilk olarak erkek ve dişi olarak seçildi ve çiftleştirmek için eşleri Yabanıl Tip zebrabalıklarından seçildi. Daha sonra zebrabalıkları çiftleştirme tanklarına konuldu. Bu tankta yumurtaları balıklardan ayrı tutan bir engel olmasına ek olarak dişi ve erkeği de birbirinden ayıran bir engel bulunur. Yaklaşık öğleden sonra çiftleştirmek için tanklara konulan zebrabalıkları bütün geceyi tankta geçirdikten sonra ertesi gün ilk ışıkla birlikte bulundukları su değiştirilerek, aralarındaki engel kaldırıldı.

Çiftleşmenin gerçekleşmesini bekledikten sonra embriolar toplanıp E3 embriyo ortamına (E3 medium) aktarıldı. Döllenmemiş olanlar ve ölümler ayıklandıktan sonra bu ortam içerisinde büyümeleri için 28°C inkübatöre konuldu.

3.6.3.3. RNA İzolasyonu

Gastrulasyon, somit oluşumu ve döllenmeden 24 saat sonra evrelerinde embriyolar toplandı. 30-40 embryo, 500 µL RiboZol RNA Extraction Kimyasalı (Amresco Katalog#N580-200 mL) içerisinde fiziksel olarak parçalandı. Daha sonra 22G şırınga içerisinde geçirilerek homojenize edildi ve 5 dakika boyunca vortekslendi. Bu aşamadan sonra Trizol içerisindeki örneklerden ya direk RNA izolasyonu yapıldı ya da daha sonra gerçekleştirmek üzere -80°C'de saklandı. Daha iyi sonuç almak için örnekler -80°C'de en az bir gün bekletildi.

3.6.3.3.1 Zymo Research Direct-zol™ RNA MiniPrep Kiti ile İzolasyon

Trizol içerisindeki örnekler -80°C'den alındıktan sonra oda sıcaklığında erimeleri için 10 dakika bekletildi. Daha sonra 12 000 g'de 1 dakika santrifüj yapılarak supernatant yeni bir eppendorf tüpüne alındı ve pellet atıldı. Zymo Research Direct-zol™ RNA MiniPrep Kiti (Katalog#R2050) protokülüne uygun olarak izolasyon gerçekleştirildi.

3.6.3.3.2 Manual RNA İzolasyonu

Trizol içerisindeki örnekler -80°C'den alındıktan sonra oda sıcaklığında erimeleri için 10 dakika bekletildi.

1. 500 µL Trizol içerisindeki örneklerin üzerine 250 µL kloroform eklendi ve vortekslendi. Daha sonra oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi.
2. Karışım 12 000 g'de +4°C'de 15 dk. santrifüj edildi.
3. Santrifüj sonrası supernatant yeni bir tüpe aktarıldı ve üzerine 250 µL isopropanol eklendi. Alt üst yaparak iyice karıştırdıktan sonra oda sıcaklığında 10 dakika bekletildi.
4. Karışım tekrar 12 000 g'de +4°C'de 10 dakika santrifüj edildi.
5. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra pellet %75 etanol (%25 DEPC'li su) ile yıkandı.

6. Daha sonra pellet Vacum Cleaner ile kurutulduktan sonra 15 µl of DNase/RNase-siz su ile çözüldü.
7. İzole edilen RNA örneklerinin konsantrasyon ve saflıkları NanoDrop'da 260nm ve 280nm'deki absorbanlarına bakılarak spektrofotometrik olarak ölçüldü.
8. Elde edilen RNA ya direk bir sonraki deneyler için kullanıldı ya da -80°C'de ileriki deneyler için saklandı.

3.6.3.4. Revers Transkriptaz (RT) Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Elde edilen RNA örnekleri, Revers Transkriptaz (RT) polimeraz zincir reaksiyonu ile komplementer DNA (cDNA)'ye çevrildi. Bunun için her RNA örneğinden 1 µg alınarak iScript™ cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad Katolog#170-8891) ile aşağıdaki reaksiyon kuruldu.

Reaksiyon başına bileşenler	
5X iScript reaksiyon karışımı	4 µL
iScript revers transkriptaz	1 µL
Nükleaz-sız su	x µL
RNA örneği	x µL (1 µg olacak şekilde)
Toplam hacim	20 µL

Daha sonra karışım termal döngüleyicide aşağıdaki sıcaklık ve süre boyunca inkübe edildi.

Reaksiyon Protokolü

25°C'de 5 dakika

42°C'de 30 dakika

85°C'de 5 dakika

4°C'de kısa süreli olarak saklandı. Uzun süre saklamak için -20°C'ye konuldu.

3.6.3.5. Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Dizayn edilen primerler ve sentezlenen cDNA ile kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu gerçekleştirildi. Bunun için KiloGreen 2X qPCR MasterMix-No Dye (ABM Katalog #MasterMix-KS) kiti kullanıldı. Kurulan reaksiyon Roche - LightCycler® 480 System termal döngüleyicide analiz edildi.

3.6.3.6. Klonlama

Hedef genlerle çalışabilmek için, genlerin kodlayan sekansları memeli ekspresyon vektörüne klonlandı. Bu genler hem stop kodonlu olarak klonlandı hem de Yeşil Floresan Protein (Green Fluorescent Protein – GFP) ile etiketlemek için stop kodonsuz olarak klonlandı.

3.6.3.6.1. Primer Dizaynı

Klonlama için aşağıdaki tablodaki primerler dizayn edildi. Genin kodlayan kısımları ENSEMBL ve NCBI veritabanları kullanılarak bulundu. Primer başlarına arzu edilen memeli vektörüne uygun olarak enzim kesim bölgeleri eklendi. Stop kodonlu için EcoRI ve EagI enzim kesim bölgeleri eklenirken, GFP etiketli için BamHI ve EcorI enzim kesim bölgeleri primerlere eklendi. Forward primerlere CCACC kozak sekansı eklendi. Genlerin kodlayan kısımlarından en az 18 baz alınarak primer sonlarına eklendi. Primer başlarına enzimlerin rahat tutunabilmesi için fazladan 5 baz Adenin eklendi.

Tablo 4. Klonlama için kullanılan primerler

Genler	Primer Yönü	Primer Sekansları
z_p2rx8	Forward	AAAAAGAATTCCCACCATGGCTCGACGGTGCAGTAATC
	Reverse	AAAAACGGCCGTCAGTGACTGAACTTTCTTTTCG
z_p2rx8 (GFP etiketli)	Forward	AAAAAGGATCCCCACCATGGCTCGACGGTGCAGTAATC
	Reverse	AAAAAGAATTCGTGACTGAACTTTCTTTTCGAATG

z_p2rx8 (HA etiketli)	Reverse	AAAAATCTAGACTAAGCGTAGTCAGGTA- -CATCGTAAGGGTAGTGAAGTTTCT
h_p2rx5	Forward	AAAAAGAATTCCACCATGGGGCAGGCGGGCTGCAA
	Reverse	AAAAACTCGAGTCACGTGCTCCTGTGGGGCT
h_p2rx5 (GFP etiketli)	Reverse	AAAAAGGCGCGCCCGTGCTCCTGTGGGGCTCCA
h_p2rx5 (Myc etiketli)	Forward	AAAAAGGATCCACCATGGGGCAGGCGGGCTGCAA
	Reverse	AAAAAATCGATACGTGCTCCTGTGGGGCTCCA
z_p2rx5	Forward	AAAAAGGATCCACCATGGCTCAGACCTGGGGTAAC
	Reverse	AAAAATCTAGACTACTGGTGGCGTGCTGCTCT
z_p2rx5 (GFP etiketli)	Reverse	AAAAAGAATTCCTGGTGGCGTGCTGCTCTCAA
z_p2rx5 (Myc etiketli)	Reverse	AAAAAATCGATTCTGGTGGCGTGCTGCTCTCAA
z_p2rx1	Forward	AAAAGAATTCCACCATGACTAGGATGAAATCTGCAAT
	Reverse	AAAACCTCGAGTCACTCCTTCTGTGACTCGCT
z_p2rx2	Forward	AAAAGAATTCCACCATGGGTTGTCTGGAGTTCCTCAAAG
	Reverse	AAAACCTCGAGTTATAAGGGTACGCCATCTGACAGGT
z_p2rx3a	Forward	AAAAGAATTCCACCATGGCTCCCAGAGTGCTGGGCTT
	Reverse	AAAACCTCGAGTCACTCCTGACGCCCAATAGA
z_p2rx3b	Forward	AAAAGAATTCCACCATGCAGCAGTGCTCTGGAAAAATG
	Reverse	AAAACCTCGAGTTAGCTGTAACGTTGATGGA
z_p2rx4a	Forward	AAAAGAATTCCACCATGAGCGAAAGTGTTGGTTGCT
	Reverse	AAAACCTCGAGCTATTTGTCTTCGTTGTGTAAAAGTC
z_p2rx4b	Forward	AAAAGGATCCACCATGGGCTGTTCTGCTTATTGCTT
	Reverse	AAAACCTCGAGTCAAGGAGTCCCGTATGAGCTCT
z_p2rx7	Forward	AAAAGAATTCCACCATGCCTTGCGTTTTGCTGAAC
	Reverse	AAAACCTCGAGTCATCTGTTGACCTCTGTCTGAGAC

3.6.3.6.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Elde edilen cDNA ve dizayn edilen primerler ile Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase (Katalog #M0530S) kullanılarak polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) kuruldu.

<u>Reaksiyon başına bileşenler</u>		
5X HF Buffer	4 µL	1X
10 mM dNTP	0,4 µL	200 µM
Forward primer	0,5 µL	250 nM
Reverse primer	0,5 µL	250 nM
Template (cDNA)	1 µL	
Phusion DNA Polymerase	0,2 µL	0,4 ünite
Nükleaz-sız su	13,4 µL	
Toplam hacim	20 µL	

Daha sonra karışım termal döngüleyicide aşağıdaki sıcaklık ve süre boyunca inkübe edildi.

<u>Reaksiyon Protokolü</u>		
İlk denatürasyon	98°C	30 saniye
Denatürasyon	98°C	10 saniye
Yeniden Birleşme	60°C	30 saniye
Uzama	72°C	40 saniye
Son uzama	72°C	7 dakika

} 35 döngü

4°C'de kısa süreli olarak saklandı. Uzun süre saklamak için -20°C'ye konuldu.

3.6.3.6.3. Restriksiyon Enzimleri ile Kesim

PZR ürünleri ve vektörler uygun enzimlerle birlikte kesildi.

Reaksiyon başına bileşenler	
10X Fast Digest Buffer	2 µL
DNA (1 µg olacak şekilde)	x µL
Enzimler	0,7 µL/0,7 µL (her birinden)
Nükleaz-sız su	x µL
Toplam hacim	20 µL

Kurulan reaksiyon daha sonra 37°C'de 1 saat boyunca inkübe edildi.

3.6.3.6.4. Ligasyon

Kesilen PZR ürünleri ve vektörler arasında T4 DNA Ligase (Katalog #G467) ile ligasyon reaksiyonu kuruldu. Miktarlar için aşağıdaki hesaplamadan yararlanıldı.

$$\frac{\text{Insert uzunluğu} \times 50 \text{ ng}}{\text{Vektör uzunluğu}} \times 3 = \text{Insert ng}$$

Örneğin p2rx8 geni için PZR ürünü restriksiyon enzimi kesimi sonucu uzunluğu 1184 baz çifti iken vektörün restriksiyon enzimi kesimi sonucu uzunluğu 3140 baz çiftidir. 50 ng vektör kullandığımızda ve 1:3 oranında insert koymak istediğimizde;

$$\frac{1184 \times 50 \text{ ng}}{3140} \times 3 = 56,6 \text{ ng insert kullanmamız gerekir.}$$

Hesaplamalardan sonra ligasyon reaksiyonu kuruldu.

<u>Reaksiyon başına bileşenler</u>	
Vektör	x µL (50 ng)
Insert	x µL (56,6 ng)
T4 DNA Ligase	1 µL
5X Ligation Buffer	2 µL
Toplam hacim	10 µL

Kurulan reaksiyon daha sonra ya oda sıcaklığında 1 saat boyunca ya da tüm gece boyunca 16°C'de inkübe edildi.

3.6.3.6.5. Transformasyon

1. Kimyasal kompetent *Escherichia coli* (*E.coli*) hücreleri -80°C'den alınarak buz üzerinde eritildi.
2. Her bir ligasyon ürününden 3 µL alınarak 50 µL bakteri üzerine eklendi ve ependorf tüpüne parmakla yavaşça vurularak karıştırıldı.
3. Bakteri ve DNA karışımı buz üzerinde 20 dakika daha inkübe edildi.
4. Isı şoku yapmak için ependorf tüpü buz üzerinden alınarak 42°C'de 45 saniye inkübe edildi ve ardından hemen buz üzerine konularak 2 dakika inkübe edildi.
5. Çalışma ortamı steril edildikten sonra ateş etrafında 450 µL LB solüsyonu eklendi ve 37°C'de 1 saat boyunca sallanarak inkübe edildi.
6. Daha sonra ependorf tüpünden 100 µL bakteri alınarak uygun antibiyotikli LB agar plağı üzerine ekildi ve 37°C'de gece boyunca (yaklaşık olarak 16-18 saat) sallanarak inkübe edildi.

3.6.3.6.6. Tek Koloni Seçimi ve Plasmid İzolasyonu

Transformasyondan sonraki gün sabah LB agar plaklar 37°C inkübatörden alınarak parafilm ile sarılıp 4°C'ye konuldu. Öğleden sonra ateş etrafında plaklar

üzerinden pipet tipi ucu ile tek koloniler seçilerek 50 mL falkon tüp içindeki uygun antibiyotikli 5 mL LB solüsyonu içerisine konuldu. Daha sonra 37°C'de gece boyunca (yaklaşık olarak 16-18 saat) sallanarak inkübe edildi.

Macherey-Nagel NucleoSpin Plasmid Miniprep Kiti (Katalog #740588.50) protoküle uygun olarak izolasyon yapıldı ya da manuel plasmid izolasyonu yapıldı.

3.6.3.6.6.1. Manuel Plasmid İzolasyonu

1. Falkon içinde büyüyen bakteriler 37°C inkübatörden alındı ve 10 dakika boyunca 3500 rpm'de santrifüj edilerek pelet haline getirildi. Supernatant atıldı.
2. Peletler, 250 µL P1 solüsyonu içerisinde çözüldü ve ependorf tüplerine aktarıldı.
3. 250 µL P2 solüsyonu eklendikten sonra ependorf tüpleri nazikçe alt üst edilerek karıştırıldı ve 3 dakika inkübe edildi.
4. Sürenin bitmesine dikkat edilerek hemen 300 µL P3 solüsyonu eklendi ve ependorf tüpleri hemen alt üst edilerek karıştırıldı.
5. Tüpler daha sonra 13 000 rpm'de 8 dakika boyunca santrifüj edildi.
6. Supernatant (yaklaşık olarak 700 µL) yeni bir ependorf tüpüne aktarıldı ve üzerine 500 µL isopropanol eklendi. Tüpler alt üst edilerek karıştırıldı.
7. Tüpler daha sonra 4°C'de 13 000 rpm'de 15 dakika boyunca santrifüj edildi.
8. Supernatant atıldı ve pelet %75 etanol ile yıkandı.
9. Daha sonra pellet Vacum Cleaner ile kurutulduktan sonra 50 µl of DNase/RNase-siz su ile çözüldü.
10. İzole edilen DNA örneklerinin konsantrasyon ve saflıkları NanoDrop'da 260nm ve 280nm'deki absorbanlarına bakılarak spektrofotometrik olarak ölçüldü.
11. Elde edilen DNA ya direk bir sonraki deneyler için kullanıldı ya da -20°C'de ileriki deneyler için saklandı.

3.6.3.7. Hücre Kültürü

HEK293T (insan embriyonik kök hücresi) ve SH-SY5Y (insan nöroblastoma hücresi) ve L-hücreleri (fare fibroblast hücresi) kullanıldı. HEK293T ve L-hücreleri için DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (Gibco Katalog #41965-039) kullanılırken SH-SY5Y hücreleri için DMEM/F12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12) (Gibco Katalog #1623179) besiyerleri kullanıldı. Tüm besiyerlere ek olarak %10 FBS (Fetal Bovine Serum) (Biological Industries Katalog #04-222-1A-US) ve %1 P/S (Penicillin-Streptomycin) (Gibco Katalog #15140122) eklendi. Tüm hücreler 37°C'de %5 CO₂ içeren inkübatörde büyütüldü.

3.6.3.7.1. Hücrelerin Açılması

1. Krayotüp içerisinde sıvı nitrojen tankında saklanan hücreler alındı ve 37°C su banyosuna erimeleri için konuldu.
2. 15 mL falkon tüp içerisine 9 mL tam besiyeri konuldu ve hücreler erir erimez bu besiyer içine dökülüp, falkon alt üst edilerek karıştırıldı.
3. Daha sonra hücreler 1500 rpm'de 5 dakika boyunca döndürülerek pelet haline getirildi.
4. Üstte kalan besiyer aspiratör yardımıyla uzaklaştırıldıktan sonra pelet 5 mL tam besiyeri içinde çözüldü.
5. Hücre solüsyonu T-25 flask içerisine aktarıldı ve hücrelerin homojen şekilde dağılması için sağ-sol ve yukarı-aşağı yönlerinde sallandı.
6. Flask 37°C'de %5 CO₂ içeren inkübatöre konuldu ve %90-%100 doluluk oranına gelene kadar büyütülüp daha pasajlandı.

3.6.3.7.2. Hücrelerin Pasajlanması

1. Hücreler %90-%100 doluluk oranına geldiğinde tüm besiyeri uzaklaştırıldı ve hücreler 2-3 mL PBS ile yıkandı.

2. Hücreler üzerine 1 mL Trypsin-EDTA (0.25%), phenol red (Gibco Katalog #25200-056) eklendi ve hücrelerin yüzeyden kalkmaları sağlandı.
3. 9 mL tam besiyeri eklenerek hücreler serolojik pipet ile homojenize edildi.
4. Hücre tipine de göre değişerek 1:10 ya da 1:5 oranında hücreler pasajlandı. 1:10 oranında pasajlamak için toplam 10 mL içerisinde çözünen hücrelerden 1 mL alındı (1:5 oranında için 2 mL alındı) ve 11-12 mL tam besiyeri içeren 10 cm² flask içine aktarıldı. Hücrelerin homojen şekilde dağılması için sağ-sol ve yukarı-aşağı yönlerinde sallandı.
5. Flask 37°C'de %5 CO₂ içeren inkübatöre konuldu ve %90-%100 doluluk oranına gelene kadar büyütülüp daha pasajlandı.

3.6.3.7.3. Hücre Sayımı

1. Hücreler %90-%100 doluluk oranına geldiğinde tüm besiyeri uzaklaştırıldı ve hücreler 2-3 mL PBS ile yıkandı.
2. Hücreler üzerine 1 mL Trypsin-EDTA (0.25%) eklendi ve hücrelerin yüzeyden kalkmaları sağlandı.
3. 9 mL tam besiyeri eklenerek hücreler serolojik pipet ile homojenize edildi.
4. Bu sırada 50 µL trypan mavisini ile 100 µL PBS karıştırıldı. Karışımın içine 50 µL hücre solüsyonundan eklendi.
5. Bu karışımdan 10 µL alındı ve hemositometre (sayım lamı) üzerine konuldu.
6. Hemositometre üzerindeki 5 alan sayıldı ve toplam hücre sayısı hesaplandı.

$$\text{Toplam hücre/mL} = \text{Sayılan toplam hücre} \times \frac{\text{Dilüsyon faktörü}}{\text{Sayılan kareler}} \times 10^4 \text{ hücre/mL}$$

3.6.3.7.4. Hücrelerin Dondurulması

1. Hücreler %90-%100 doluluk oranına geldiğinde tüm besiyeri uzaklaştırıldı ve hücreler 2-3 mL PBS ile yıkandı.
2. Hücreler üzerine 1 mL Trypsin-EDTA (0.25%) eklendi ve hücrelerin yüzeyden kalkmaları sağlandı.

3. 9 mL tam besiyeri eklenerek hücreler serolojik pipet ile homojenize edildi.
4. Daha sonra hücreler 1500 rpm'de 5 dakika boyunca döndürülerek pelet haline getirildi.
5. Üstte kalan besiyer aspiratör yardımıyla uzaklaştırıldıktan sonra pelet 5 mL dondurma solüsyonu içinde (%90 FBS ve %10 DMSO) içinde çözüldü.
6. Daha sonra hücrelerin tipi ve sayısına göre krayotüplere 1 mL hücre solüsyonu aktarıldı.
7. Krayotüpler 1 saat -20°C'de tutulduktan sonra gece boyu -80°C'de tutuldu. Ertesi gün krayotüpler sıvı nitrojen tankına aktarıldı.

3.6.3.7.5. Wnt3a Koşullu Ortamının Hazırlanması

1. Krayotüp içerisinde sıvı nitrojen tankında saklanan fare L-Wnt3a hücreleri ve fare L-hücreleri ilk önce T25 flask içerisine açıldı.
2. Hücreler %90-%100 doluluk oranına ulaştığında 5 tane 10 cm² flask içerisine pasajlandı.
3. Pasajlanan hücreler %100 doluluk oranına ulaştığında üzerindeki besiyer aspiratör yardımıyla alındı ve yeni tam besiyer eklendi. Bu işlemin yapıldığı zaman Gün 0 olarak adlandırıldı.
4. Daha sonra Gün 2'de hücrelerin üzerindeki ortam alındı ve içerisindeki hücreler 1500 rpm'de 5 dakika boyunca döndürülerek pelet haline getirildi. Süpernatant bir cam şişe içerisine alındı.
5. Aynı işlem Gün 4'te ve Gün 6'da da yapıldı ve toplanan ortamlar karıştırıldıktan sonra kısa süreli olarak 4°C'de, uzun süreli olarak -20°C'de saklandı.
6. Fare L-hücrelerinden toplanan ortamlar kontrol ortamı olarak kullanılırken, fare L-Wnt3a hücrelerinden toplanan ortamlar Wnt/ β -katenin sinyal iletim yolağını indüklemek için kullanıldı.

3.6.3.8. Lüsiferaz Raportör Analizi

3.6.3.8.1. Transfeksiyon

1. 100.000 HEK293T hücresi transfeksiyon öncesi gün 24-kuyulu plate'e ekildi.
2. Ertesi gün, firefly lüsiferaz geni öncesi TCF bağlanma bölgesini içeren plasmid (plasmid#587), renilla lüsiferaz geni öncesi kontrol promoter içeren plasmid (plasmid#652) ve purinerjik reseptörleri içeren plasmidler sırasıyla karıştırıldı. Kontrol olarak purinerjik reseptör içeren plasmid yerine GFP plasmidi kullanıldı. Transfekte edilen DNA miktarını eşitlemek için pCS2P+ boş vektörü (plasmid#112) kullanıldı.

GFP	75 ng	p2rx1	200 ng
587	20 ng	587	20 ng
652	5 ng	652	5 ng
112	125		

3. Yukarıdaki gibi tüm purinerjik reseptörler için kuyucuk başına transfeksiyon edilecek DNA miktarı hesaplandı ve hazırlandıktan sonra DMEM ile 20 µL'ye tamamlandı.
4. 19,3 µL DMEM ile 0,7 µL Lipofectamine 2000 (Thermo Fisher Scientific Katalog#11668019) kuyucuk başına karıştırıldı.
5. Daha sonra Lipofectamine ve DMEM karışımı, DNA karışımı ile birleştirildi. 30 dakika oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra kuyucuk başına 40 µL transfeksiyon karışımı hücrelerin üzerine eklendi.
6. Plate 37°C'de %5 CO2 içeren inkübatöre konuldu ve ertesi gün ortam alınarak yerine tam besiyer konuldu.

3.6.3.8.2. Wnt3a Koşullu Ortam ile İndüksiyon

1. Transfeksiyondan 2 gün sonra hücrelerin üzerindeki ortam aspiratör yardımıyla alındı. Kontrol grubuna, kuyu başına 37°C su banyosunda ısıtılmış 500 µL fare L-hücrelerinden elde edilen ortam konuldu.
2. Wnt/β-katenin sinyal iletim yolağının indüklenmesi istenilen kuyulara ise kuyu başına 37°C su banyosunda ısıtılmış 500 µL fare L-Wnt3a hücrelerinden elde edilen ortam konuldu.
3. Ortamlar değiştirildikten sonra plate'ler tekrar 37°C'de %5 CO₂ içeren inkübatöre konuldu ve 6 saat inkübe edildi.

3.6.3.8.3. Lüminometrik Analiz

1. Hücreler Wnt3a koşullu ortam ile indüklendikten sonra hücreler üzerindeki ortamlar aspiratör yardımıyla alındı ve 2-3 mL PBS ile yıkandı.
2. Bu sırada 5X Pasif Liziz Solüsyonu, otoklavlanmış distile su ile 1X'e seyreltildi.
3. 24-kuyudaki hücrelere, kuyu başına 100 µL 1X Pasif Liziz Solüsyonu eklendi ve oda sıcaklığında 15 dakika sallanarak inkübe edildi.
4. Liziz olan hücreler ependorf tüplerine aktarıldı ve hücre peletinin çökmesi için santrifüjde çok kısa döndürüldü.
5. Ependorf tüplerinden 20'şer µL alınarak, Greiner 96-kuyulu beyaz plate'e aktarıldı.
6. Daha sonra Luminometre Cihazı yanında ilk önce kuyu başına 50 µL LARII solüsyonu eklendi ve ışıma ölçüldü.
7. Ardından kuyu başına 50 µL Stop&Glo solüsyonu eklendi ve cihazda tekrar ışıma ölçüldü.
8. Elde edilen değerler cihazdan alınarak analiz edildi.

3.6.3.9. RNA Prob Sentezi

1. İlk olarak arzu edilen anti sense RNA prob'un sentezlenmesi için uygun vektör uygun enzim ile lineer hale getirildi. Bunun için;

Reaksiyon başına bileşenler

10X Fast Digest Buffer	5 µL
DNA (5 µg olacak şekilde)	x µL
Enzim	1 µL
Nükleaz-sız su	x µL
Toplam hacim	50 µL

2. Kurulan reaksiyon daha sonra 37°C'de 1 saat boyunca inkübe edildi.
3. Lineer hale getirilen vektörü içeren tüm reaksiyon %1 agaroz jelde 90 Voltta 40 dakika boyunca yürütüldükten sonra vektörün olduğu kısım agaroz jelden kesildi ve Gel Extraction Kit (Macherey-Nagel Katalog #740609.50) ile izole edildi.
4. Rna prob için şu reaksiyon kuruldu;

Reaksiyon başına bileşenler

5X Transcription Buffer	4 µL
DIG Labelling Mix	2 µL
Rnase I	1 µL
T7 RNA Polymerase	1 µL
Lineer DNA	x µL
Nükleaz-sız su	x µL
Toplam hacim	20 µL

5. Reaksiyon kurulduktan sonra 37°C'de 2 saat boyunca inkübe edildi.
6. Sonra karışıma 1 µL DNaz I eklendi ve 37°C'de 15 dakika daha inkübe edildi.
7. Reaksiyondan 1 µL, %1 formaldehit agaroz jel ile RNA 90 Voltta 40 dakika boyunca yürütüldükten sonra görüntülendi.
8. Kalan RNA için Zymo Research Direct-zol™ RNA MiniPrep Kiti ile izolasyon gerçekleştirildi.
9. RNA konsantrasyon ve saflıkları NanoDrop'da 260nm ve 280nm'deki absorbanslarına bakılarak spektrofotometrik olarak ölçüldükten sonra son konsantrasyonu 50 ng/µL olacak şekilde hibridizasyon solüsyonu ile seyreltilti.

10. Örnekler daha sonra in situ hibridizasyon tekniğinde kullanılmak üzere -20°C'de saklandı.

3.6.3.10. In Situ Hibridizasyon

1. Fiksasyon yapılması istenilen embriyolar %4 PFA solüsyonu içerisinde 4°C'de gece boyu inkübe edildi.
2. Döllenen sonra 24 saat öncesi embriyoların koryonlarının çıkarılması fiksasyon işleminden sonra yapıldı.
3. Döllenen sonra 24 saat sonrası embriyoların koryonlarının çıkarılması ise fiksasyon işleminden önce yapıldı. Bunun için embriyolar 1 mg/mL pronase enzimi içeren embriyo ortamında oda sıcaklığında yaklaşık olarak 10 dakika inkübe edildi. Ardından 3 kere ortam değiştirilerek enzim uzaklaştırıldı ve fiksasyon işlemi gerçekleştirildi.
4. Fiksasyondan sonraki gün embriyolar 2 kere PBST solüsyonu içerisinde yıkandı.
5. Ardından embriyolar adım adım metanollendi. İlk olarak %25 Metanol + %75 PBST solüsyonu içerisinde 5 dakika inkübe edildi. Sonra %50 Metanol + %50 PBST solüsyonu içerisinde 5 dakika inkübe edildi. %75 Metanol + %25 PBST solüsyonu içerisinde de 5 dakika inkübe edildikten sonra son olarak %100 metanol içerisine alındı. Bu aşamadan sonra embriyolar ya hemen kullanıldı ya da daha sonra kullanılmak üzere -20°C'de saklandı.

In Situ Hibridizasyon – Gün 1

1. Embriyolara ilk olarak rehidrasyon yapıldı. Bunun için embriyolar adım adım PBST içine alındı. İlk olarak %75 Metanol + %25 PBST solüsyonu içerisinde 5 dakika inkübe edildi. Sonra %50 Metanol + %50 PBST solüsyonu içerisinde 5 dakika inkübe edildi. %25 Metanol + %75 PBST solüsyonu içerisinde de 5 dakika inkübe edildikten sonra son olarak %100 PBST içerisinde 4 kere 5 dakikada bir solüsyon değiştirilerek inkübe edildi.

2. Embriyolar daha sonra Proteinaz K ile inkübe edildi. İnkübasyon zamanı aşağıdaki tabloya göre belirlendi.

Tablo 5. Embriyoların Proteinaz K ile inkübasyon zamanları

Gastrulasyon	Bu evre için gerekli değil.	
1 somit	5 µg/mL	3 dakika
15 somitler	5 µg/mL	5 dakika
24 saat	10 µg/mL	5 dakika
36 saat	10 µg/mL	6 dakika

3. İnkübasyondan sonra embriyolar 2 kere PBST ile yıkandı ve enzim uzaklaştırıldı.
4. Daha sonra embriyolar %4 PFA solüsyonu ile oda sıcaklığında sallanarak 20 dakika boyunca inkübe edildi ve tekrar fiksasyon işlemi yapıldı.
5. Ardından embriyolar 5 kere PBST içerisinde 5 dakikada bir solüsyon değiştirilerek yıkandı.
6. Prehibridizasyon işlemi yapıldı. Bunun için embriyolar 1 mL hibridizasyon solüsyonu içerisinde 67°C su banyosunda 3 saat boyunca inkübe edildi.
7. Bu aşamadan sonra embriyolar istenilirse bir kaç hafta boyunca -20°C'de saklanabilir.
8. Hibridizasyon işlemini gerçekleştirmek için tüp başına kullanılmak istenilen RNA prob'tan 200 ng alındı ve hibridizasyon solüsyonu ile 200 µL'ye tamamlandı. Yani son konsantrasyonu 1 ng/µL oldu.
9. Embriyolar üzerinden hibridizasyon solüsyonu alındı ve önceden 67°C'ye ısıtılan RNA prob ve hibridizasyon solüsyonu karışımı eklendi.
10. Embriyolar gece boyu 67°C su banyosunda inkübe edildi.

In Situ Hibridizasyon – Gün 2

1. Embriyolar üzerinden RNA prob ve hibridizasyon solüsyonu karışımı alındı ve daha sonra tekrar kullanılmak üzere -20°C'de saklandı.

2. Yıkama işlemlerine başlandı. Embriyolar ilk olarak önceden 67°C'ye ısıtılan 1 mL hibridizasyon solüsyonu ile 20 dakika 67°C su banyosunda inkübe edilerek yıkandı.
3. Ardından önceden 67°C'ye ısıtılan 1 mL %50 2X SSCT + %50 Formamide ile 20 dakika 67°C su banyosunda inkübe edilerek yıkandı. Bu işlem toplam 3 kere tekrarlandı.
4. Sonra önceden 67°C'ye ısıtılan 1 mL 2X SSCT ile 20 dakika 67°C su banyosunda inkübe edilerek yıkandı. Bu işlem toplam 2 kere tekrarlandı.
5. Önceden 67°C'ye ısıtılan 1 mL 0,2X SSCT ile 30 dakika 67°C su banyosunda inkübe edilerek yıkandı. Bu işlem toplam 4 kere tekrarlandı.
6. Bu işlemlerden sonra artık embriyolar oda sıcaklığında PBST içerisinde 5 dakika yıkandı.
7. Embriyolar in situ bloklama solüsyonu ile 1 saat oda sıcaklığında yavaşça sallanarak inkübe edildi.
8. Daha sonra embriyolar 200 µL antikor solüsyonu içerisinde gece boyu 4°C'de inkübe edildi.
9. Antikor solüsyonunun hazırlanması için Bovine Serum Albumin (Amresco Katalog #0332-100G) son konsantrasyonu 2 mg/mL olacak şekilde PBST içerisinde çözüldü. Bu solüsyonun içerisine 1:4000 oranında Anti-Digoxigenin-AP (Roche Katalog #12486520) eklendi.

In Situ Hibridizasyon – Gün 3

1. Embriyolar üzerinden antikor solüsyonu karışımı alındı ve daha sonra tekrar kullanılmak üzere 4°C'de saklandı.
2. Yıkama işlemlerine başlandı. Embriyolar oda sıcaklığında 1 mL PBST ile 20 dakika boyunca sallanarak yıkandı. Bu işlem toplam 3 saat olacak şekilde 8 kere daha tekrarlandı.
3. Ardından taze olarak NTMT solüsyonu hazırlandı ve embriyolar NTMT solüsyonu içerisinde 3 kere 5 dakikada bir solüsyon değiştirilerek inkübe edildi.
4. Son yıkamada embriyolar 24-kuyulu plate'e aktarıldı.

5. Boyama solüsyonu, 1 mL NTMT içerisine 3,5 µL NBT ve 3,5 µL BCIP konulup karıştırılarak taze olarak hazırlandı.
6. Embriyolar üzerine kuyu başına 500 µL boyama solüsyonu eklendi ve karanlıkta inkübasyon gerçekleştirildi.
7. Boyama ara ara mikroskoptan kontrol edildi ve tamamlandığında embriyolar ependorf tüplerine aktararak 2 kere hızlıca PBST ile yıkandı ve boyama durduruldu.
8. Ardından STOP solüsyonu içerisinde oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi.
9. Embriyolar tekrar 2 kere hızlıca PBST ile yıkandıktan sonra %80 Gliserol + %20 STOP solüsyonu karışımına aktarıldı ve fotoğrafları çekildi.
10. Uzun süreli saklamak için 4°C'ye konuldu.

3.6.3.11. Mikroenjeksiyon

1. Mikroenjeksiyon işleminden bir gün önce balıklar çiftleştirilmek üzere kuruldu.
2. Ertesi gün dişi ve erkek balıkların arasındaki engel kaldırıldı ve çiftleşmeleri için bırakıldı.
3. Bu sırada mikroenjeksiyon için gerekli malzemeler hazırlandı. Cam mikroenjeksiyon iğneleri ve embriyoları hizalamak için agar tabaka hazırlandı.
4. Embriyolar toplandıktan sonra tek hücreliyen mikroenjeksiyon yapıldı.



Şekil 4. Tek hücreli zebrabalığı embriyosuna mikroenjeksiyon gösterimi ve agar tabaka [100]

3.6.3.12. *İn vitro* transkripsiyon

1. mMESSAGE mMACHINE® SP6 Transcription Kit (Katalog #AM1340) kullanılarak başlıklı (capped) RNA sentezi gerçekleştirildi.
2. mRNA'nın üretilmesi istenilen vektör uygun restriksiyon enzimiyle lineer hale getirildi ve aşağıdaki reaksiyon kuruldu.

Reaksiyon başına bileşenler

2X NTP/CAP	10 µL
10X Reaction Buffer	2 µL
SP6 Enzyme Mix	2 µL
Lineer DNA (1 µg)	x µL
Nükleaz-sız su	x µL
Toplam hacim	20 µL

3. Reaksiyon kurulduktan sonra karışım 2 saat boyunca 37°C'de inkübe edildi.
4. Ardından karışıma 1 µL TurboDNase eklendi ve 15 dakika daha 37°C'de inkübe edildi.
5. Sentezlenen mRNA, RNA izolasyon kiti ile izole edildi ve örneklerin konsantrasyon ve saflıkları NanoDrop'da 260nm ve 280nm'deki absorbanslarına bakılarak spektrofotometrik olarak ölçüldü.
6. Elde edilen mRNA -80°C'de ileriki deneyler için saklandı.

3.6.3.13. *TA Klonlama*

1. Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase ile elde edilen PZR ürünü NucleoSpin Gel and PCR Clean-up kiti (Macherey-Nagel Katalog #740609.50) ile izole edildi.
2. İzolasyondan sonra Phusion DNA Polimerazın düzeltme okuması olduğu için düzeltme okuması olmayan Taq DNA Polymerase (Geneaid Katalog #XN18104) ile aşağıdaki reaksiyon kuruldu.

<u>Reaksiyon başına bileşenler</u>		
10X Reaction Buffer	2 µL	1X
10 mM dNTP	0,4 µL	200 µM
PZR ürünü	15 µL	
MgCl ₂	0,8 µL	2 mM
Taq DNA Polymerase	0,25 µL	1,25 ünite
Nükleaz-sız su	1,55 µL	
Toplam hacim	20 µL	

3. Kurulan reaksiyon 72°C'de 20 dakika inkübe edildi ve sonra aşağıdaki reaksiyon pGEM-T Easy Vector System I kiti (Promega Katalog #A1360) ile kuruldu.

<u>Reaksiyon başına bileşenler</u>		
2X Rapid Ligation Buffer	5 µL	1X
pGEM-T Easy Vektör	1 µL	50 ng
PZR ürünü	3 µL	
T4 Ligase	1 µL	3 ünite
Toplam hacim	10 µL	

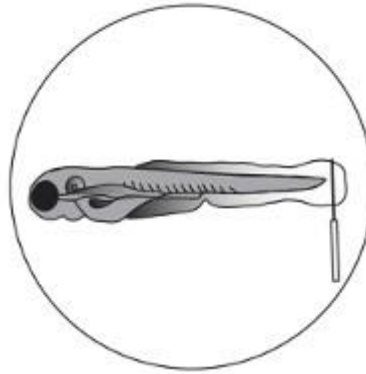
4. Kurulan reaksiyon ya oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi ya da gece boyu 4°C'de inkübe edildi.
5. Ligasyon ürünü için transformasyon yapıldı. Ancak farklı olarak, bakterileri LB agar plate üzerine ekmeden yaklaşık 30 dakika önce plate'ler üzerine 40 µL (100mM IPTG) ve 120 µL X-Gal (20 mg/mL) yayıldı ve kurutuldu.
6. Ertesi gün plate'den mavi (yanlış) koloniler değil, beyaz (doğru) koloniler seçildi.
7. Ardından tek koloni seçimi ve plasmid izolasyon işlemleri yapıldı.

3.6.3.14. Dokun – Uyar (Touch – Evoke) Deneyi

1. Embriyolara tek hücreliyen mikroenjeksiyon yöntemiyle genlerin sentezlenen mRNA'ları verildi.
2. Döllenmeden 48 saat sonra larvaların kuyruklarına ince bir şiş ucu ile hafifçe dokunuldu ve yüzmeleri için uyarıldı.
3. Larvaların yüzmeleri mikroskop altında vidyoya alındı ve daha sonra imageJ programı ile 30 milisaniyede bir ekran görüntüsü alınarak larvaların yüzmeleri birbirleriyle kıyaslandı.

3.6.3.15. Larvaların Kuyruk Yüzgeçlerinin Kesilmesi

1. Embriyolara tek hücreliyen mikroenjeksiyon yöntemiyle genlerin sentezlenen mRNA'ları verildi.
2. Döllenmeden 48 saat sonra larvalara Tricaine (Mesab) ile 0.4 mM konsantrasyonunda anestezi uygulandı.
3. Larvaların kuyrukları daha sonra mikroskop altında bisturi yardımıyla kesildi.



Şekil 5. Zebrabalığı larvaları kuyruklarının kesiminin şematik gösterimi [101]

4. Kuyrukları kesilen larvalar E3 embriyo ortamına tekrar konuldu ve kuyruk rejenerasyonu izlendi.
5. Larvalar kuyruk kesiminden 1 gün sonra, 2 gün sonra ve 5 gün sonra toplanarak %4 PFA solüsyonu ile fikse edildi.

6. Fikse edilen larvalar ile in situ hibridizasyon tekniği kullanılarak genlerin aktivitelerine bakıldı.

3.6.3.16. Faloidin Boyaması

1. Embriyolara tek hücreliken mikroenjeksiyon yöntemiyle genlerin sentezlenen mRNA'ları verildi.
2. Döllenmeden 48 saat sonra embriyolar %4 PFA solüsyonu ile gece boyu fikse edildi.
3. Ertesi gün embriyolar PBST solüsyonu ile iki kere hızlıca yıkandıktan sonra PBS solüsyonu ile 5 dakika oda sıcaklığında yıkandı.
4. Ardından embriyolar %2 Triton-X 100 (PBS içinde) ile 90 dakika boyunca oda sıcaklığında çalkalanarak inkübe edildi.
5. Ardından faloidin antikoru ile 1:2000 oranında (PBS içinde) oda sıcaklığında 1 saat boyunca inkübe edildi.
6. Son olarak PBST içerisinde 3 kere 5 dakikada bir solüsyon değiştirilerek inkübe edilerek yıkandı.
7. Embriyolar %80 Gliserol + %20 PBS solüsyonu içine alınarak görüntülendi ve saklandı.

3.6.3.17. Gateway Klonlama Yöntemi

Bu klonlama yönteminde homolog rekombinasyondan yararlanılarak istenilen klon elde edildi. Arzu edilen vektöre *hsp70l* promoter bölgesinden sonra *p2rx3a* ya da *p2rx7* geni ve ardından EGFP etiketi konuldu. Bunun için 5' giriş vektöründe *hsp70l* promoter bölgesi, orta giriş vektöründe *p2rx3a* ya da *p2rx7* geni ve 3' giriş vektöründe EGFP olması dizayn edildi. Bu giriş vektörler pDestTol2CG destinasyon vektöründeki iki Tol2 bölgesinin arasına girecek şekilde dizayn edildi. Ayrıca bu destinasyon vektöründe *cm/c2* promoter bölgesinden sonra EGFP bulunması transgenik belirteç olarak kullanıldı.

Elimizde 5' giriş vektöründe *hsp70l* promoter bölgesi, 3' giriş vektöründe EGFP ve pDestTol2CG destinasyon vektörleri olduğu için orta giriş vektöründe p2rx3a ya da p2rx7 geninin olduğu vektörler klonlandı.

3.6.3.17.1. Primer Dizaynı ve PZR

Gateway klonlama yönteminde homolog rekombinasyondan yararlanarak klonlama yapıldığı için ilk önce istenilen genin kodlayan sekansı buna uygun olarak çoğaltıldı. Bunun için aşağıdaki primerler kullanılarak 2-adımlı PZR işlemi gerçekleştirildi.

Tablo 6. Gateway klonlama yönteminde kullanılan primerler

Primerler	Primer Sekansları
12 <i>attB1</i> _p2x3a	AAAAAGCAGGCTCCACCATGGCTCCCAGAGT
12 <i>attB2</i> _p2x3a	AGAAAGCTGGGTACTCCTGACGCCCAATAGA
12 <i>attB1</i> _p2x7	AAAAAGCAGGCTCCACCATGCCTTGCGTTTTGCT
12 <i>attB2</i> _p2x7	AGAAAGCTGGGTATCTGTTGACCTCTGTCTGAGAC
<i>attB1</i> adaptör primer	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGC T
<i>attB2</i> adaptör primer	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT

İlk adım olarak aşağıdaki reaksiyon 12*attB1* ve 12*attB2* primerleri ile kuruldu.

Reaksiyon başına bileşenler		
Malzemeler	Miktar	Son konsantrasyon
5X HF Buffer	10 µL	1X
10 mM dNTP	1 µL	200 µM
12 <i>attB1</i>	0,5 µL	100 nM
12 <i>attB2</i>	0,5 µL	100 nM
Template (plasmid)	1 µL	20 ng
Phusion DNA Polymerase	0,5 µL	1 ünite

Nükleaz-sız su	36,5 µL
Toplam hacim	50 µL

Daha sonra karışım termal döngüleyicide aşağıdaki sıcaklık ve süre boyunca inkübe edildi.

Reaksiyon Protokolü		
İlk denatürasyon	98°C	30 saniye
Denatürasyon	98°C	15 saniye
Yeniden Birleşme	55°C	30 saniye
Uzama	72°C	60 saniye
Son uzama	72°C	7 dakika

10 döngü

İkinci adım olarak ilk stepteki 10 döngüden elde edilez PZR ürünü, *attB1* ve *attB2* adaptör primerleri kullanılarak aşağıdaki reaksiyon kuruldu.

Reaksiyon başına bileşenler		
Malzemeler	Miktar	Son konsantrasyon
5X HF Buffer	10 µL	1X
10 mM dNTP	1 µL	200 µM
<i>attB1</i> adaptör primer	0,5 µL	100 nM
<i>attB2</i> adaptör primer	0,5 µL	100 nM
İlk adımdan PZR ürünü	10 µL	
Phusion DNA Polymerase	0,5 µL	1 ünite
Nükleaz-sız su	27,5 µL	
Toplam hacim	50 µL	

Daha sonra karışım termal döngüleyicide aşağıdaki sıcaklık ve süre boyunca inkübe edildi.

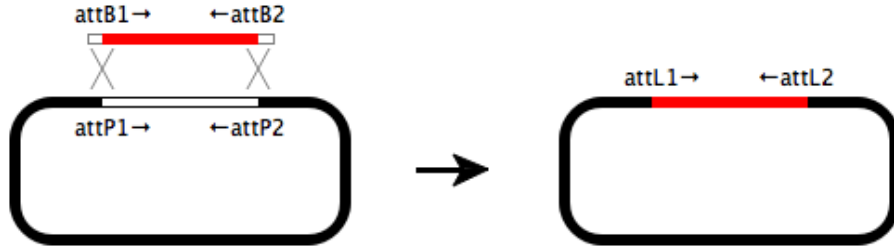
Reaksiyon Protokolü		
İlk denatürasyon	98°C	30 saniye
Denatürasyon	98°C	15 saniye
Yeniden Birleşme	45°C	30 saniye
Uzama	72°C	60 saniye
Denatürasyon	98°C	15 saniye
Yeniden Birleşme	55°C	30 saniye
Uzama	72°C	60 saniye
Son uzama	72°C	7 dakika

5 döngü

20 döngü

Son *attB* PZR ürünü 4°C'de kısa süreli olarak saklandı. Uzun süre saklamak için -20°C'ye konuldu.

3.6.3.17.2. BP reaksiyonu



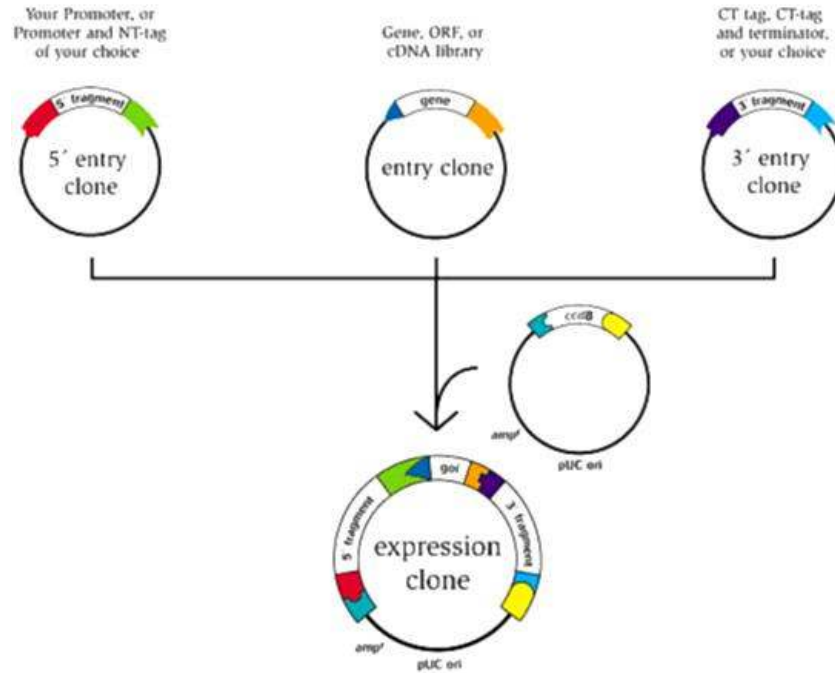
Şekil 6. BP reaksiyonu şematik gösterimi [102]

1. Elde edilen son *attB* PZR ürünü ve pDONR221 vektörü ile BP reaksiyonu kuruldu. Bu reaksiyon için Gateway® BP Clonase® II Enzyme karışımı (Invitrogen Katalog #11789020) kullanıldı.

Reaksiyon başına bileşenler		
Malzemeler	Miktarı	Son konsantrasyon
<i>attB</i> PZR ürünü	x μ L	15 ng/ μ L
pDONR221 vektörü	1 μ L	15 ng/ μ L
BP Clonase II enzyme mix (5X)	2 μ L	1X
TE Buffer	x μ L	
Toplam hacim	10 μ L	

2. Reaksiyon kurulduktan sonra oda sıcaklığında bir saat inkübe edildi.
3. Sonra karışıma 1 μ L Proteinaz K eklendi ve 37°C'de 10 dakika daha inkübe edildi.
4. Reaksiyondan 3 μ L ve *ccdB* genine karşı yaşayamayan TOP10 kompetent bakterileri ile transformasyon yapıldı.
5. Bakteriler kanamisinli LB agar plate'lere ekildi ve ardından plasmid izolasyonu gerçekleştirildi.

3.6.3.17.3. LR Reaksiyonu



Şekil 7. LR reaksiyonu şematik gösterimi [102]

1. Elde edilen orta giriş vektöründe p2rx3a ya da p2rx7 geninin olduğu vektörler ile 5' giriş vektöründe *hsp70I* promoter bölgesi, 3' giriş vektöründe EGFP ve pDestTol2CG destinasyon vektörleri ile LR reaksiyonu kuruldu.
2. Bu reaksiyon için Gateway® LR Clonase® II Enzyme karışımı (Invitrogen Katalog #11791020) kullanıldı.

Reaksiyon başına bileşenler		
Malzemeler	Miktarı	Son konsantrasyon
5' giriş vektörü	x µL	5 ng/µL
Orta giriş vektörü	x µL	5 ng/µL
3' giriş vektörü	x µL	5 ng/µL
pDestTol2CG	x µL	15 ng/µL
LR Clonase II enzyme mix (5X)	2 µL	1X
TE Buffer	x µL	
Toplam hacim	10 µL	

3. Reaksiyon kurulduktan sonra oda sıcaklığında bir saat inkübe edildi.
4. Sonra karışıma 1 µL Proteinaz K eklendi ve 37°C'de 10 dakika daha inkübe edildi.
5. Reaksiyondan 3 µL ve *ccdB* genine karşı yaşayamayan TOP10 kompetent bakterileri ile transformasyon yapıldı.
6. Bakteriler ampicilinli LB agar plate'lere ekildi ve ardından plasmid izolasyonu gerçekleştirildi.

3.7. Araştırma Planı ve Takvim

Yapılacak İşler	Aylar	Eylül 2014 - Ağustos 2016	Eylül 2016	Ekim 2016	Kasım 2016	Aralık 2016	Ocak 2017	Şubat 2017	Mart 2017	Nisan 2017	Mayıs 2017
Malzeme alımı, literatür taraması ve optimizasyon süreci		X									
Klonlama, q-PCR ve RNA Problar için primer dizaynı			X	X							
Tüm purinerjik reseptörlerin ekspresyon vektörüne klonlanması			X	X							
capped RNA'ların sentezlenmesi ve Tg(<i>7xTCF.siam:mCherry</i>) transgenik hattına mikroenjeksiyonu				X	X						
RNA problemlerin sentezlenmesi ve In situ hibridizasyon				X	X						
Purinerjik reseptörlerin Wnt üzerindeki etkisine hücre kültüründe bakılması					X	X					
Larvaların kuyruklarının kesilmesi ve In situ hibridizasyon						X	X				
Transgenik balık üretimi için klonlama yapılması							X	X			
Transgenik balık üretimi									X	X	
Verilerin toplanması, analiz edilmesi ve tez yazım aşaması									X	X	X

3.8. Verilerin Değerlendirilmesi

Primer dizaynı ve klonlamalar için National Center for Biotechnology Information (NCBI) ve ENSEMBL sitelerinden ve SnapGene programından yararlanılacaktır. Bütün deney setleri en az üç kere tekrarlanacaktır. İstatistiksel çözümler için GraphPad Prism programı kullanılacaktır. In situ hibridizasyon analizleri Student's t-test ile değerlendirilecektir. $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlılığı ifade etmektedir.

3.9. Araştırmanın Sınırlılıkları

İnsan embriyonik böbrek (HEK293T) ve insan nöroblastoma (SH-SY5Y) hücre hatlarına tüm tanımlanmış purinerjik reseptörlerin Lipofectamine® 2000 Transfection Reagent ile transfeksiyonu yapılacaktır. Ancak transfeksiyonun başarılı olamaması durumunda ya da transfeksiyon ajanının toksik olması durumunda başka bir transfeksiyon ajanı denenecektir.

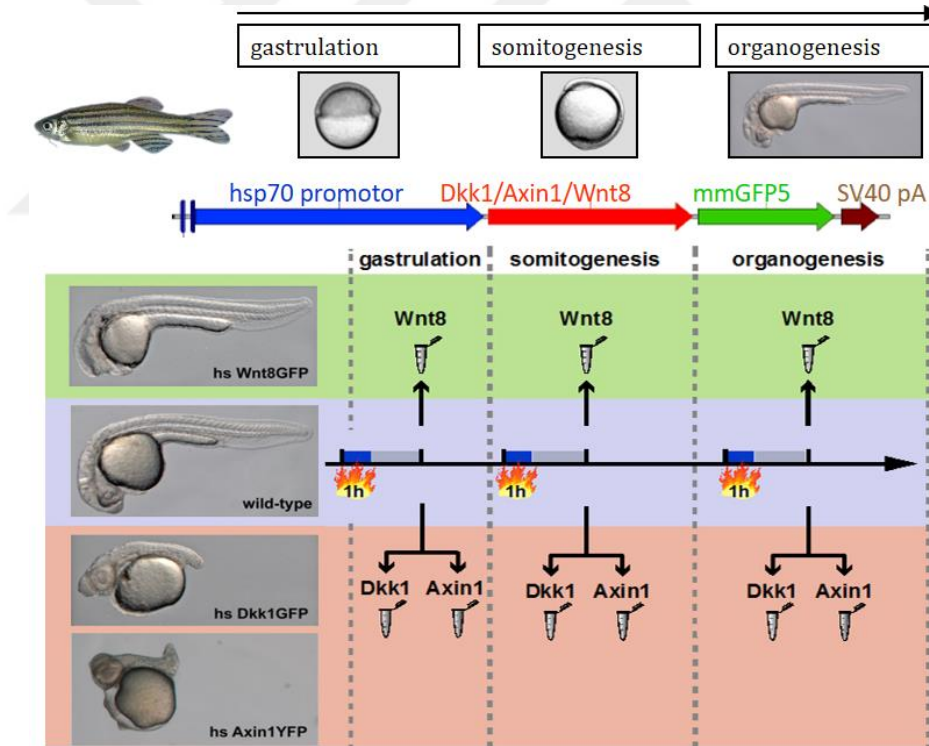
3.10. Etik Kurul Onayı

Bu tez çalışması Dokuz Eylül Üniversitesi İzmir Uluslararası Biyotıp ve Genom Enstitüsü Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (İBG-HADYEK) tarafından 29.07.2016 tarih ve 07/2016 protokol numarası ile etik açıdan sakınca olmadığına oy birliği ile karar verilmiştir. Etik Kurul İzin Belgesi ekte sunulmuştur.

4. BULGULAR

4.1. Yeni Nesil RNA Dizileme Verileri Sonucu Aday Genlerin Seçilmesi

Zebrabalığı embriyolarında gastrulasyon, somit oluşumu ve organ oluşumu gelişim evrelerinde Wnt/ β -katenin sinyal iletim yolağının manipule edildi. Bunu yapabilmek için Wnt/ β -katenin sinyal iletim yolağı aktivatörü *Tg(hs:Wnt8GFP)* zebrabalığı transgenik embriyoları, Wnt/ β -katenin sinyal iletim yolağı inhibitörü *Tg(hs:Dkk1GFP)* ve *Tg(hs:Axin1GFP)* zebrabalığı transgenik embriyoları kullanıldı. Gelişimsel süreçteki evrelerde bir saat ısı şoku verildikten iki saat sonra transgenik embriyolardan RNA izolasyonu yapıldı ve cDNA sentezlenerek sekanslamaya gönderildi (Şekil 8).



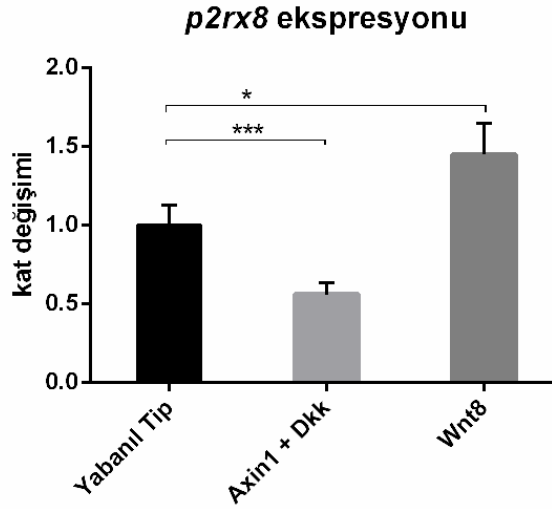
Şekil 8. Wnt/ β -katenin sinyal iletim yolağının ısı şoku transgenik embriyolarında fonksiyon kazanımı ve kaybı ile manipule edilmesi. Wnt/ β -katenin sinyal iletim yolağı inhibitör (*Tg(hs:Dkk1GFP)* ve *Tg(hs:Axin1YFP)*) ve aktivatör (*Tg(hs:Wnt8GFP)*) hatlarında ısı şoku ile indüklenerek embriyolardan gastrulasyon, somit oluşumu ve organ oluşumu evrelerinde elde edilen RNA örnekleri yeni nesil RNA dizileme için gönderildi.

Gen adı	Gen tanımı	Gastrulasyonda düzenlenmesi	Somit oluşumunda düzenlenmesi	Organ oluşumunda düzenlenmesi
BCL-2 RELATED	SUBFAMILY NOT NAMED		√	√
G-PROTEIN COUPLED RECEPTOR	NEUROTENSIN RECEPTOR TYPE 1		√	√
SERINE/THREONINE PROTEIN KINASE	SERINE/THREONINE-PROTEIN KINASE PIM-3		√	√
ARRESTIN	BETA-ARRESTIN-1	√	√	√
DISABLED/NUMB-RELATED ADAPTOR	PROTEIN NUMB HOMOLOG		√	√
EARLY GROWTH RESPONSE PROTEIN-RELATED	EARLY GROWTH RESPONSE PROTEIN 1	√	√	√
FOLLISTATIN-RELATED	FOLLISTATIN	√		√
CYSTEINE-RICH SECRETORY PROTEIN-RELATED	CYSTEINE-RICH SECRETORY PROTEIN LCCL DOMAIN-CONTAINING 2	√	√	√

Şekil 9. Yeni nesil sekanslama sonucu Wnt sinyal yolağının bir çok bilinen geribildirim düzenleyicilerinin bulunması. RNA örneklerinin yeni nesil sekanslama analizi sonucunda Wnt sinyal yolağını bilinen geribildirim yoluyla düzenleyen genler bulundu.

4.2. Wnt/ β -katenin sinyal iletim yolağının zebrabalığı p2rx8 geni ekspresyonu üzerindeki etkisine q-PCR ile bakılması

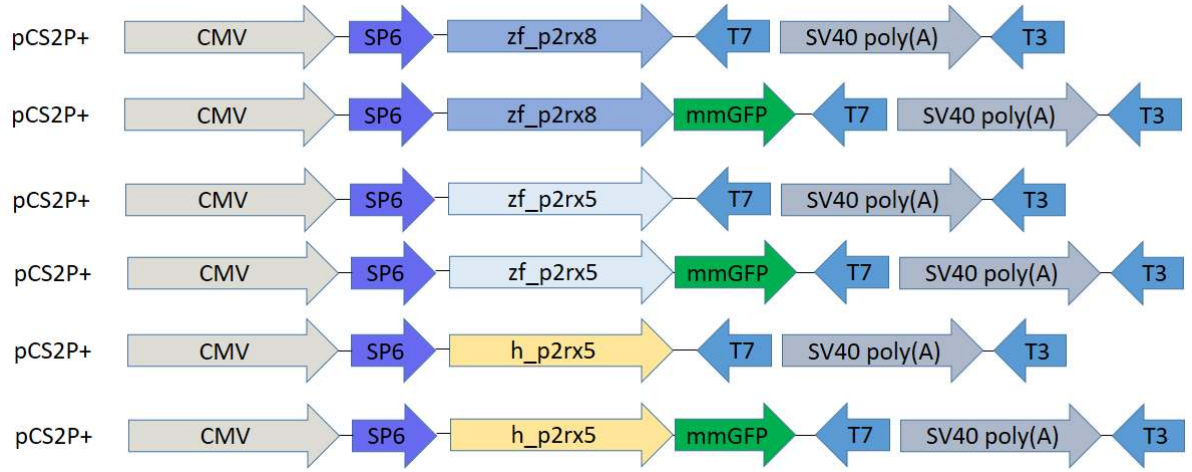
Yeni nesil RNA dizileme verileri sonucu seçilen *p2rx8* genine uygun primerlerle için Wnt/ β -katenin sinyal iletim yolağı aktivatörü *Tg(hs:Wnt8GFP)* transgenik zebrabalığı embriyoları, Wnt/ β -katenin sinyal iletim yolağı inhibitörü *Tg(hs:Dkk1GFP)* ve *Tg(hs:Axin1GFP)* zebrabalığı embriyolarından elde edilen cDNA örnekleri q-PCR yapıldı. *p2rx8* geninin ekspresyonu Wnt/ β -katenin sinyal iletim yolağı inhibe edildiğinde azalırken, Wnt/ β -katenin sinyal iletim yolağı aktive edildiğinde arttı (Şekil 10).



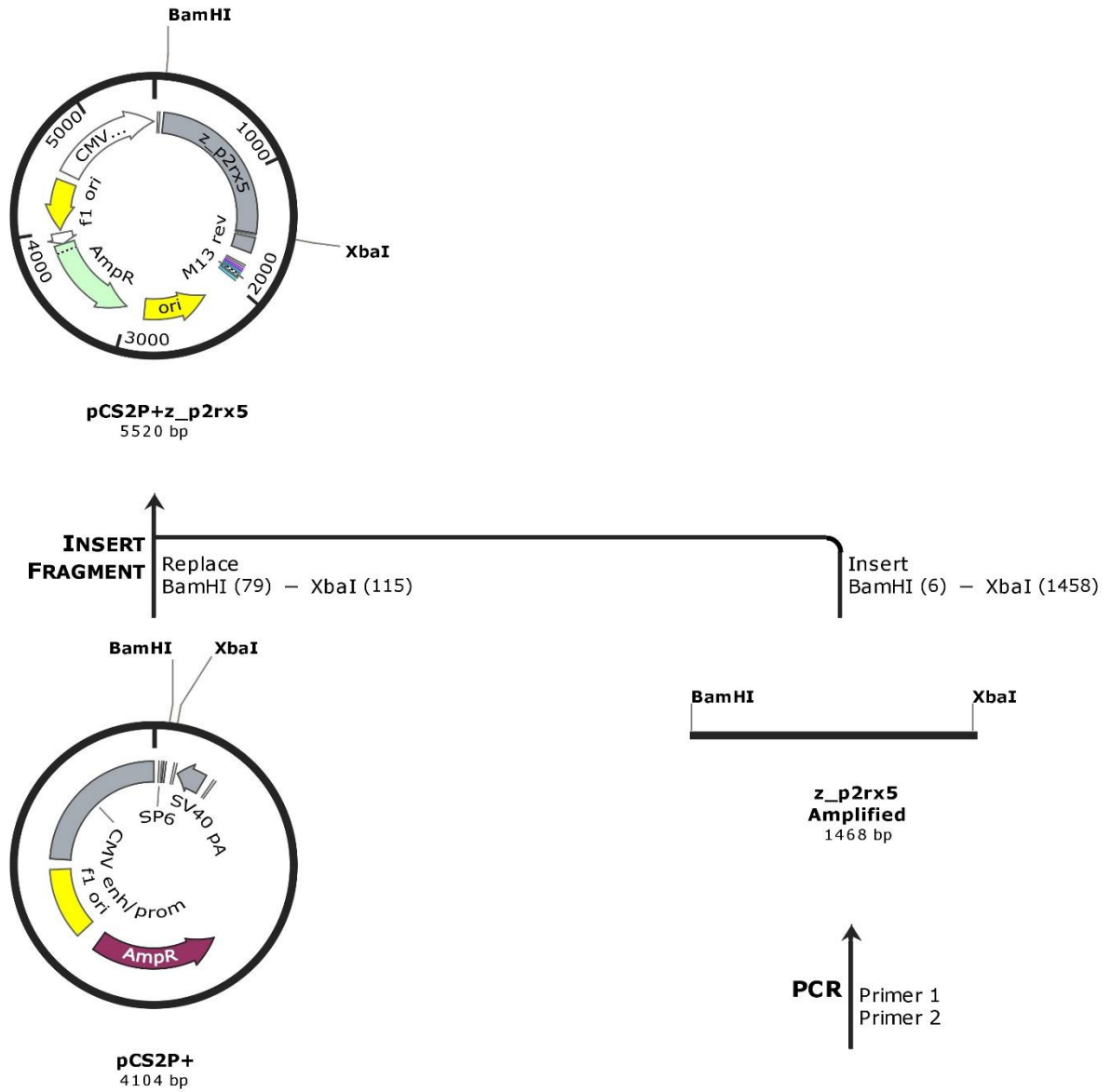
Şekil 10. q-PCR yöntemi ile *p2rx8* geninin ekspresyon değişimi analizi. Wnt/ β -katenin sinyal iletim yolağı aktivatörü *Tg(hs:Wnt8GFP)* transgenik zebrafalığı embriyoları, Wnt/ β -katenin sinyal iletim yolağı inhibitörü *Tg(hs:Dkk1GFP)* ve *Tg(hs:Axin1GFP)* zebrafalığı embriyolarından elde edilen cDNA örnekleri q-PCR yapıldı. *p2rx8* geninin ekspresyonu Wnt/ β -katenin sinyal iletim yolağı inhibe edildiğinde azalırken, Wnt/ β -katenin sinyal iletim yolağı aktive edildiğinde arttı.

4.3. Zebrafalığı *p2rx8*, *p2rx5* ve insan ortologu *p2rx5* genlerinin klonlanması

Zebrafalığı *p2rx8*, *p2rx5* ve bu iki genin insan ortologu *p2rx5* genleri uygun primerlerle, döllenmeden 24 saat sonra embriyolardan elde edilen cDNA ile PZR yöntemi ile çoğaltıldı. Daha sonra uygun enzimlerle kesilen PZR ürünleri pCS2P+ memeli ekspresyon vektörüne aktarıldı (Şekil 11).



Şekil 11. Klonlanan genlerin haritaları. Zebrabalığı *p2rx8* ve *p2rx5* ile insan *p2rx5* genleri kodlayan kısımları konvensiyonel klonlama yöntemi ile pCS2P+ memeli ekspresyon vektörüne klonlandı.

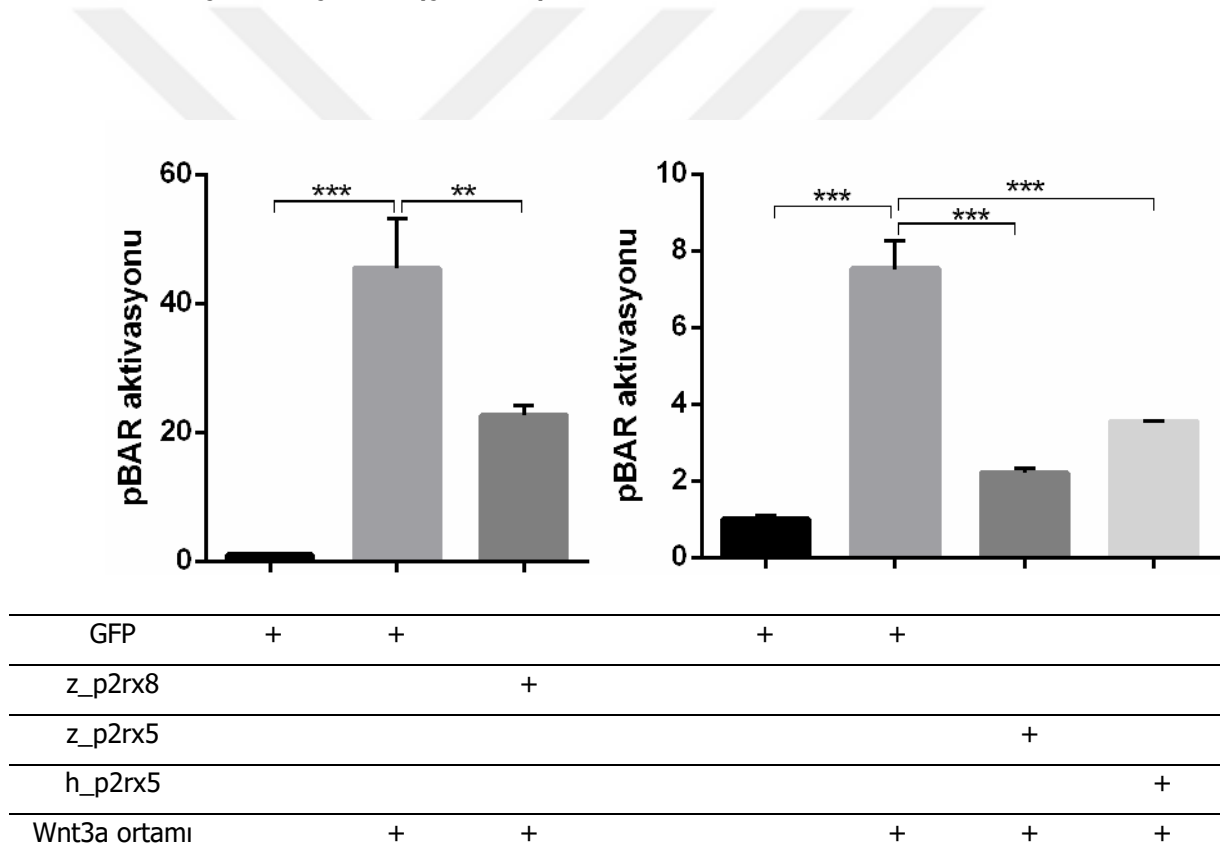


Şekil 12. Klonlama stratejisi. Konvensiyonel klonlama yöntemi ile uygun primerlerle çoğaltılan genlerin kodlayan kısımları uygun restriksiyon enzimleri ile kesilip pCS2P+ memeli ekspresyon vektörüne aktarıldı.

4.4. Lüsiferaz Raportör Analizi

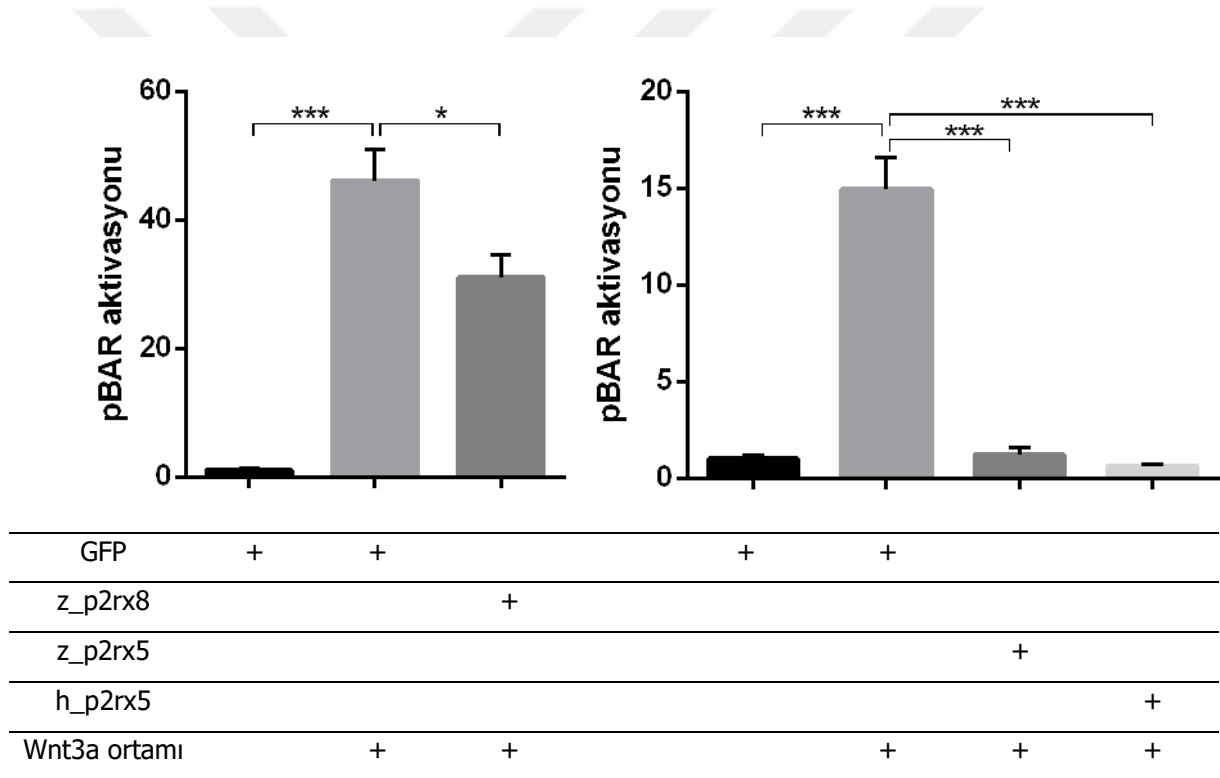
4.4.1. HEK293T hücrelerinde *z_p2rx8*, *z_p2rx5* ve *h_p2rx5* aşırı ekspresyonu ve *Wnt3a* koşullu ortam ile indüklenmesi

Lüsiferaz raportör analiz yöntemi ile genlerin Wnt aktivasyonu üzerindeki etkisi araştırıldı. Bunun için HEK293T hücrelerine transfekte edilen *z_p2rx8*, *z_p2rx5* ve *h_p2rx5* genleri, Wnt-3a koşullu ortam ile indüklendikten sonra Wnt aktivasyonu pBAR (β -katenin hassas lüsiferaz raportör) bakılarak ölçüldü ve kontrole göre karşılaştırıldı. Kontrole göre *z_p2rx8*, *z_p2rx5* ve *h_p2rx5* genlerinin aşırı ekspresyonu Wnt etkisini önemli bir ölçüde düşürdü. (Şekil 13).



4.4.1. SH-SY5Y hücrelerinde *z_p2rx8*, *z_p2rx5* ve *h_p2rx5* aşırı ekspresyonu ve *Wnt3a* koşullu ortam ile indüklenmesi

Lüsiferaz raportör analiz yöntemi ile genlerin Wnt aktivasyonu üzerindeki etkisi araştırıldı. Bunun için SH-SY5Y hücrelerine transfekte edilen *z_p2rx8*, *z_p2rx5* ve *h_p2rx5* genleri, Wnt-3a koşullu ortam ile indüklendikten sonra Wnt aktivasyonu pBAR (β -katenin hassas lüsiferaz raportör) bakılarak ölçüldü ve kontrole göre karşılaştırıldı. Kontrole göre *z_p2rx8*, *z_p2rx5* ve *h_p2rx5* genlerinin aşırı ekspresyonu Wnt3a etkisini önemli bir ölçüde düşürdü. (Şekil 14).

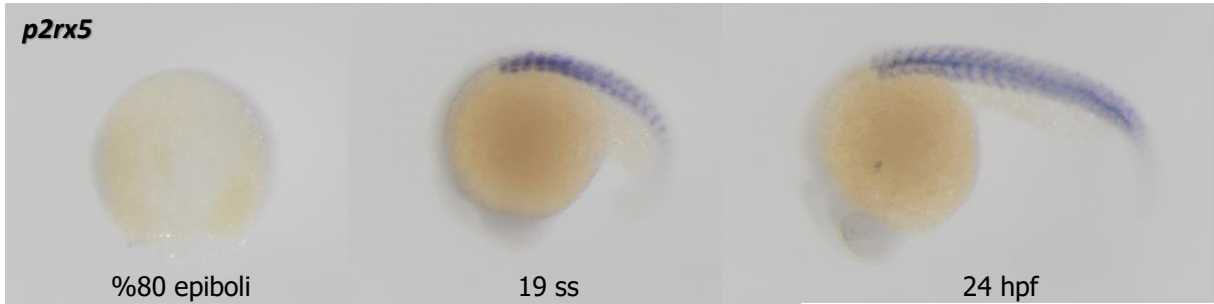


Şekil 14. SH-SY5Y hücrelerinde *z_p2rx8*, *z_p2rx5* ve *h_p2rx5* genlerinin aşırı ekspresyonu ve Wnt aktivasyonu üzerinde etkisine lüsiferaz raportör analizi ile bakılması. SH-SY5Y hücrelerinde *z_p2rx8*, *z_p2rx5* ve *h_p2rx5* genlerinin aşırı ekspresyonu Wnt aktivasyonunu engellediği görüldü.

4.5. Zebrabalığı *p2rx5* geninin gelişimsel süreçte ekspresyonu ve rolü

4.5.1. Zebrabalığı *p2rx5* geninin gelişimsel süreçte ekspresyonu

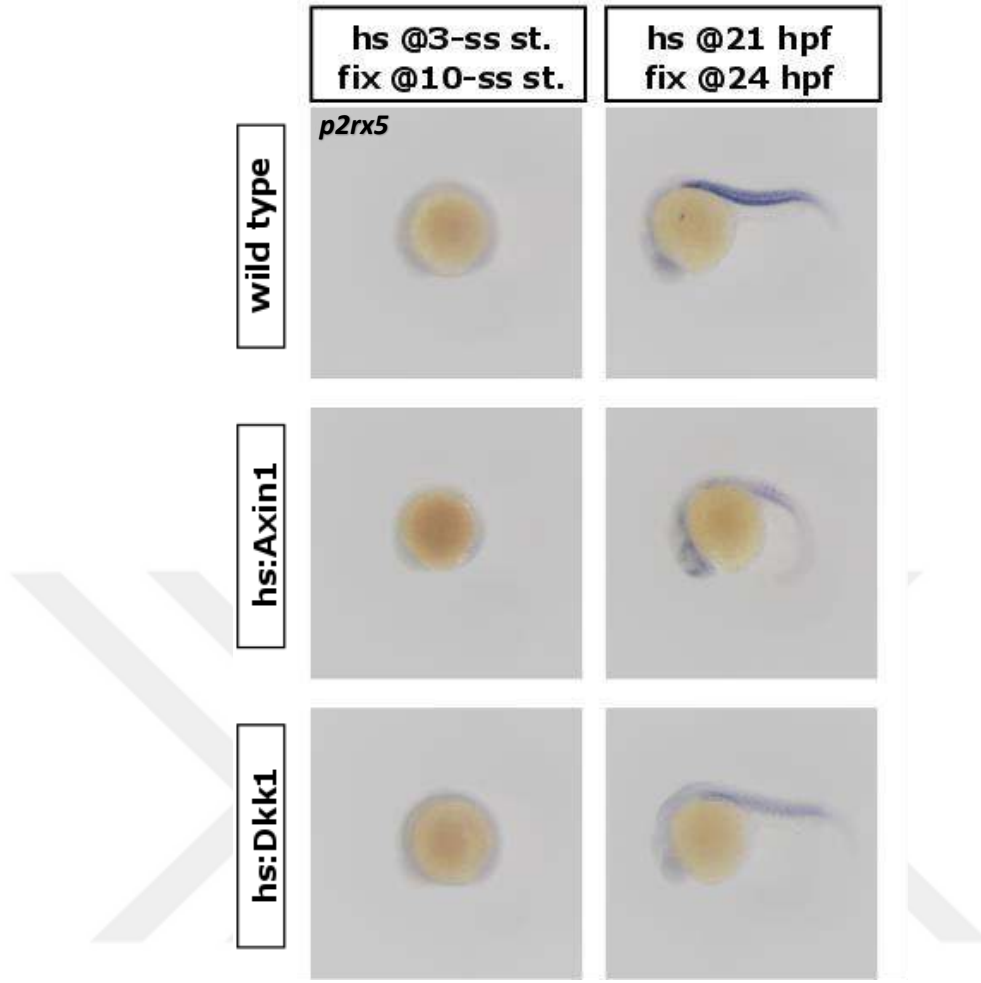
Zebrabalığı embriyoları %80 epiboli, 19 somit oluşumu ve döllenmeden 24 saat sonra fikse edilip, in situ hibridizasyon tekniğiyle gelişimsel süreçte ekspresyonuna bakıldı (Şekil 15).



Şekil 15. Zebrabalığı *p2rx5* geninin gelişimsel süreçte ekspresyonuna in situ hibridizasyon tekniği ile bakılması. Zebrabalığı embriyoları %80 epiboli, 19 somit oluşumu ve döllenmeden 24 saat sonra fikse edilip, in situ hibridizasyon tekniğiyle gelişimsel süreçte ekspresyonuna bakıldı ve somitlerde ekspresyonu olduğu görüldü.

4.5.2. *Wnt/β-katenin* sinyal iletim yolağının zebrabalığı *p2rx5* geni üzerinde etkisi

Zebrabalığı embriyolarında 10 somit oluşumu ve döllenmeden 24 saat sonra gelişim evrelerinde *Wnt/β-katenin* sinyal iletim yolağı manipule edildi. Bunu yapabilmek için *Wnt/β-katenin* sinyal iletim yolağı inhibitörü Tg(hs:Dkk1GFP) ve Tg(hs:Axin1GFP) zebrabalığı transgenik embriyoları kullanıldı. 3 somit oluşumu ve döllenmeden 21 saat sonra evrelerde bir saat ısı şoku verildikten iki saat sonra transgenik embriyolar fikse edildi. In situ hibridizasyon tekniği ile zebrabalığı *p2rx5* geni ekspresyonu incelendi. *Wnt/β-katenin* sinyal iletim yolağı inhibe edildiğinde *p2rx5* geni ekspresyonunun azaldığı görüldü (Şekil 16).

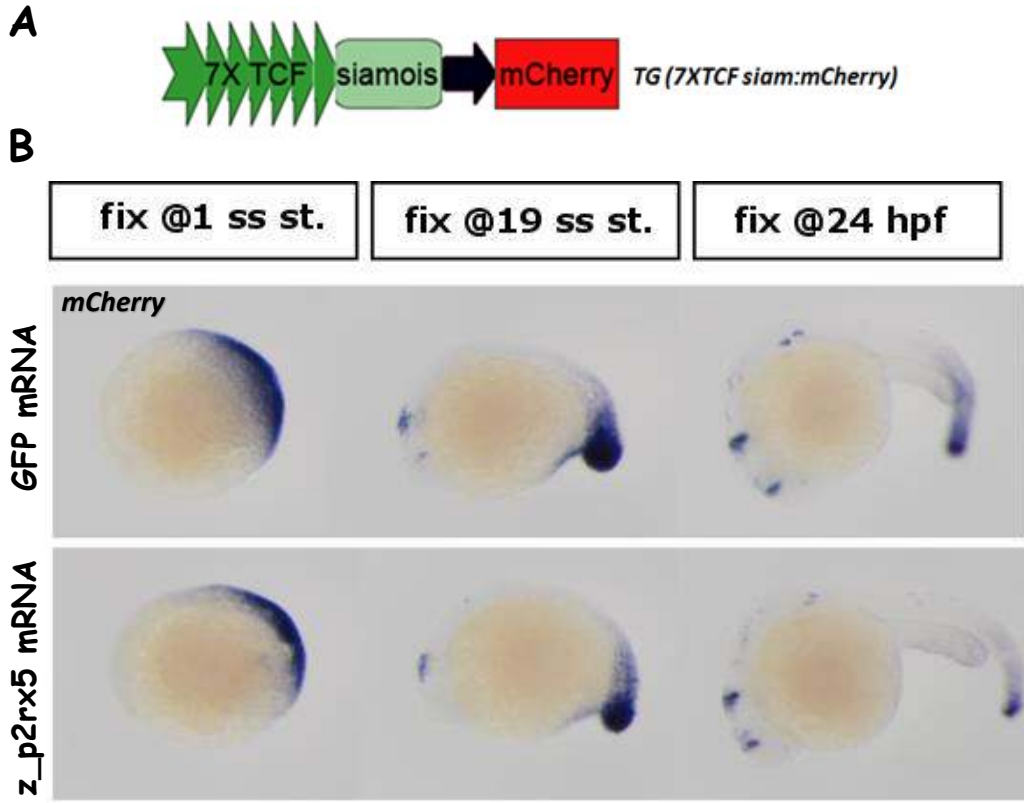


Şekil 16. Wnt/ β -katenin sinyal iletim yolağının fonksiyon kaybı ile manipule edilmesi sonucu embriyolarda zebrabalığı *p2rx5* geni ekspresyonuna in sitü hibridizasyon tekniği ile bakılması. Zebrabalığı embriyolarında 10 somit oluşumu ve döllenmeden 24 saat sonra gelişim evrelerinde Wnt/ β -katenin sinyal iletim yolağı inhibitörü *Tg(hs:Dkk1GFP)* ve *Tg(hs:Axin1GFP)* zebrabalığı transgenik embriyolarında in sitü hibridizasyon tekniği ile zebrabalığı *p2rx5* geni ekspresyonu incelendi. Wnt/ β -katenin sinyal iletim yolağı inhibe edildiğinde *p2rx5* geni ekspresyonunun azaldığı görüldü

4.5.3. Zebrabalığı *p2rx5* geninin Wnt/ β -katenin sinyal iletim yolağı üzerinde etkisi

Zebrabalığı *Tg(7xTCF-Siam:mCherry)* Wnt/ β -katenin sinyal iletim yolağı raportör embriyolarında, mikroyenjeksiyon yöntemi ile zebrabalığı *p2rx5* geni aşırı ekprese edildi. Ardından embriyolar, 1 somit oluşumu, 19 somit oluşumu ve döllenmeden 24 saat sonra evrelerinde fikse edilerek Wnt/ β -katenin sinyal iletim yolağı aktivitesine mCherry

probu ile bakıldı. Zebrabalığı *p2rx5* geni aşırı ekprese edildiğinde *mCherry* ekspresyonunda azalma gözlemlendi (Şekil 17)

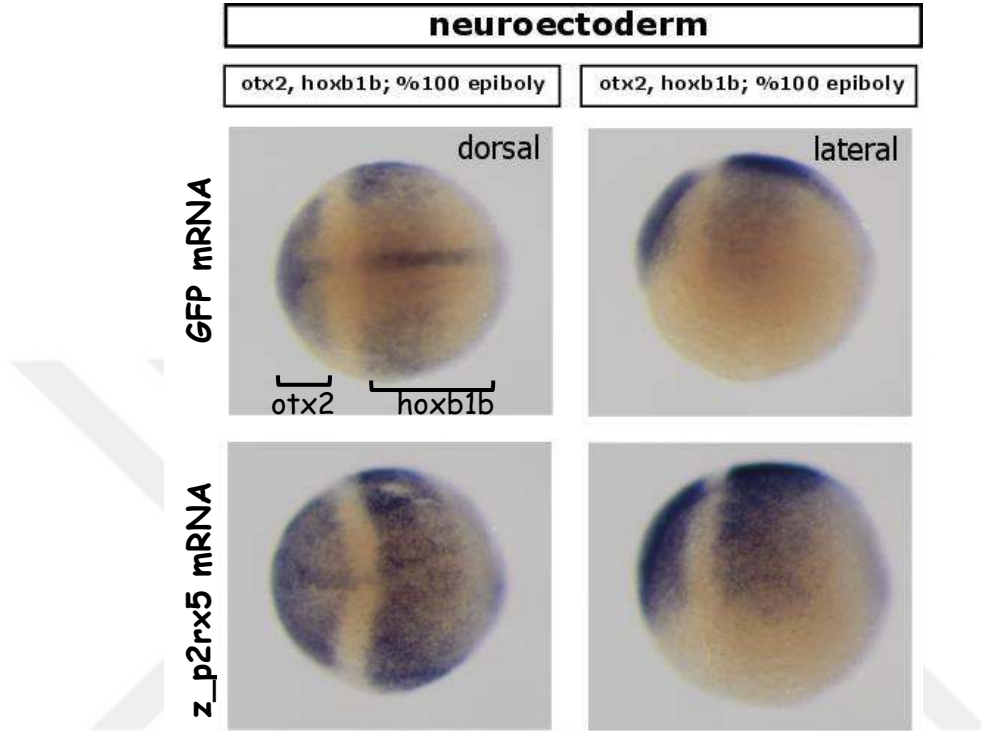


Şekil 17. (A) Wnt/β-katenin sinyal iletim yolağı raportör transgeniğinin şematik gösterimi, (B) GFP ya da *z_p2rx5* aşırı ekprese edildiğinde Wnt/β-katenin sinyal iletim yolağının aktivitesine in sitü hibridizasyon tekniği ile bakılması. Wnt/β-katenin sinyal iletim yolağı aktivitesine mCherry probu ile bakıldı ve zebrabalığı *p2rx5* geni aşırı ekprese edildiğinde mCherry ekspresyonunda azalma gözlemlendi.

4.5.4. Zebrabalığı *p2rx5* geninin aşırı ekspresyonu nöroektodermal paterni anteriorlaştırması

Zebrabalığı embriyolarında mikroyeksiyon yöntemi ile zebrabalığı *p2rx5* geni aşırı ekprese edildi. Ardından embriyolar %100 epiboli evresinde fikse edilerek, ön beyin belirteci *otx2* ve posterior nöral belirteci *hoxb1b* problemleri ile in sitü hibridizasyon yapıldı. Zebrabalığı *p2rx5* geni aşırı ekprese edildiğinde, ön beyin belirteci *otx1*

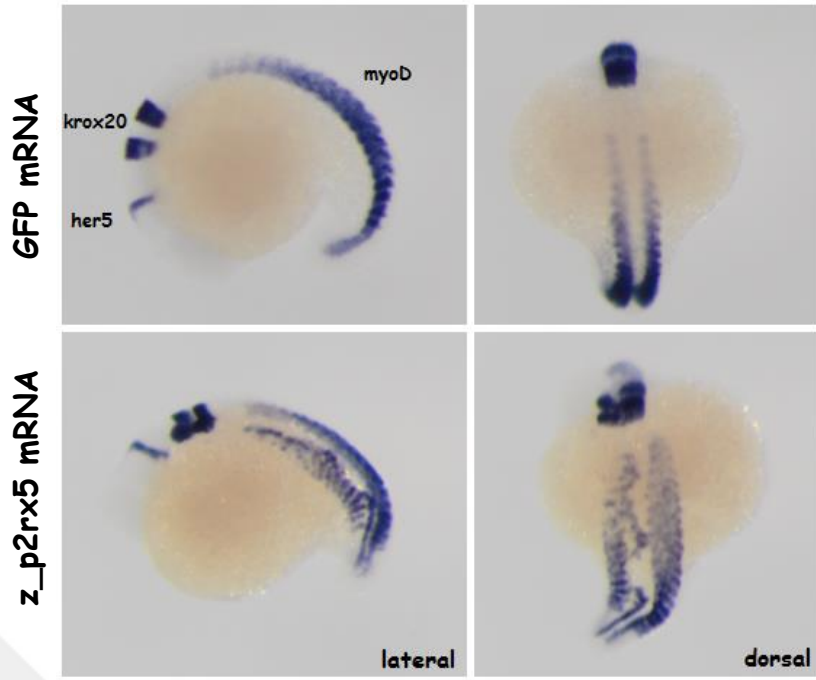
ekspresyonunun arttığı görülürken posterior nöral belirteçi *hoxb1b* ekspresyonunun azaldığı görülür (Şekil 18)



Şekil 18. GFP ya da *z_p2rx5* aşırı eksprese edildiğinde nöroektodermal belirteçlere in sitü hibridizasyon tekniği ile bakılması (dorsal=sırt, lateral=yan). Embriyolar %100 epiboli evresinde fikse edilerek, ön beyin belirteçi *otx2* ve posterior nöral belirteçi *hoxb1b* problemleri ile in sitü hibridizasyon yapıldı. Zebrabalığı *p2rx5* geni aşırı ekprese edildiğinde, ön beyin belirteçi *otx1* ekspresyonunun arttığı görülürken posterior nöral belirteçi *hoxb1b* ekspresyonunun azaldığı görüldü.

4.5.5. Zebrabalığı *p2rx5* geninin aşırı ekspresyonunun somit oluşumunda etkisi

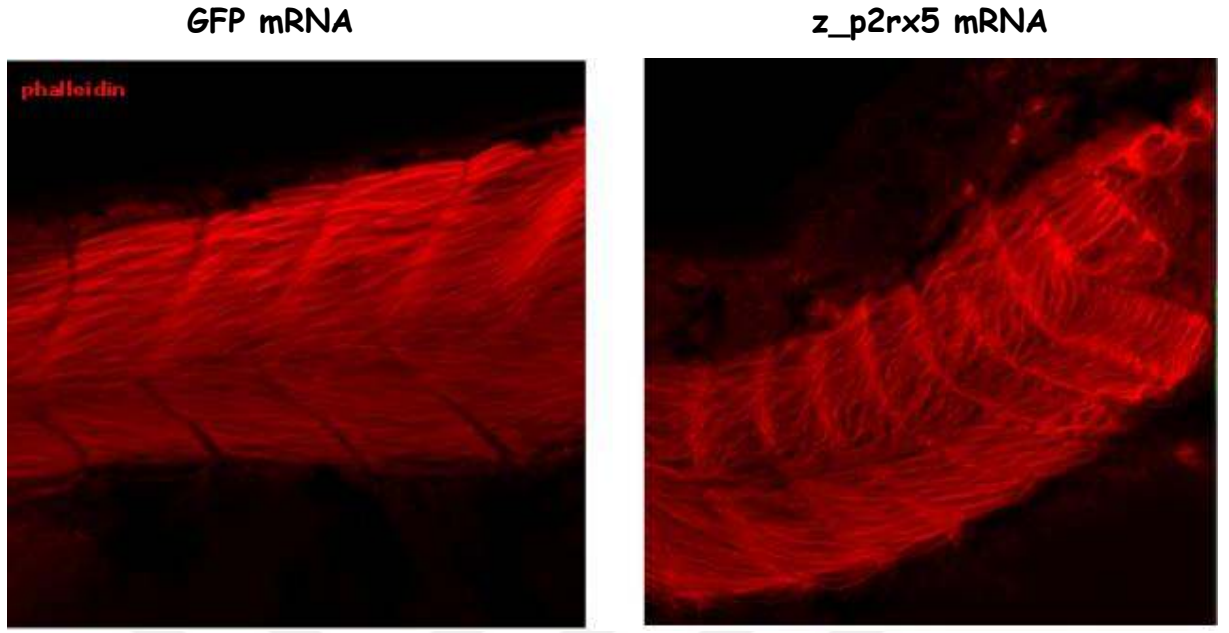
Zebrabalığı embriyolarında mikroyenjeksiyon yöntemi ile zebrabalığı *p2rx5* geni aşırı ekprese edildi. Ardından embriyolar 19 somit oluşumu evresinde fikse edilerek, orta beyin ve arka beyin sınırı belirteçi *her5*, üçüncü ve beşinci rhombomere belirteçi *krox20* ve somit belirteçi *myoD* problemleri ile in sitü hibridizasyon yapıldı. Zebrabalığı *p2rx5* geni aşırı ekprese edildiğinde, somitlerin oluşmasında sorun olduğu görüldü (Şekil 19).



Şekil 19. GFP ya da *z_p2rx5* aşırı eksprese edildiğinde gelişimsel belirteçlere in sitü hibridizasyon tekniği ile bakılması (dorsal=sırt, lateral=yan). Somit belirteçi myoD problemleri ile in sitü hibridizasyon yapıldığında ve zebrafalığı *p2rx5* geni aşırı eksprese edildiğinde, somitlerin oluşmasında sorun olduğu görüldü.

4.5.6. Zebrafalığı *p2rx5* geninin aşırı ekspresyonunun kas oluşumunda etkisi

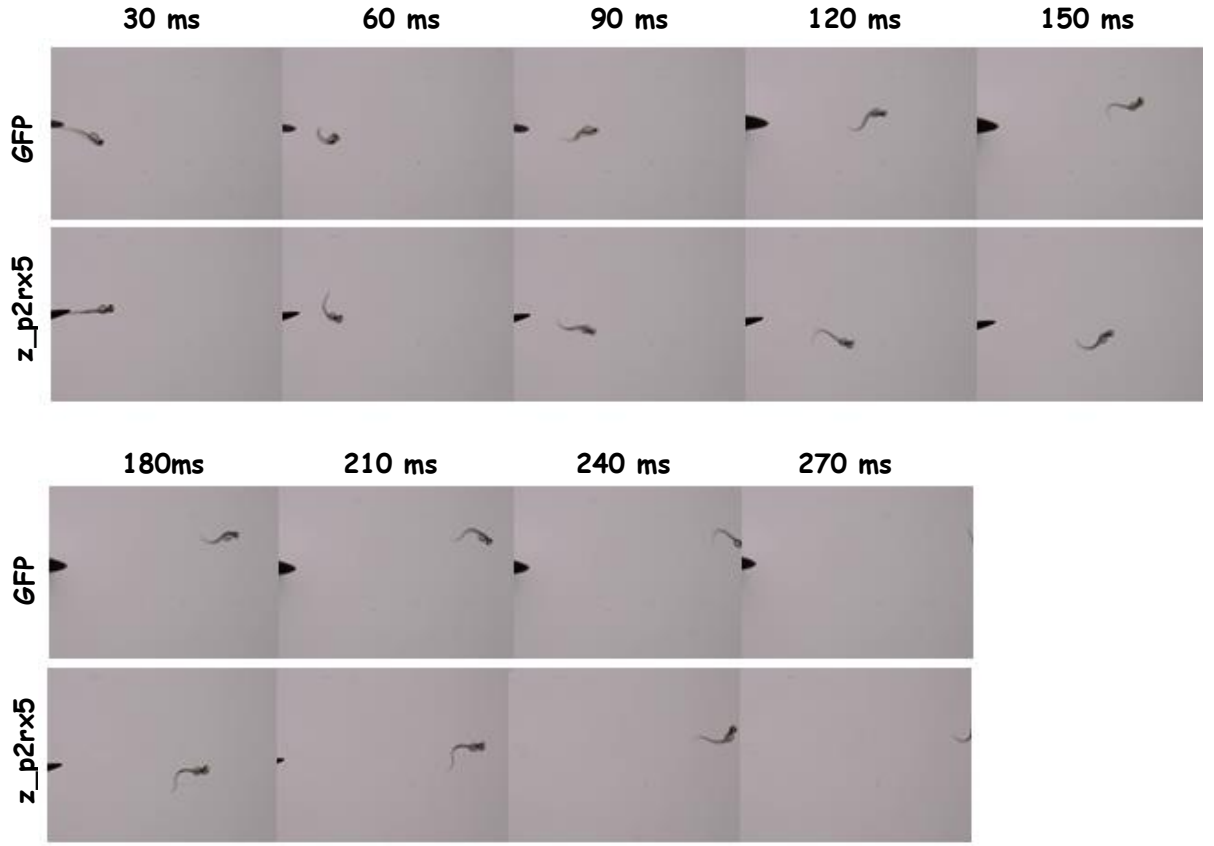
Zebrafalığı embriyolarında mikroyeksiyon yöntemi ile zebrafalığı *p2rx5* geni aşırı eksprese edildi. Ardından embriyolar döllenmeden 48 saat sonra evresinde fıkse edilerek, kas hücreleri için faloidin boyaması yapıldı. Zebrafalığı *p2rx5* geni aşırı eksprese edildiğinde, kasların oluşmasında sorun olduğu görüldü (Şekil 20).



Şekil 20. GFP ya da *z_p2rx5* aşırı eksprese edildiğinde faloidin boyaması ile kaslara bakılması. Zebrabalığı *p2rx5* geni aşırı eksprese edildiğinde, kasların oluşmasında sorun olduğu görüldü.

*4.5.7. Zebrabalığı *p2rx5* geninin aşırı ekspresyonunun yüzme yeteneği üzerinde etkisi*

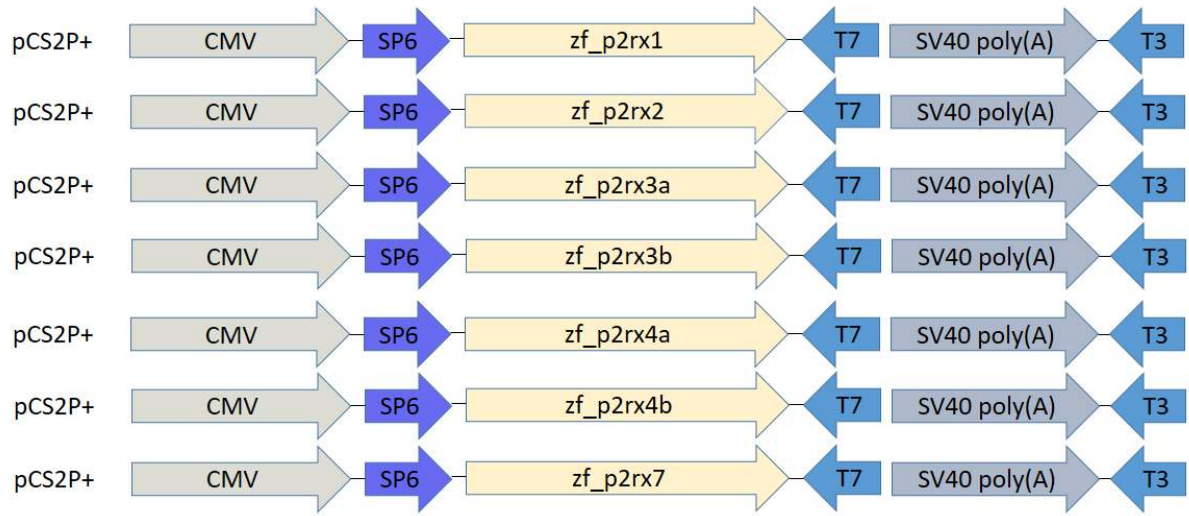
Zebrabalığı embriyolarında mikroyenjeksiyon yöntemi ile zebrabalığı *p2rx5* geni aşırı eksprese edildi. Ardından embriyolar döllenmeden 48 saat sonra evresinde kuyruklarından uyarılarak yüzmeleri kayıt altına alındı. Dokun-uyar (touch-evoked) deneyi ile kontrol ve zebrabalığı *p2rx5* geni aşırı eksprese edilen larvalar arasında yüzme yeteneği açısından bir fark olmadığı gözlemlendi (Şekil 21).



Şekil 21. GFP ya da *z_p2rx5* aşırı eksprese edildiğinde yüzme yeteneklerinin karşılaştırılması (ms: milisaniye). Dokun-uyar (touch-evoke) deneyi ile kontrol ve zebrabalığı *p2rx5* geni aşırı eksprese edilen larvalar arasında yüzme yeteneği açısından bir fark olmadığı gözlemlendi.

4.6. Tüm Tanımlanmış Zebrabalığı P2X Genlerinin Klonlanması

Zebrabalığı *p2rx5* ve *p2rx8* genleri klonlanmıştı. Geriye kalan zebrabalığı *p2rx1*, *p2rx2*, *p2rx3a*, *p2rx3b*, *p2rx4a*, *p2rx4b* ve *p2rx7* genleri uygun primerlerle, döllenmeden 4 gün sonra embriyolardan elde edilen cDNA ile PZR yöntemi ile çoğaltıldı. Daha sonra uygun enzimlerle kesilen PZR ürünleri pCS2P+ memeli ekspresyon vektörüne aktarıldı (Şekil 22).

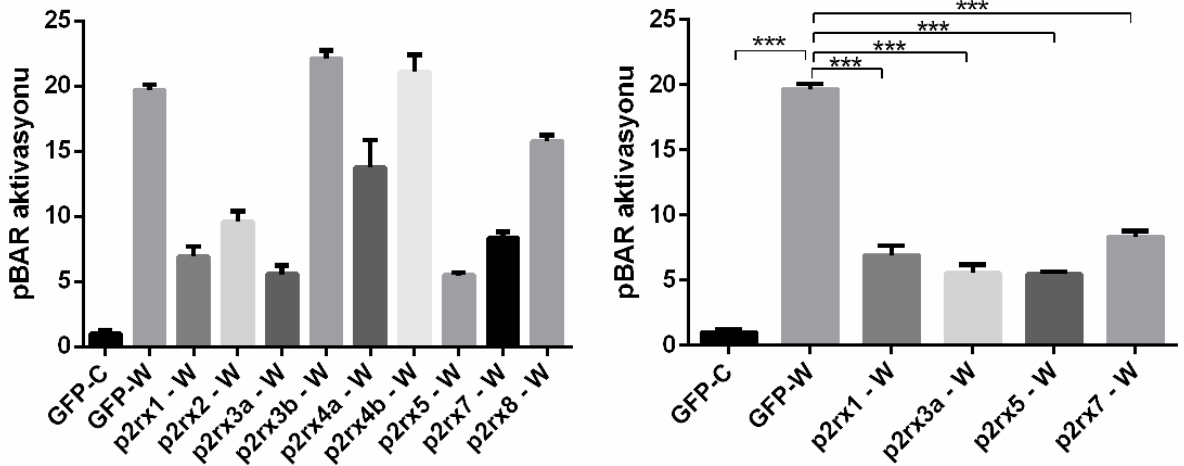


Şekil 22. Klonlanan genlerin haritaları. Zebrabalığı *p2rx1*, *p2rx2*, *p2rx3a*, *p2rx3b*, *p2rx4a*, *p2rx4b* ve *p2rx7* genleri kodlayan kısımları konvensiyonel klonlama yöntemi ile pCS2P+ memeli ekspresyon vektörüne klonlandı.

4.7. P2X Genlerinin Wnt/ β -katenin sinyal iletim yolağı üzerinde etkisi

4.7.1. HEK293T hücrelerinde P2X genlerinin aşırı ekspresyonu ve Wnt3a koşullu ortam ile indüklenmesi

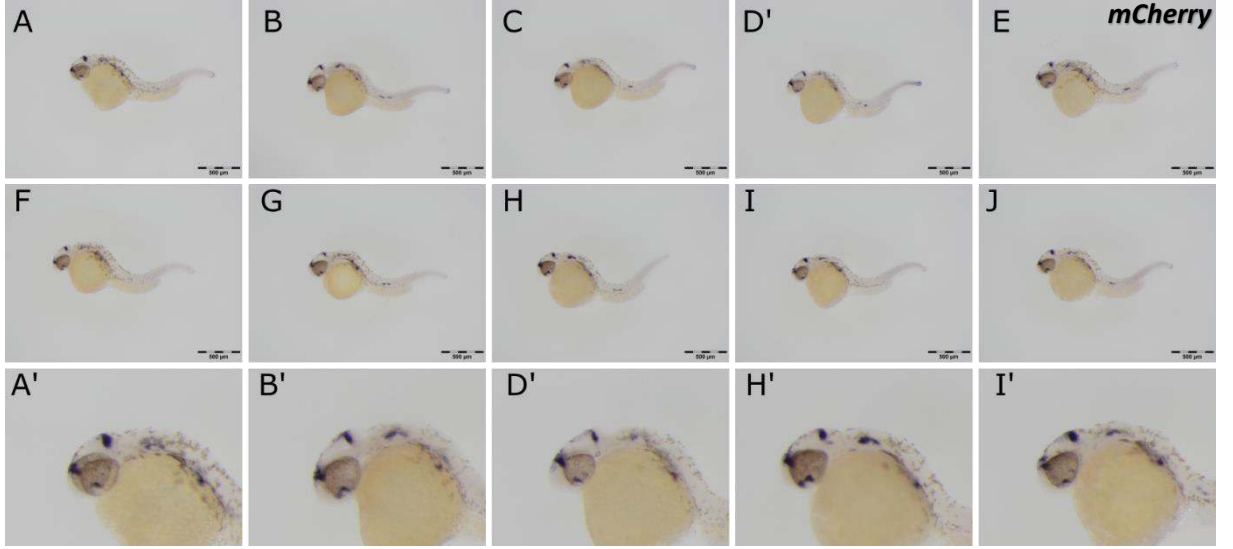
Lüsiferaz raportör analiz yöntemi ile genlerin Wnt aktivasyonu üzerindeki etkisi araştırıldı. Bunun için HEK293T hücrelerine transfekte edilen zebrabalığı *p2rx1*, *p2rx2*, *p2rx3a*, *p2rx3b*, *p2rx4a*, *p2rx4b*, *p2rx5*, *p2rx7* ve *p2rx8* genleri, Wnt-3a koşullu ortam ile indüklendikten sonra Wnt aktivasyonu pBAR (β -katenin hassas lüsiferaz raportör) bakılarak ölçüldü ve kontrole göre karşılaştırıldı. Kontrole göre zebrabalığı *p2rx1*, *p2rx3a*, *p2rx5* ve *p2rx7* genlerinin aşırı ekspresyonu Wnt etkisini önemli bir ölçüde düşürdü. (Şekil 23).



Şekil 23. HEK293T hücrelerinde zebrabalığı P2X genlerinin aşırı ekspresyonu ve Wnt aktivasyonu üzerinde etkisine lusiferaz raportör analizi ile bakılması. HEK293T hücrelerinde zebrabalığı *p2rx1*, *p2rx3a*, *p2rx5* ve *p2rx7* genlerinin aşırı ekspresyonunun Wnt aktivasyonunu engellediği görüldü.

4.7.2. Zebrabalığı P2X genlerinin Wnt/ β -katenin sinyal iletim yolağı üzerinde etkisi

Zebrabalığı *Tg(7xTCF-Siam:mCherry)* Wnt/ β -katenin sinyal iletim yolağı raportör embriyolarında, mikroenjeksiyon yöntemi ile zebrabalığı *p2rx1*, *p2rx2*, *p2rx3a*, *p2rx3b*, *p2rx4a*, *p2rx4b*, *p2rx5*, *p2rx7* ve *p2rx8* genleri aşırı ekprese edildi. Ardından embriyolar döllenmeden 36 saat sonra fikse edilerek Wnt/ β -katenin sinyal iletim yolağı aktivitesine mCherry probu ile bakıldı. En büyük fark olarak, zebrabalığı *p2rx3a* geni aşırı ekprese edildiğinde *mCherry* ekspresyonunda azalma gözlemlendi (Şekil 24).

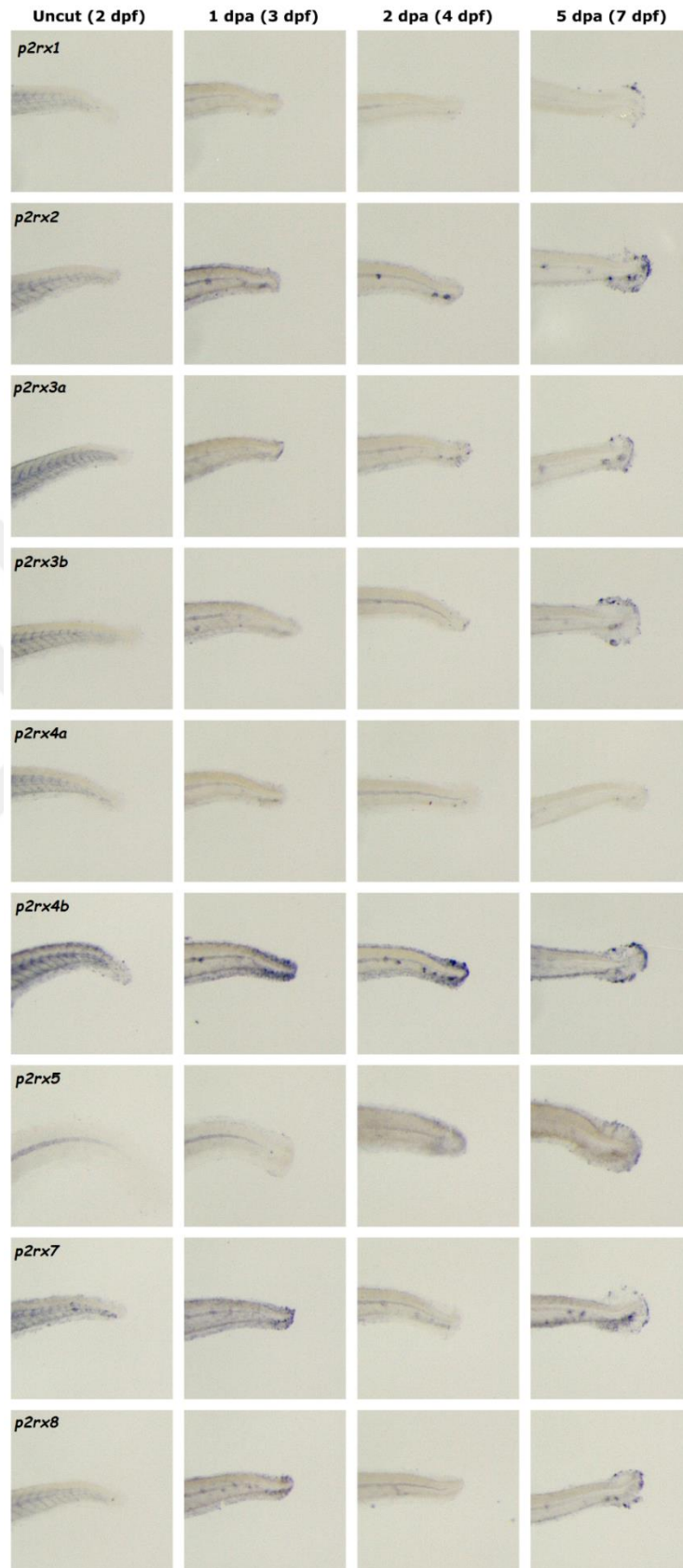


Şekil 24. GFP ya da P2X genleri aşırı eksprese edildiğinde Wnt/ β -katenin sinyal iletim yolağının aktivitesine in sitü hibridizasyon tekniği ile bakılması. (A) GFP, (B) p2rx1, (C) p2rx2, (D) p2rx3a, (E) p2rx3b, (F) p2rx4a, (G) p2rx4b, (H) p2rx5, (I) p2rx7, (J) p2rx8 genlerini göstermektedir. A', B', D', H' ve I' fotoğrafları A, B, D, H VE I fotoğraflarının yakınlaştırılmış halidir. Zebrabalığı *p2rx3a* geninin aşırı ekspresyonunun Wnt aktivasyonunu en çok engellediği görüldü.

4.8. Tüm Tanımlanmış Zebrabalığı P2X Genlerinin Kuyruk Rejenerasyonu

Sırasında Rolü

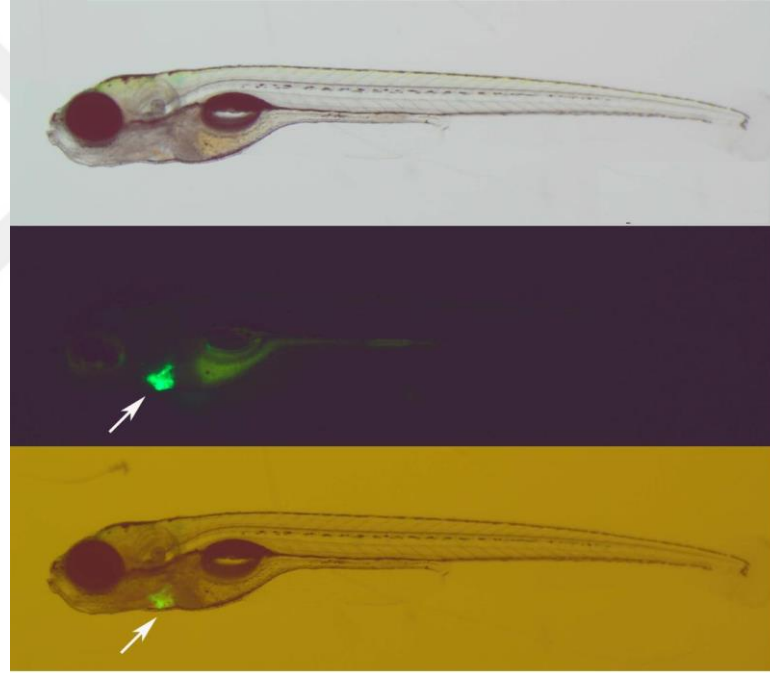
Yabanıl tip zebrabalığı larvalarının döllenmeden 48 saat sonra kuyrukları kesildi ve kuyruk rejenerasyonu sırasında, amputasyondan 1 gün, 2 gün ve 5 gün sonra larvalar fikse edilerek zebrabalığı *p2rx1*, *p2rx2*, *p2rx3a*, *p2rx3b*, *p2rx4a*, *p2rx4b*, *p2rx5*, *p2rx7* ve *p2rx8* genleri için sentezlenen RNA proplar ile in sitü hibridizasyon yapıldı (Şekil 25).



Şekil 25. P2X reseptörlerinin larva kuyruk rejenerasyonundaki rolü

4.9. Transgenik Zebrabalığı Üretimi

Gateway klonlama sonucu, pDestTol2CG destinasyon vektöründeki iki Tol2 bölgesinin arasına *hsp70l* promoter bölgesinden sonra zebrabalığı *p2rx3a* ya da *p2rx7* geni ve ardından EGFP etiketi konuldu. Bu destinasyon vektöründeki *cm/c2* promoter bölgesinden sonra EGFP bulunması transgenik belirteç olarak kullanıldı. Bu elde edilen iki klon daha sonra Tol2 mRNA ile birlikte yabancı tip embriyolara mikroenjekte edildi. Bu sayede *Tg(hsp70l:p2rx3a:EGFP)* ve *Tg(hsp70l:p2rx7:EGFP)* transgenik zebrabalıklarını üretmek amaçlandı. Enjeksiyonun ve transgenliğin başarılı olup olmadığı *cm/c2:EGFP* belirteçi ile floresan mikroskop altında analiz edildi (Şekil 26).



Şekil 26. Transgenik zebrabalığı belirteci *cm/c2:EGFP* gösterimi. *Tg(hsp70l:p2rx3a:EGFP)* ve *Tg(hsp70l:p2rx7:EGFP)* transgenik zebrabalıklarını üretmek amaçlandı. Enjeksiyonun ve transgenliğin başarılı olup olmadığı *cm/c2:EGFP* belirteçi ile floresan mikroskop altında analiz edildi.

5. TARTIŞMA

Bu araştırmada Wnt/ β -katenin sinyal iletim yolağını daha da aydınlatmak amaçlanmıştır. Bu amaçla Wnt/ β -katenin sinyal iletim yolağı aktivatörü *Tg(hs:Wnt8GFP)* zebrabalığı transgenik embriyoları, Wnt/ β -katenin sinyal iletim yolağı inhibitörü *Tg(hs:Dkk1GFP)* ve *Tg(hs:Axin1GFP)* zebrabalığı transgenik embriyolarından elde edilen RNA örnekleri ile yeni nesil RNA dizileme yapılmış ve Wnt/ β -katenin sinyal iletim yolağı hedef genleri araştırılmıştır. Sekanslama sonucu bilinen geribildirim düzenleyicilerin de bulunması seçtiğimiz zebrabalığı *p2rx8* geninin de doğru bir aday olabileceği ihtimalini yükseltmiştir (Şekil 9).

Aynı gelişimsel evrelerden elde edilen RNA örneklerinden cDNA sentezlenmiş ve q-PCR yöntemi ile *z_p2rx8* geninin ekspresyon ifadesine bakılmıştır. q-PCR analizine göre Wnt/ β -katenin sinyal iletim yolağı inhibe edildiğinde *z_p2rx8* geni ekspresyonunun azalması ve Wnt/ β -katenin sinyal iletim yolağı aktive edildiğinde *z_p2rx8* geni ekspresyonunun artması, bu genin Wnt/ β -katenin sinyal iletim yolağı hedef genlerinden biri olduğunu göstermiştir.

Zebrabalığı *p2rx8* geninin insan ortologunun *p2rx5* olduğu ve bu insan geninin zebrabalığı ortologu hem *p2rx8* hem de *p2rx5* genleri olduğu bilinmektedir. Bu nedenle, zebrabalığı *p2rx8*, *p2rx5* ve bu iki genin insan ortologu *p2rx5* genlerini klonlamak için bu genlerin kodlanan kısımlarına uygun primerler dizayn edilmiş ve bu primerlere uygun enzim bölgeleri eklenerek, pCS2P+ memeli ekspresyon vektörüne aktarılmıştır. Klonlama sırasında dikkat edilen önemli noktalardan biri PZR ürününün ve restriksiyon enzimleri ile kesilen vektörün agaroz jelde yürütüldüğünde uzunluğunun doğru çıkmasıdır. Restriksiyon enzimlerinin çalıştığından emin olunması, PZR ürününün spesifik olması, PZR ürünü ve vektörün saf olarak elde edilip ligasyon yapılması, transformasyondan sonra bakterilerin uygun antibiyotikli agar platelere ekilmesi de diğer önemli noktalardandır.

Klonlanan genler daha sonra HEK293T ve SH-SY5Y hücrelerine transfekte edilerek Wnt3a koşullu ortam ile indüklenmiştir. Transfeksiyon sırasında hücrelerin sağlığı önemli ölçüde transfeksiyon oranını etkilemiştir. Bu nedenle transfeksiyon

öncesi hücrelerin sağlıklı gözükmesine dikkat edilmiştir. SH-SY5Y hücreleri çok hassas ve HEK293T hücreleri yarı-yapışkan hücreler olduğu için üzerindeki ortamlar değiştirilirken hücrelerin kalkmamasına dikkat edilmiştir.

pBAR (β -katenin hassas lüsiferaz raportör) aktivasyonuna bakılarak aşırı eksprese edilen genlerin Wnt3a etkisini nasıl değiştirdiği gözlenmiştir (Şekil 13 ve 14). Her iki hücre hattında da, HEK293T ve SH-SY5Y, zebrabalığı *p2rx8*, *p2rx5* ve bu iki genin insan ortologu *p2rx5* genleri Wnt3a etkisini önemli bir ölçüde düşürmüştür. Bu sonuç, zebrabalığı *p2rx8*, *p2rx5* ve insan *p2rx5* genlerinin Wnt/ β -katenin sinyal iletim yolağını olumsuz bir şekilde etkilediğini göstermiştir.

In sitü hibridizasyon sonuçlarına göre, Wnt/ β -katenin sinyal iletim yolağı inhibitörü *Tg(hs:Dkk1GFP)* ve *Tg(hs:Axin1GFP)* zebrabalığı transgenik embriyolarında, *z_p2rx5* geni ekspresyonunun azaldığı görülmüştür. Bu fark döllenmeden 24 saat sonra embriyolarında daha nettir. Bu sonuç, Wnt/ β -katenin sinyal iletim yolağının inhibe edilmesi durumunda *z_p2rx5* geni ekspresyonunun azaldığını ve bu yolağın bir hedef geni olduğunu in vivo olarak göstermiştir.

Ayrıca, zebrabalığı *Tg(7xTCF-Siam:mCherry)* Wnt/ β -katenin sinyal iletim yolağı raportör embriyolarında, mikroenjeksiyon yöntemi ile zebrabalığı *p2rx5* geni aşırı eksprese edildiğinde mCherry ekspresyonunun azaldığı görülmüştür. Wnt/ β -katenin sinyal iletim yolağının aktivasyonu sonucu β -katenin'in çekirdekteki TCF bölgesine bağlanması, bu transgenik embriyolarda mCherry belirtecinin ekspresyonuna neden olur. Bu nedenle, mCherry ekspresyonu direk olarak Wnt/ β -katenin aktivasyonunu gösterir. mCherry ekspresyonunun azalması, zebrabalığı *p2rx5* geni aşırı eksprese edildiğinde Wnt/ β -katenin sinyal iletim yolağını engellediğini göstermiştir (Şekil 17).

Ön beyin belirteci *otx2* ve posterior nöral belirteci *hoxb1b* problemleri ile yapılan in sitü hibridizasyon sonucu aslında Wnt/ β -katenin sinyal iletim yolağının ekspresyon durumunu da göstermiştir. Çünkü normal gelişim sırasında, anterior kısımda Wnt/ β -katenin sinyal iletim yolağının artması ve posterior kısımda Wnt/ β -katenin sinyal iletim yolağının baskılanması gereklidir. Zebrabalığı *p2rx5* geni aşırı eksprese edildiğinde ise ön beyin belirteci *otx2*'de büyüme ve posterior nöral belirteci *hoxb1b*'de gerileme

görülmüştür. Bu sonuç, *z_p2rx5* geni aşırı ekspresyonunda nöroektodermal paternin daha da anteriorlaştırdığını göstermiştir (Şekil 18).

Zebrabalığı *p2rx5* geni ekspresyonu yabancı tip embriyolarda in situ hibridizasyon tekniği ile incelendiğinde, ekspresyonunun somitlerin oluşumu ile başladığı ve somitlerde olduğu görülmüştür (Şekil 15). *z_p2rx5* geni aşırı ekspresyonunda ise somitlerin oluşmasında sorun olduğu görülmüştür (Şekil 19). Bu sonuç, zebrabalığı gelişim sırasında normal somit oluşumu için *z_p2rx5* geninin gerekli olduğunu kanıtlamıştır. Ek olarak, *z_p2rx5* geni aşırı ekspresyonunda faloidin boyaması ile kaslara bakılmıştır (Şekil 20). Burada kas fiberlerinin bozulmadığı ama düzgün bir yapıda da olmadığı görülmüştür. Ayrıca, *z_p2rx5* geni aşırı ekspresyonunda yabancı tipe göre yüzme yeteneği açısından bir fark olmadığı gözlenmiştir. Literatürde de denildiği üzere morfolino ile *z_p2rx5* geni susturulduğunda ATP'ye karşı kas cevabı için *z_p2rx5* geninin gerekli olduğu ancak bu genin kas oluşumu için gerekli olmadığı bulunmuştur. Ayrıca, yine morfolino ile *z_p2rx5* geni susturulduğunda yüzme yeteneğinin değişmediği ve nöromusküler boşluklar için *z_p2rx5* genine gerek olmadığı vurgulanmıştır [103].

Wnt/ β -katenin sinyal iletim yolağının rejenerasyonda önemli rolünün olması ve purinerjik reseptörlerin rejenerasyon sırasında rolünün olması, bu iki yolak arasındaki ilişkinin kuyruk rejenerasyonu sırasında incelenebileceği fikrini doğurdu. Bu nedenle tüm tanımlanmış P2X purinerjik reseptörleri pCS2P+ memeli ekspresyon vektörüne klonlanmıştır (Şekil 22). Ardından tüm P2X reseptörlerinin Wnt/ β -katenin sinyal iletim yolağı üzerindeki etkisine hem embriyolarda (Şekil 24) hem de hücre kültüründe (Şekil 23) bakılmıştır. Bu iki deney sonucunda da *p2rx3a* geninin aşırı ekspresyonunun Wnt/ β -katenin sinyal iletim yolağı aktivitesini azalttığı görülmüştür. Ayrıca, literatürde Wnt sinyal iletim yolağı ile *p2rx7* geni arasında ilişki olabileceği savunulduğu [104] için bu genin de rejenerasyon sırasında Wnt/ β -katenin sinyal iletim yolağı ile etkileşimi olabileceğini düşündük. Bu nedenlerle, erişkin zebrabalıklarında bu iki genin fonksiyonunu inceleyebilmek için *Tg(hsp70l:p2rx3a:EGFP)* ve *Tg(hsp70l:p2rx7:EGFP)* zebrabalıkları üretilmeye başlanmıştır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu araştırmada, Wnt/ β -katenin sinyal iletiminin plazma membranında düzenlenmesinin moleküler düzeyde aydınlatılmasına katkı koymak amaçlanmıştır. Bu amaçla zebrablığı *p2rx5* geninin fonksiyonu araştırılmış ve aşırı ekspresyonunda Wnt/ β -katenin sinyal iletim yolağı aktivitesini engellediği hem hücre kültüründe hem de zebrablığı embriyolarında gösterilmiştir.

Ardından tüm tanımlanmış P2X purinerjik reseptörlerinin Wnt/ β -katenin sinyal iletim yolağı üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Bunun sonucunda, *p2rx1*, *p2rx3a*, *p2rx5*, *p2rx7* genlerinin aşırı ekspresyonunun Wnt/ β -katenin sinyal iletim yolağı aktivitesini azalttığı bulunmuştur.

Çalışma, P2X reseptör genlerinin fonksiyon kazanımı sonucunda Wnt/ β -katenin sinyal iletimi ve zebrabalığı kuyruk rejenerasyonu üzerindeki etkileri hakkında ipuçları ortaya koymuştur. Buradan yola çıkarak gelecekte, bu reseptörlerin genleri CRISPR/Cas9 genom yazılımı tekniği kullanılarak fonksiyon kaybına uğratarak gerek Wnt/ β -katenin sinyal iletimi gerekse de kuyruk rejenerasyonu üzerindeki etkileri araştırılabilir. Ayrıca ısı şoku ile indüklenebilen *Tg(hsp70l:p2rx3a:EGFP)* ve *Tg(hsp70l:p2rx7:EGFP)* transgenik zebrabalıkları, P2X purinerjik sinyal iletimi ve Wnt/ β -katenin sinyal iletimi arasındaki ilişkinin zebrabalığı kuyruk rejenerasyonu modelinde daha ayrıntılı olarak çalışılabilmesine olanak sağlayacaktır.

7. KAYNAKLAR

- [1] R. Nusse and H. Varmus, "Many tumors induced by the mouse mammary tumor virus contain a provirus integrated in the same region of the host genome," *Cell*, p. 31: 99–109, 1982.
- [2] C. Nüsslein-Volhard and E. Wieschaus, "Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*," *Nature*, p. 287: 795–801, 1980.
- [3] E. Siegfried, T. B. Chou and N. Perrimon, "Wingless signaling acts through *zestwhite3*, the *drosophila* homolog of glycogen synthase kinase-3, to regulate engrailed and establish cell fate," *Cell*, p. 71: 1167–1179, 1992.
- [4] J. Noordermeer, J. Klingensmith, N. Perrimon and R. Nusse, "Dishevelled and armadillo act in the wingless signalling pathway in *Drosophila*," *Nature*, p. 367: 80–83, 1994.
- [5] C. V. Cabrera, M. Alonso, P. Johnston, R. Phillips and P. Lawrence, "Phenocopies induced with antisense RNA identify the wingless gene," *Cell*, p. 50: 659–663, 1987.
- [6] B. Rubinfeld, B. Souza, I. Albert, O. Muller, S. Chamberlain and F. Masiarz, "Association of the APC gene product with beta-catenin," *Science*, p. 262: 1731–1734, 1993.
- [7] C. Petersen and P. Reddien, "Wnt Signaling and the Polarity of the Primary Body Axis," *Cell*, p. 139: 1056–1068, 2009.
- [8] T. Holstein, H. Watanabe and S. Özbek, "Signaling Pathways and Axis Formation in the Lower Metazoa," *Curr Top Dev Biol.*, pp. 97:137-77, 2011.
- [9] H. Clevers, K. Loh and R. Nusse, "Stem cell signaling. An integral program for tissue renewal and regeneration: Wnt signaling and stem cell control," *Science*, pp. 80, 346:54, 2014.
- [10] A. P. McMahon and R. T. Moon, "Ectopic expression of the proto-oncogene *int-1* in *Xenopus* embryos leads to duplication of the embryonic axis," *Cell*, pp. 58,1075–1084, 1989.
- [11] C. L. Stoick-Cooper, R. T. Moon and G. Weidinger, "Advances in signaling in vertebrate regeneration as a prelude to regenerative medicine," *Genes Development*, pp. 21, 1292–1315, 2007.

- [12] S. Ho and T. Keller, "The use of porcupine inhibitors to target Wnt-driven cancers," *Bioorganic Med. Chem. Lett.*, p. 25: 5472–5476, 2015.
- [13] C. Janda, D. Waghray, a. M. Levin, C. Thomas and K. Garcia, "Structural Basis of Wnt Recognition by Frizzled," *Science*, p. 337: 59–64, 2012.
- [14] B. MacDonald, A. Hien, X. Zhang, O. Iranloye, D. Virshup and M. Waterman, "Disulfide bond requirements for active Wnt ligands," *J. Biol. Chem.*, p. 289: 18122–18136, 2014.
- [15] K. Tanaka, Y. Kitagawa and T. Kadowaki, "Drosophila segment polarity gene product porcupine stimulates the posttranslational N-glycosylation of wingless in the endoplasmic reticulum," *J. Biol. Chem.*, p. 277: 12816–12823, 2002.
- [16] B. Riggelman, P. Schedl and E. Wieschaus, "Spatial expression of the Drosophila segment polarity gene armadillo is posttranscriptionally regulated by wingless," *Cell*, p. 63: 549–60, 1990.
- [17] K. Hoffman, "A superfamily of membrane-bound O-acetyltransferases with implications for Wnt signalling," *Trends Biochem. Sci.*, p. 25: 112, 2000.
- [18] B. Koo, M. Spit, I. Jordens, T. Low, D. Stange and M. v. d. Wetering, "Tumour suppressor RNF43 is a stem-cell E3 ligase that induces endocytosis of Wnt receptors," *Nature*, p. 488: 665–669, 2012.
- [19] J. Seifert and M. Mlodzik, "Frizzled/PCP signalling: a conserved mechanism regulating cell polarity and directed motility," *Nat. Rev. Genet.*, p. 8: 126–138, 2007.
- [20] Y. Wang and J. Nathans, "Tissue/planar cell polarity in vertebrates: new insights and new questions," *Development*, p. 134: 647–658, 2007.
- [21] R. T. Moon, A. D. Kohn, G. V. De Ferrari and A. Kaykas, "WNT and β -catenin signalling: diseases and therapies," *Nature Rev. Genet.*, pp. 5, 691–701, 2004.
- [22] H. Clevers, "Wnt/ β -catenin signaling in development and disease," *Cell*, pp. 127, 469–480, 2006.
- [23] D. Kimelman and W. Xu, " β -Catenin destruction complex: insights and questions from a structural perspective," *Oncogene*, pp. 25, 7482–7491, 2006.
- [24] V. Li, S. Ng, P. Boersema, T. Low, W. Karthaus and J. Gerlach, "Wnt Signaling through Inhibition of β -Catenin Degradation in an Intact Axin1 Complex," *Cell*, p. 149: 1245–1256, 2012.

- [25] T. Liu, X. Liu, H. Wang, R. T. Moon and C. C. Malbon, "Activation of rat frizzled-1 promotes Wnt signaling and differentiation of mouse F9 teratocarcinoma cells via pathways that require Gαq and Gαo function," *J. Biol. Chem.*, pp. 274, 33539–33544, 1999.
- [26] X. Liu, J. S. Rubin and A. R. Kimmel, "Rapid, Wnt-induced changes in GSK3β associations that regulate β-catenin stabilization are mediated by Gα proteins," *Curr. Biol.*, pp. 15, 1989–1997, 2005.
- [27] K. Tamai, M. Semenov, Y. Kato, R. Spokony, C. Liu, Y. Katsuyama, F. Hess, J. Saint-Jeannet and X. He, "LDL-receptor-related proteins in Wnt signal transduction," *Nature*, pp. 407, 530–535, 2000.
- [28] J. Mao, J. Wang, B. Liu, W. Pan, G. Farr, C. Flynn, H. Yuan, S. Takada, D. Kimelman, L. Li and D. Wu, "Low-density lipoprotein receptor-related protein-5 binds to Axin and regulates the canonical Wnt signaling pathway," *Mol. Cell*, pp. 7, 801–809, 2001.
- [29] K. Tamai, X. Zeng, C. Liu, X. Zhang, Y. Harada, Z. Chang and X. He, "A mechanism for Wnt coreceptor activation," *Mol. Cell*, pp. 13, 149–156, 2004.
- [30] J. Wolf, T. R. Palmby, J. Gavard, B. O. Williams and J. S. Gutkind, "Multiple PPPS/TP motifs act in a combinatorial fashion to transduce Wnt signaling through LRP6," *FEBS Lett.*, pp. 582, 255–261, 2008.
- [31] G. Davidson, W. Wu, J. Shen, J. Bilic, U. Fenger, P. Stannek, A. Glinka and C. Niehrs, "Casein kinase 1γ couples Wnt receptor activation to cytoplasmic signal transduction," *Nature*, pp. 438, 867–872, 2005.
- [32] X. Zeng, K. Tamai, B. Doble, S. Li, H. Huang, R. Habas, H. Okamura, J. Woodgett and X. He, "A dual-kinase mechanism for Wnt co-receptor phosphorylation and activation," *Nature*, pp. 438, 873–877, 2005.
- [33] T. Bjarnadóttir, D. Gloriam, S. Hellstrand, H. Kristiansson, R. Fredriksson and H. Schiöth, "Comprehensive repertoire and phylogenetic analysis of the G protein-coupled receptors in human and mouse," *Genomics*, pp. 88, 263–273, 2006.
- [34] A. Kaykas, J. Yang-Snyder, M. Héroux, K. Shah, M. Bouvier and R. Moon, "Mutant Frizzled 4 associated with vitreoretinopathy traps wild-type Frizzled in the endoplasmic reticulum by oligomerization," *Nature Cell Biol.*, pp. 6, 52–58, 2004.
- [35] S. Angers and R. Moon, "Proximal events in Wnt signal transduction," *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2009.

- [36] A. Dabdoub, M. Donohue, A. Brennan, V. Wolf, M. Montcouquiol, D. Sassoon, J. Hsieh, J. Rubin, P. Salinas and M. Kelley, "Wnt signaling mediates reorientation of outer hair cell stereociliary bundles in the mammalian cochlea," *Development*, pp. 130, 2375–2384, 2003.
- [37] C. Heisenberg, M. Tada, G. Rauch, L. Saúde, M. Concha, R. Geisler, D. Stemple, J. Smith and S. Wilson, "Silberblick/Wnt11 mediates convergent extension movements during zebrafish gastrulation," *Nature*, pp. 405, 76–81, 2000.
- [38] T. Westfall, R. Brimeyer, J. Twedt, J. Gladon, A. Olberding, M. Furutani-Seiki and D. Slusarski, "Wnt-5/pipetail functions in vertebrate axis formation as a negative regulator of Wnt/ β -catenin activity," *J. Cell Biol.*, pp. 162, 889–898, 2003.
- [39] E. Siegfried, E. L. Wilder and N. Perrimon, "Components of wingless signalling in *Drosophila*," *Nature*, pp. 367, 76–80, 1994.
- [40] M. Smalley, E. Sara, H. Paterson, S. Naylor, D. Cook, H. Jayatilake, L. Fryer, L. Hutchinson, M. Fry and T. Dale, "Interaction of axin and Dvl-2 proteins regulates Dvl-2-stimulated TCF-dependent transcription," *EMBO J.*, pp. 18, 2823–2835, 1999.
- [41] X. Zeng, H. Huang, K. Tamai, X. Zhang, Y. Harada, C. Yokota, K. Almeida, J. Wang, B. Doble, J. Woodgett, A. Wynshaw-Boris, J. Hsieh and X. He, "Initiation of Wnt signaling: control of Wnt coreceptor Lrp6 phosphorylation/activation via frizzled, dishevelled and axin functions," *Development*, pp. 135, 367–375, 2008.
- [42] J. Bilic, Y. Huang, G. Davidson, T. Zimmermann, C. Cruciat, M. Bienz and C. Niehrs, "Wnt induces LRP6 signalosomes and promotes dishevelled-dependent LRP6 phosphorylation," *Science*, pp. 316, 1619–1622, 2007.
- [43] D. C. Slusarski, J. Yang-Snyder, W. B. Busa and R. T. Moon, "Modulation of embryonic intracellular Ca^{2+} signaling by Wnt-5A," *Dev. Biol.*, pp. 182, 114–120, 1997.
- [44] D. C. Slusarski, V. G. Corces and R. T. Moon, "Interaction of Wnt and a Frizzled homologue triggers G-protein-linked phosphatidylinositol signalling," *Nature*, pp. 390, 410–413, 1997.
- [45] J. Dejmek, A. Safholm, C. Kamp Nielsen, T. Andersson and K. Leandersson, "Wnt-5a/ Ca^{2+} -induced NFAT activity is counteracted by Wnt-5a/Yes–Cdc42-

casein kinase 1 α signaling in human mammary epithelial cells," *Mol. Cell. Biol.*, pp. 26, 6024–6036, 2006.

- [46] M. Torres, J. Yang-Snyder, S. Purcell, A. DeMarais, L. McGrew and R. Moon, "Activities of the Wnt-1 class of secreted signaling factors are antagonized by the Wnt-5A class and by a dominant negative cadherin in early *Xenopus* development," *J. Cell Biol.*, pp. 133, 1123–1137, 1996.
- [47] C. Stoick-Cooper, G. Weidinger, K. Riehle, C. Hubbert, M. Major, N. Fausto and R. Moon, "Distinct Wnt signaling pathways have opposing roles in appendage regeneration," *Development*, pp. 134, 479–489, 2007b.
- [48] L. Topol, X. Jiang, H. Choi, L. Garrett-Beal, P. Carolan and Y. Yang, "Wnt-5a inhibits the canonical Wnt pathway by promoting GSK-3-independent β -catenin degradation," *J. Cell Biol.*, pp. 162, 899–908, 2003.
- [49] H. Liang, A. Coles, Z. Zhu, J. Zayas, R. Jurecic, J. Kang and S. Jones, "Noncanonical Wnt signaling promotes apoptosis in thymocyte development," *J. Exp. Med.*, pp. 204, 3077–3084, 2007.
- [50] Y. K. Xu and R. Nusse, "The Frizzled CRD domain is conserved in diverse proteins including several receptor tyrosine kinases," *Curr. Biol.*, pp. 8, 405–406, 1998.
- [51] I. Oishi, S. Takeuchi, R. Hashimoto, A. Nagabukuro, T. Ueda, Z. Liu, T. Hatta, S. Akira, Y. Matsuda, H. Yamamura, H. Otani and Y. Minami, "Spatio-temporally regulated expression of receptor tyrosine kinases, mRor1, mRor2, during mouse development: implications in development and function of the nervous system," *Genes Cells*, pp. 4, 41–56, 1999.
- [52] A. J. Mikels and R. Nusse, "Purified Wnt5a protein activates or inhibits β -catenin–TCF signaling depending on receptor context," *PLoS Biol.*, pp. 4, 115, 2006.
- [53] Y. Huang, Z. Anvarian, G. Döderlein, S. Acebron and C. Niehrs, "Maternal Wnt / STOP signaling promotes cell division during early *Xenopus* embryogenesis," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, p. 112: 5732–5737, 2015.
- [54] Y. Kawano and R. Kypta, "Secreted antagonists of the Wnt signalling pathway," *J. Cell Sci.*, p. 116: 2627–2634, 2003.
- [55] C. Niehrs, "Function and biological roles of the Dickkopf family of Wnt modulators," *Oncogene*, p. 25: 7469–7481, 2006.

- [56] T. Malinauskas and E. Jones, "Extracellular modulators of Wnt signalling," *Curr. Opin. Struct. Biol.*, p. 29: 77–84, 2014.
- [57] Y. Zhou and J. Nathans, "Gpr124 controls CNS angiogenesis and blood-brain barrier integrity by promoting ligand-specific canonical Wnt signaling," *Dev. Cell*, p. 31: 248–256, 2014.
- [58] E. M. Tanaka and P. W. Reddien, "The cellular basis for animal regeneration," *Developmental Cell*, pp. 21, 172-185, 2011.
- [59] F. Knopf, C. Hammond, A. Chekuru, T. Kurth, S. Hans, C. W. Weber, G. Mahatma, S. Fisher, M. Brand and S. Schulte-Merker, "Bone regenerates via dedifferentiation of osteoblasts in the zebrafish fin," *Developmental Cell*, 2011.
- [60] K. Kikuchi, J. E. Holdway, A. A. Werdich, R. M. Anderson, Y. Fang, G. F. Egnaczyk, T. Evans, C. A. Macrae, D. Y. Stainier and K. D. Poss, "Primary contribution to zebrafish heart regeneration by gata4(+) cardiomyocytes," *Nature*, pp. 464, 601-605, 2010.
- [61] B. Galliot and S. Chera, "The Hydra model: disclosing an apoptosis-driven generator of Wnt-based regeneration," *Trends in Cell Biology*, pp. 20, 514-523, 2010.
- [62] T. Hayashi, N. Mizuno and H. Kondoh, "Determinative roles of FGF and Wnt signals in iris-derived lens regeneration in newt eye," *Development, growth & differentiation*, pp. 50, 279-287, 2008.
- [63] F. Kubo and S. Nakagawa, "Wnt signaling in retinal stem cells and regeneration," *Development, growth & differentiation*, pp. 50, 245-251, 2008.
- [64] F. Figeac, B. Uzan, M. Faro, N. Chelali, B. Portha and J. Movassat, "Neonatal growth and regeneration of beta-cells are regulated by the Wnt/beta-catenin signaling in normal and diabetic rats," *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, pp. 298, 245-256., 2010.
- [65] Y. Zhang, A. M. Goss, E. D. Cohen, R. Kadzik, J. J. Lepore, K. Muthukumaraswamy, J. Yang, F. J. DeMayo, W. J. A. and M. S. Parmacek, "A Gata6-Wnt pathway required for epithelial stem cell development and airway regeneration," *Nature genetics*, pp. 40, 862-870, 2008.
- [66] P. W. Reddien and A. Sanchez Alvarado, "Fundamentals of planarian regeneration," *Annual review of cell and developmental biology*, pp. 20, 725-757, 2004.

- [67] T. Adell, E. Salo, M. Boutros and K. Bartscherer, "Smed-Evi/Wntless is required for beta-catenin-dependent and independent processes during planarian regeneration," *Development*, pp. 136, 905-910, 2009.
- [68] K. A. Gurley, J. C. Rink and A. Sanchez Alvarado, "Beta-catenin defines head versus tail identity during planarian regeneration and homeostasis," *Science*, pp. 319, 323-327, 2008.
- [69] S. Sousa, N. Afonso, A. Bensimon-Brito, M. Fonseca, M. Simoes, J. Leon, H. Roehl, M. L. Cancela and A. Jacinto, "Differentiated skeletal cells contribute to blastema formation during zebrafish fin regeneration," *Development*, pp. 138, 3897-3905, 2011.
- [70] K. D. Poss, "Advances in understanding tissue regenerative capacity and mechanisms in animals," *Nat Rev Genet*, pp. 11, 710-722, 2010.
- [71] G. Özhan and G. Weidinger, "Restoring Tissue Homeostasis: Wnt Signaling in Tissue Regeneration After Acute Injury," in *Wnt Signaling in Development and Disease: Molecular Mechanisms and Biological Functions*, New Jersey, John Wiley & Sons, 2014.
- [72] Y. Kawakami, C. Rodriguez Esteban, M. Raya, H. Kawakami, M. Marti, I. Dubova and J. C. Izpisua Belmonte, "Wnt/beta-catenin signaling regulates vertebrate limb regeneration," *Genes & development*, pp. 20, 3232-3237, 2006.
- [73] T. Miura, "Turing and wolpert work together during limb development," *Science signaling*, pp. 6, 14, 2013.
- [74] G. Burnstock, "Purinergeric nerves," *Pharmacol. Rev.*, pp. 24, 509-581, 1972.
- [75] G. Burnstock, "Do some nerve cells release more than one transmitter?," *Neuroscience*, pp. 1, 239-248, 1976.
- [76] G. Burnstock, "The concept of cotransmission: focus on ATP as a cotransmitter and its significance in health and disease," *Eur. Rev.*, pp. 22, 1-17, 2014.
- [77] G. Burnstock, "A basis for distinguishing two types of purinergeric receptor," in *Cell Membrane Receptors for Drugs and Hormones: a Multidisciplinary Approach*, New York, Raven Press, 1978, pp. pp. 107-118.
- [78] G. Burnstock, "Purine and pyrimidine receptors," *Cell. Mol. Life Sci*, pp. 64, 1471-1483, 2007.

- [79] "The Kawate Lab," 2013. [Online]. Available: <http://kawatelab.vet.cornell.edu/research.html>.
- [80] R. Cunha and J. Ribeiro, "ATP as a presynaptic modulator," *Life Sci.*, pp. 68, 119-137, 2000.
- [81] M. Wall and N. Dale, "Auto-inhibition of rat parallel fibre-Purkinje cell synapses by activity-dependent adenosine release.," *J. Physiol.*, pp. 581, 553-565, 2007.
- [82] G. Burnstock and G. Knight, "Cellular distribution and functions of P2 receptor subtypes in different systems.," *Int. Rev. Cytol.*, pp. 240, 31-304, 2004.
- [83] A. Verkhratsky, O. Krishtal and G. Burnstock, "Purinoreceptors in neuroglia," *Mol. Neurobiol.*, pp. 39, 190-208, 2009.
- [84] M. Cotrina, J. Lin, J. Lopez-Garcia, C. Naus and M. Nedergaard, "ATP-mediated glia signaling," *J. Neurosci.*, pp. 20, 2835-2844, 2000.
- [85] H. Ulrich, M. Abbracchio and G. Burnstock, "Extrinsic purinergic regulation of neural stem/progenitor cells: implications for CNS development and repair," *Stem Cell. Revs Rep.*, pp. 8, 755-767, 2012.
- [86] M. Zhuo, G. Wu and L. Wu, "Neuronal and microglial mechanisms of neuropathic pain.," *Mol. Brain*, pp. 4, 31, 2011.
- [87] M. Idzko, D. Ferrari and H. Eltzschig, "Nucleotide signalling during inflammation," *Nature*, pp. 509, 310-317, 2014.
- [88] S. Kinnamon and T. Finger, "A taste for ATP: neurotransmission in taste buds," *Front. Cell. Neurosci.*, pp. 7, 264, 2013.
- [89] B. Khakh and R. North, "Neuromodulation by extracellular ATP and P2X receptors in the CNS," *Neuron*, pp. 76, 51-69, 2012.
- [90] L. Köles, Z. Gerevich, J. Oliveira, Z. Zadori, K. Wirkner and P. Illes, "Interaction of P2 purinergic receptors with cellular macromolecules," *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, p. 377:1-33, 2008.
- [91] R. North, "Molecular physiology of P2X receptors," *Physiol Rev.*, p. 82:1013-67, 2002.
- [92] J. Roberts, C. Vial, H. Digby, K. Agboh, H. Wen and A. Atterbury-Thomas, "Molecular properties of P2X receptors," *Pflugers Arch*, p. 452:486-500, 2006.

- [93] S. Latini and F. Pedata, "Adenosine in the central nervous system: release mechanisms and extracellular concentrations," *J. Neurochem.*, pp. 79, 463-484, 2001.
- [94] Z. Xiang, X. Bo and G. Burnstock, "Localization of ATP-gated P2X receptor immunoreactivity in rat sensory and sympathetic ganglia," *Neurosci. Lett.*, pp. 256, 105–108, 1998.
- [95] S. Kucenas, Z. Li, J. Cox, T. Egan and M. Voigt, "Molecular characterization of the zebrafish P2X receptor subunit gene family," *Neuroscience*, pp. 121, 935–945, 2003.
- [96] L. Erb, Z. Liao, C. Seye and G. Weisman, "P2 receptors: intracellular signaling," *Pflugers Arch*, p. 452:552–62, 2006.
- [97] F. Ortega, R. Pérez-Sen, V. Morente, E. Delicado and M. Miras-Portugal, "P2X7, NMDA and BDNF receptors converge on GSK3 phosphorylation and cooperate to promote survival in cerebellar granule neurons," *Cell Mol Life Sci*, p. 67:1723–33, 2010.
- [98] M. Ryten, S. Yang, P. Dunn, G. Goldspink and G. Burnstock, "Purinoreceptor expression in regenerating skeletal muscle in the mdx mouse model of muscular dystrophy and in satellite cell cultures," *FASEB J.*, pp. 12:1404-6, 2004.
- [99] M. Veldman and S. Lin, "Zebrafish as a Developmental Model Organism for Pediatric Research," *Pediatric Research*, pp. 64, 5, 2008.
- [100] A. Staton and A. Giraldez, "Use of target protector morpholinos to analyze the physiological roles of specific miRNA-mRNA pairs in vivo," *Nature Protocols*, pp. 6, 2035–2049, 2011.
- [101] T. Lisse, E. Brochu and S. Rieger, "Capturing Tissue Repair in Zebrafish Larvae with Time-lapse Brightfield Stereomicroscopy," *J Vis Exp.*, p. 95: 52654., 2015.
- [102] "Gateway® Cloning," 2017. [Online]. Available: http://www.snapgene.com/resources/gateway_cloning/.
- [103] S. Low, J. Kuwada and R. Hume, "Amino acid variations resulting in functional and nonfunctional zebrafish P2X1 and P2X5.1 receptors," *Purinergic Signalling*, p. 4:383–392, 2008.

- [104] M. Grol, P. Brooks, A. Pereverzev and S. Dixon, "P2X7 nucleotide receptor signaling potentiates the Wnt/ β -catenin pathway in cells of the osteoblast lineage," *Purinergic Signal.*, pp. 12(3):509-20, 2016.



8. EKLER

8.1. Etik Kurul Raporu



T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
İZMİR ULUSLARARASI BİYOTİP VE GENOM ENSTİTÜSÜ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU (İBG-HADYEK) iBG-Enstitü
KARARI

TOPLANTI TARİHİ	29/07/2016	TOPLANTI GÜNÜ	Cuma
TOPLANTI SAYISI	08	TOPLANTI SAATİ	14:00

Doç.Dr. Güneş ÖZHAN,

07/2016 Protokol No'lu; yürütücüsü olduğunuz "Purinerjik reseptörler ile Wnt/ β -katenin sinyal yolağı arasındaki ilişkisinin zebrafalığı modelinde araştırılması" isimli projenin uygulanmasında etik açıdan sakınca olmadığına oy birliği ile karar verilmiştir.
Bilgilerinizi ve gereğini rica ederiz.

Prof.Dr.Sedef AKGÜNGÖR
Başkan

Prof.Dr. H. Alper BAĞRIYANIK
Başkan Yardımcısı

Prof. Dr. Ensari GÜNELİ
Üye

Doç.Dr. H. Güneş ÖZHAN
Üye

(ARAŞTIRMACI)

Doç.Dr. Ralph Meuwissen
Üye

Doç.Dr. Devrim PESEN OKVUR
Üye

(KATILAMADI)

Uzm. Umur KELEŞ
Üye

Uzm. Kerem ESMEN
Üye

Ecz. Ferdane KAHRAMAN

Üye

(KATILAMADI)

8.2. Özgeçmiş

ADI SOYADI: İSMAİL KÜÇÜKAYLAK

TC Kimlik No / Pasaport No:	54154627712
Doğum Yılı:	1991
Yazışma Adresi :	Fevzi Paşa Cad.No:237 Altındağ Bornova/İZMİR
Telefon :	(+90) 531 318 7974
Faks :	
e-posta :	kucukaylakismail@gmail.com

EĞİTİM BİLGİLERİ

Ülke	Üniversite	Fakülte/Enstitü	Öğrenim Alanı	Derece	Mezuniyet Yılı
T.C.	Dokuz Eylül Üniversitesi	Sağlık Bilimleri Enstitüsü	Tıbbi Biyoloji ve Genetik	Yüksek Lisans	
T.C.	İstanbul Teknik Üniversitesi	Fen Edebiyat Fakültesi	Mol. Biyoloji ve Genetik	Lisans	2014

AKADEMİK/MESLEKTE DENEYİM

Kurum/Kuruluş	Ülke	Şehir	Bölüm/Birim	Görev Türü	Görev Dönemi
Dresden Teknik Üniversitesi	Almanya	Dresden	Centre for Regenerative Therapies	Stajyer Öğrenci	Haziran-Ağustos 2015
İstanbul Teknik Üniversitesi	T.C.	İstanbul	Moleküler Biyoloji ve Genetik	Stajyer Öğrenci	Ocak – Haziran 2014
Ege Üniversitesi	T.C.	İzmir	Beyin Araştırmaları Merkezi	Stajyer Öğrenci	Haziran-Temmuz 2012

UZMANLIK ALANLARI

Uzmanlık Alanları
Moleküler ve hücre biyolojisi, Zebrafırlığı, Gelişim Biyolojisi, Rejenerasyon

DİĞER AKADEMİK FAALİYETLER

Son Bir Yılda Uluslararası İndekslere Kayıtlı Makale/Derleme İçin Yapılan Danışmanlık Sayısı			
Son Bir Yılda Projeler İçin Yapılan Danışmanlık Sayısı			
Yayınlara Alınan Toplam Atıf Sayısı			
Danışmanlık Yapılan Öğrenci Sayısı		Tamamlanan	Devam Eden
	Yüksek Lisans		

	Doktora		
	Uzmanlık		
Diğer Faaliyetler (Eser/görev/faaliyet/sorumluluk/olay/üyelik vb.)			

ÖDÜLLER

	Ödülün Adı	Alındığı Kuruluş	Yılı
☐	Erasmus Staj Hareketliliği Program Bursu	T.C. Avrupa Birliği Bakanlığı	2015

YAYINLARI

SCI, SSCI, AHCI indekslerine giren dergilerde yayınlanan makaleler

Diğer dergilerde yayınlanan makaleler

Hakemli konferans/sempozyumların bildiri kitaplarında yer alan yayınlar
