



T.C.

İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**AKSOLOTL'DA KUYRUK REJENERASYONUNU SAĞLAYAN  
MOLEKÜLER MEKANİZMALARIN PROTEOMİKS YÖNTEMİ  
İLE TANIMLANMASI**

MAHMUT ERHAN AVŞAROĞLU

SİNİRBİLİM ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Yrd. Doç. Dr. TURAN DEMİRCAN

İSTANBUL-2017



T.C.

İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**AKSOLOTL'DA KUYRUK REJENERASYONUNU SAĞLAYAN  
MOLEKÜLER MEKANİZMALARIN PROTEOMİKS YÖNTEMİ  
İLE TANIMLANMASI**

MAHMUT ERHAN AVŞAROĞLU

SİNİRBİLİM ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Yrd. Doç. Dr. TURAN DEMİRCAN

İSTANBUL-2017

### TEZ ONAY FORMU

Kurum : İstanbul Medipol Üniversitesi  
Programın Seviyesi : Yüksek Lisans (X) Doktora ()  
Anabilim Dalı : Sinirbilim  
Tez Sahibi : Mahmut Erhan AVŞAROĞLU  
Tez Başlığı : Aksolotl'da Kuyruk Rejenerasyonunu Sağlayan Moleküler Mekanizmaların Proteomiks Yöntemi ile Tanımlanması  
Sınav Yeri : İstanbul Medipol Mega Üniversite Hastanesi  
Sınav Tarihi : 11.01.2017

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

#### Danışman

Yrd.Doç.Dr. Turan DEMİRCAN

#### Kurumu

İstanbul Medipol Üniversitesi

İmza



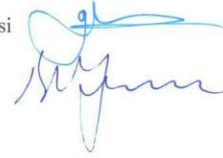
#### Sınav Jüri Üyeleri

Prof.Dr. Gürkan ÖZTÜRK

İstanbul Medipol Üniversitesi

Prof .Dr. Bayram YILMAZ

Yeditepe Üniversitesi



Yukarıdaki jüri kararıyla kabul edilen bu Yüksek Lisans tezi, Enstitü Yönetim Kurulu'nun ..19../01../2017.. tarih ve ..2017../...03... - ..05... sayılı kararı ile şekil yönünden Tez Yazım Kılavuzuna uygun olduğu onaylanmıştır.

Prof.Dr. Nésrin EMEKLİ

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü



## BEYAN

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

MAHMUT ERHAN AYŞAROĞLU



## TEŞEKKÜR

Öncelikli olarak danışmanım Yard. Doç. Turan Demircan'a yüksek lisans dönemim boyunca beni desteklediği, bana güvendiği, ve en değerli projelerinden birisinde çalışma fırsatı sunduğu için teşekkür ederim. Kendisinin doğrudan çözüm odaklı olması, sakin ve destekleyici kişiliği çalışmalarımın daha verimli olmasını sağlayıp, güçlükleri kolaylıkla üstesinden gelinebilir bir haline getirdi. Sahip olduğu eleştirel düşüncesi ve teknik bilgileri onunla çalışmayı çok öğretici bir deneyim haline getirdi.

Tez çalışmama kattıkları yeni öneriler ve yaptıkları önemli eleştiriler için değerli jüri üyelerim Prof. Dr. Gürkan Öztürk, Prof. Dr. Bayram Yılmaz ve Prof. Dr. Ertuğrul Kılıç'a teşekkür ederim.

Tez çalışmamın histolojik analizlerinde yardımlarını esirgemeyen Yard. Doç. İlknur Keskin, Araş. Gör. Nilüfer Aytürk'e teşekkür ederim.

Tez çalışmam süresince bana yardımcı olan grup arkadaşlarım Berna Yıldırım, Ömer Çağrı Ömeroğlu ve Ece Cana Fesçioğlu'na teşekkür ederim.

Abilerim olarak gördüğüm Taha Keleştemur, Hilmi Kaan Alkan ve Mustafa Çağlar Beker'e; hemşehrilerim Burak Çağlayan ve Berrak Çağlayan'a; gerektiği zaman yardımları esirgemeyen değerli dostlarım Arman Dalay, Serdar Altunay, Semih Durmuş ve Aysun Dilden ile diğer Elektrofizyoloji laboratuvarı üyelerine teşekkür ederim.

Dost canlısı bir ortam oluşturarak laboratuvar çalışmalarımı keyifli bir hale dönüştüren Emre Vatandaşlar, Tuba Akgül Çağlar, Gülsena Baydaş, Pelin Dilsiz, Esra Nur Ekmekçioğlu, Sadık Bay, Betül Polat, Eşref Çelik, Öykü Dinçkol, Fulya Köksalar, Neşe Altuncu ve diğer bütün REMER çalışanlarına teşekkür ederim.

Psikolog olmalarına rağmen grubumuza dahil olup çalışmalarımızda bize yardımcı olan, sahip oldukları farklı bakış açıları ile çalışmalarımıza katkı sağlayan ve ellerinden gelen her türlü maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen değerli dostlarım Şerife Leman Köybaşı, Fatma Betül Sezgin ve Reyyan Uysal Kaba'ya teşekkür ederim.

Çalışmalarım süresince zaman ve mekan ayırt etmeksizin her anlamda yardımını ve desteğini esirgemeyen değerli kardeşim, meslektaşım ve ev arkadaşım şair Emre Erdem'e teşekkür ederim.

Son olarak bana kendime olan inancımın daha fazla inanan ve bu inançlarını hiçbir zaman yitirmeyeceğini bildiğim annem Saliha Avşaroğlu, babam Yusuf Avşaroğlu ve amcam Hasan Avşaroğlu'na; desteklerini daima arkamda hissettiğim bütün Avşaroğlu ve Ateş ailesi'ne çok teşekkür ederim.

# İÇİNDEKİLER

TEZ ONAY FORMU .....	i
BEYAN.....	ii
TEŞEKKÜR .....	iii
TABLO LİSTESİ .....	vi
RESİM LİSTESİ .....	vii
ŞEKİL LİSTESİ .....	viii
KISALTMALAR .....	iiiv
1.ÖZET.....	1
2.ABSTRACT .....	2
3.GİRİŞ VE AMAÇ .....	3
4.GENEL BİLGİLER.....	4
4.1.Rejenerasyon .....	4
4.2.Amfibilerde rejenerasyon.....	7
4.2.1.Yara iyileşmesi.....	8
4.2.2.Fagositoz ve yıkım .....	8
4.2.3.Aynılaşıma .....	9
4.2.4.Blastema.....	9
4.2.5.Morfogenez .....	10
4.2.6.Büyüme .....	10
4.3.Aksolotl .....	12
4.3.1.Aksolotl tarihçesi. ....	12
4.3.2.Bir deneysel model olarak aksolotl. ....	15
4.3.3.Aksolotl sinir sistemi yenilenmesi. ....	19
4.4.Kuyruk-Omurilik yenilenmesi. ....	19
4.5.Proteomiks. ....	22

<b>5.MATERYAL VE METOT</b> .....	24
5.1.Aksolotlar.....	24
5.2.Örneklerin alınması.....	24
5.3.Histokimyasal boyama .....	24
5.3.1.Hematoksilen eozin.....	25
5.3.2.Masson'un anilin mavili trikrom boyama yöntemi .....	25
5.3.3.Luksol fast blue boyama .....	26
5.3.4.Periyodik Asit Schiff(PAS) Boyama .....	26
5.3.5.Weigert - Von Gieson Boyama.....	27
5.4.Biyoinformatik .....	27
5.5.Proteomik Analiz Aşaması.....	29
5.6.İmmünofloresan boyama.....	30
<b>6.BULGULAR</b> .....	31
6.1.Histolojik Boyamalar .....	32
6.2.Aksolotl kuyruk rejenerasyonunda görevli proteinler.....	38
6.3.Aksolotl omurilik rejenerasyonunda görevli proteinler .....	42
6.4.İmmunoflöresan boyama .....	50
<b>7.TARTIŞMA</b> .....	66
<b>8.SONUÇ</b> .....	70
<b>9.KAYNAKLAR</b> .....	71
<b>10.ETİK KURUL ONAYI</b> .....	84
<b>11.ÖZGEÇMİŞ</b> .....	93

## TABLO LİSTESİ

Tablo 5.4.Nükleotid - protein dönüşüm algoritması .....	28
Tablo 6.3.1.Sinirsel görevi olan proteinlere ait hit verileri ile ve fare gen ve protein ortoloğu .....	45
Tablo 6.3.2.Omurilik yenilenmesinde görevli proteinlerin işlevleri ve ifade değişiklikleri.....	47





## RESİM LİSTESİ

Resim 4.3.Dumeril-başkalaşım geçirmiş aksolotl ve neotenik aksolotl .....	14
Resim 4.4.Ampütasyon sonrası kuyruk ve omurilik yenilenmesi .....	21
Resim 6.1.1.Aksolotl kuyruk Hematoksilen-Eozin boyama.....	33
Resim 6.1.2.Aksolotl kuyruk Masson'un anilin mavili trikrom boyama .....	34
Resim 6.1.3.Aksolotl kuyruk Luksol Fast Blue boyama .....	35
Resim 6.1.4.Aksolotl kuyruk Periyodik Asit Schiff Boyama .....	36
Resim 6.1.5.Aksolotl kuyruk Weigert Von Gieson boyama.....	37
Resim 6.4.1.Aksolotl kuyruk Hsp70/Hsc70 immunoflöresan boyama.....	51
Resim 6.4.1.1.Aksolotl kuyruk Hsp70/Hsc70 immunoflöresan boyama omurilik bölgesi .....	52
Resim 6.4.1.2.Aksolotl kuyruk Hsp70/Hsc70 immunoflöresan boyama epidermal bölge.....	53
Resim 6.4.2.Aksolotl kuyruk Laminin immunoflöresan boyama .....	54
Resim 6.4.2.1.Aksolotl kuyruk Laminin immunoflöresan boyama-omurilik.....	55
Resim 6.4.2.2.Aksolotl kuyruk Laminin immunoflöresan boyama-epidermis.....	56
Resim 6.4.3. Aksolotl kuyruk Protein phosphatase 1 katalitic subunit beta immunoflöresan boyama .....	57
Resim 6.4.3.1.Aksolotl kuyruk PP1 $\beta$ omurilik immunoflöresan boyama .....	58
Resim 6.4.3.2.Aksolotl kuyruk PP1 $\beta$ sinir lifleri immunoflöresan boyama .....	59
Resim 6.4.4.Aksolotl Tubulin immunoflöresan boyama .....	60
Resim 6.4.4.1.Aksolotl Tubulin immunoflöresan boyama omurilik .....	61
Resim 6.4.4.2.Aksolotl Tubulin immunoflöresan boyama epidermal bölge .....	62
Resim 6.4.5.Aksolotl $\alpha$ -Smooth Muscle Aktin( $\alpha$ SMA) boyama.....	63
Resim 6.4.5.1.Aksolotl $\alpha$ -Smooth Muscle( $\alpha$ SMA) boyama .....	64
Resim 6.4.5.2.Aksolotl $\alpha$ -Smooth Muscle( $\alpha$ SMA) boyama .....	65

## ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 4.1.Farklı rejenerasyon süreçleri ve sınıflandırılmaları .....	6
Şekil 4.2.Hasar sonrası gerçekleşmesi muhtemel olayların olası basamakları .....	8
Şekil 4.2.6.Aksolotl modelinde kol rejenerasyonu günlere göre gelişim .....	12
Şekil 4.3.2.1.Aksolotl canlı görünümü ve organlarının organizasyonu .....	17
Şekil 4.4.Spallanzani'nin çizimi ile semender(1-5) ve iribaş(6-8) kuyruk yenilenmesi .....	19
Şekil 4.5.Proteomiks veri analizi akış şeması .....	22
Şekil 6.2.1.Kuyruk rejenerasyonunda tanımlanan proteinlerin hücresel bileşen analizi .....	39
Şekil 6.2.2.Kuyruk rejenerasyonunda tanımlanan proteinlerin biyolojik süreç analizi .....	40
Şekil 6.2.3.Kuyruk rejenerasyonunda tanımlanan proteinlerin moleküler fonksiyon analizi .....	41
Şekil 6.3.1.Omurilik rejenerasyonu için tanımlanan proteinlerin biyolojik süreçler analizi .....	42
Şekil 6.3.2.Omurilik rejenerasyonu için tanımlanan proteinlerin hücresel bileşen analizi .....	43
Şekil 6.3.3.Omurilik rejenerasyonu için tanımlanan proteinlerin moleküler fonksiyon analizi .....	44

## KISALTMALAR

mL	: mililitre
$\mu$ l	: mikrolitre
$\mu$ m	: mikrometre
g	: gram
V	: Volt
ng	: nanogram
$\mu$ M	: mikromolar
nM	: nanomolar
rpm	: Rotations Per Minute
TGF $\beta$	: Transforming Growth Factor $\beta$
WNT	: Wingless-type
BMP	: Bone Morphogenic Protein
FGF	: Fibroblast Growth Factor
IUAC	: Indiana University Axolotl Colony
AGSC	: Ambystoma Genetic Stock Center
GFP	: Green Flourescent Protein
OCT	: optimal cutting temperature
dH <sub>2</sub> O	: distile su
PFA	: Paraformaldehit
PBS	: Phosphate Buffered Saline
NCBI	: National Center for Biotechnology Information
BLAST	: Basic Local Alignment Search Tool
UPLC	: Ultra Performance Liquid Chromatography
DAPI	: 4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dihydrochloride
PP1 $\beta$	: Protein phosphatase-1 $\beta$ isoform

$\alpha$ SMA	: $\alpha$ Smooth Muscle Actin
HSP70	: Heat-Shock Protein 70
PSS	: Periferal Sinir Sistemi
MSS	: Merkezi Sinir Sistemi
E.Y.K.D.	: En Yüksek Katsayı Değeri
E.Y.O.D.	: En Yüksek Ortalama Değeri
E.D.O.D.	: En Düşük Ortalama Değeri
Ref.	: Referans
Orth.	: Ortolog
Prot.	: Protein
SLIT3	: Slit Guidance Ligand 3
NR4A2	: Nuclear Receptor Subfamily 4, Group A, Member 2
NURR1	: Nur Related Protein-1
KDM2B	: Lysine Demethylase 2B
DPSYL2	: Dihydropyrimidinase Like 2
NDEL1	: Nuclear distribution protein nudE-like 1
EPHA7	: Ephrin type-A receptor 7
NAMPT	: Nicotinamide phosphoribosyltransferase
GAPDH	: Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
COL3A1	: Collagen Type III Alpha 1 Chain
COL4A2	: Collagen Type IV Alpha 2 Chain
COL6A1	: Collagen Type VI Alpha 1 Chain
COL6A2	: Collagen Type VI Alpha 2 Chain
COL6A3	: Collagen Type VI Alpha 3 Chain
SYAP1	: Synapse Associated Protein 1

## 1. ÖZET

### AKSOLOTL'DA KUYRUK REJENERASYONUNU SAĞLAYAN MOLEKÜLER MEKANİZMALARIN PROTEOMİKS YÖNTEMİ İLE TANIMLANMASI

*Ambystoma mexicanum*(aksolotl) su semenderleri sınıfından yaşamı boyunca neotenik özelliğe sahip olan bir canlıdır. Deneysel araştırmalarda sahip olduğu yüksek rejenerasyon yeteneği ve kansere karşı gösterdiği dayanıklılık sebebiyle model organizma olarak kullanılmaktadır. Aksolotlar maruz kaldıkları hasarlar sonrası iç organlarını, ekstremitelerini, merkezi sinir sistemlerini ve omuriliklerini eski fonksiyonel özelliğini tekrardan gösterecek şekilde yenileyebilmektedirler. Sahip oldukları bu özelliğin moleküler ve hücresel sinyal mekanizmaları geçmiş dönemlerde teknolojik imkanların yetersiz olması sebebiyle tam olarak anlaşılamamıştır. Günümüzün çığır açan omiks teknolojisi insanlığa bu durumun üstesinden gelebilecek imkanlar sunmaktır. Omiks teknolojisinin en çok çalışılan dallarından birisi olan proteomiks teknolojisi, hücresel olayların ve etkileşimlerin protein düzeyinde anlaşılması için kullanılmaktadır. Bu çalışmada aksolotl canlısının sahip olduğu rejenerasyon yeteneğini anlaşılması için canlının omurilik içeren kuyruk bölgesi ampüte edilmiştir. Rejenerasyon süresince 0. gün, 1. gün , 4. gün ve 7. gün olacak şekilde farklı zaman aralıklarında alınan örneklerden hücresel olaylar ve etkileşimlerde görev alan proteinler proteomiks yöntemi ile tanımlanmış, aksolotl proteom veritabanı genişletilmiştir. Anlamli düzeyde değiştiği tanımlanan proteinler içerisinde omurilik yenilenmesinde görev alabilecek sinirsel görev ile ilgili proteinler seçilerek gen ontoloji analizleri yapılmış; moleküler fonksiyon süreçlerinde, hücresel bileşen olarak katıldıkları süreçlerde ve biyolojik süreçlerde aldıkları görevler analiz edilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** aksolotl, omurilik, rejenerasyon, proteomiks

## **2.ABSTRACT**

### **CHARACTERIZATION OF MOLECULAR MECHANISMS PROVIDING TAIL REGENERATION IN AKSOLOTL BY THE PROTEOMICS METHOD**

*Ambystoma mexicanum*(Mexican axolotl) is an aqueous salamander that posses neoteny during whole life. Axolotls are useful experimental models in laboratories due to their unique regeneration capacity and resistance to cancerous diseases. Axolotls can regenerate their missed extremities, internal organs, brains, and spinal cords with full recovery of function after damages or amputations. The molecular and cellular signaling mechanisms of this speciality they possess have not been fully understood in the past due to the insufficient technological possibilities. Today's groundbreaking omics technology provides humanity with the opportunities that can come from its superiority. One of the most studied branches of Omics technology is proteomics which is using for understanding cellular events and interactions at protein level. In order to understand the regenerative ability of experimental model axolotl in this study, we amputated the tail containing spinal cord region to observe cellular events and interactions during tail regeneration in different time intervals. According to our results, axolotl proteomics database was expanded by identifying proteins detected on day 0, day 1, day 4 and day 7 samples by proteomics method. By using significantly changed proteins, neuron related proteins that can serve in spinal cord regeneration were selected. Selected neuronal proteins were analyzed in gene ontology analysis that contain molecular functional processes, cellular components, and biological processes.

**Key Words:** axolotl, spinal cord, regeneration, proteomics

### 3.GİRİŞ VE AMAÇ

Rejenerasyon, dışarıdan bir hasara ve yaralanmaya maruz kalarak hasarı gören doku, organ veya ekstremitenin eski fonksiyonunu idame ettirecek şekilde tekrardan inşa edilmesi sürecidir. Bu olay canlılık şubeleri arasında değişiklik göstermekle beraber omurgalı canlı türleri geniş kapsamda düşünüldüğünde en az rejenerasyon yeteneğine sahip sınıftır. Omurgalı canlılar arasında memelilerde sınırlandırılmış düzeyde bir rejenerasyon gerçekleşmektedir. Ancak omurgalı canlılar arasında da istisnai olarak bazı semender türlerinde bu olay yüksek düzeyde görülür. Su semenderlerinden olan aksolotl sahip olduğu rejenerasyon kapasitesi ile bu disiplinde kullanılan temel model organizmalardan birisi haline gelmiştir. Bu canlılar; kalplerini, karaciğerlerini, dalaklarını vb. diğer iç organlarını, kuyruklarını, ekstremitelerini, beyinlerini ve hatta omuriliklerini dahi yenileyebilmektedir.

Günlük yaşantımızda meydana gelen iş kazaları, yaralanmalar, yanmalar ve uzuv kayıpları, omurilik yaralanmaları gibi vahim durumlar maruz kalanlar tarafından çaresizce kabullenilmekte herhangi bir çözüm üretilememektedir. Ancak aksolotl bizim maruz kaldığımızda çözüm üretmediğimiz birçok hasarı kendi sistemlerinde var olup henüz tam olarak çözülememiş olan hücresel ve moleküler sinyalleri sayesinde tamir edebilmekte, yenileyebilmektedirler. Günümüz omiks teknolojisi imkanlarını kullanarak aksolotl modelinin sahip olduğu eşsiz rejenerasyonun sırlarını adım adım anlamak artık mümkün hale gelmiştir. Bu sebeple de çalışmamızda proteomiks analiz metodu kullanılarak kuyruk bölgesi kesilen aksolotl'un bu hasarı nasıl tamir ettiğini, hasarın olduğu bölgede yer alan omurilik rejenerasyonunun hangi moleküler yolları ve hangi hücresel sinyalleri bu süreçte kullandığını ve aksolotl modeline ait sayıca yetersiz olan proteom veritabanını da daha geniş bir hale getirmeyi amaçladık. Analiz verilerinden elde edilen sinirsel görevleri olan proteinlerin rol oynadığı süreçleri biyoinformatik analizler ile tanımlayarak omurilik rejenerasyonunu geniş bir pencereden aydınlatmaya çalıştık.

## 4.GENEL BİLGİLER

### 4.1. Rejenerasyon

Rejenerasyon olmasaydı hayat olmazdı, eğer her şey rejenere olabilseydi ölüm olmazdı. Rejenerasyonun Temel Prensipleri kitabının yazarı Richard J Goss kitaba bu sözleri ile başlayıp bütün organizmaların bu iki uç nokta arasında varlığını sürdürmekte olduğunu ifade edip mutlak ölümsüzlüğe asla ulaşamayacağını, böylesi bir durumun üremeye ters olduğunu belirterek başlar sözlerine.(1) Rejenerasyona dair ilk gözlem 1712 yılında Rene-Antoine Ferchault de Reaumur tarafından tatlı su ıstakozunun kolunun yenilenmesini gözlemlemesi ve rapor etmesiyle başlamıştır. Aynı yüzyıl içerisinde bu kavram farklı canlı organizmalarda yapılan gözlemlerle vurgulanmıştır. 1740 yılında Abraham Trempley hidra'yı, 1745 yılında Charles Bonnet halkalı solucanları, 1769 yılında Lazzaro Spallanzani amfibileri ve 1770'li yıllarda Peter Simon Pallas planaryaları rejenerasyon yapabilen canlılar olarak gözlemlemiş ve rapor etmişlerdir. On dokuzuncu yüzyılın başlarında, ilk doğabilimciler birçok çeşit hayvanda rejenerasyonu tarif etmişlerdir, ancak 1838'de Matthias Schleiden ve Theodor Schwann tarafından hücre teorisinin geliştirilmesine ve histolojik tekniklerin geliştirilmesine kadar rejenerasyon üzerine yapılan araştırmalar esas itibariyle sadece dışarıdan yapılan gözlemler olarak kalmıştır. Mendel öncesi genetik çağda Weismann ekstremitenin yenilenmesinde önemli bir nokta olan morfogenez teorisini ortaya atmıştır. On dokuzuncu yüzyılın sonlarında, Thomas Hunt Morgan Drosophila genetiği üzerine yaptığı meşhur çalışmalarına başlamadan önce, rejenerasyon araştırmaları yapan okula liderlik etmiştir.(2)

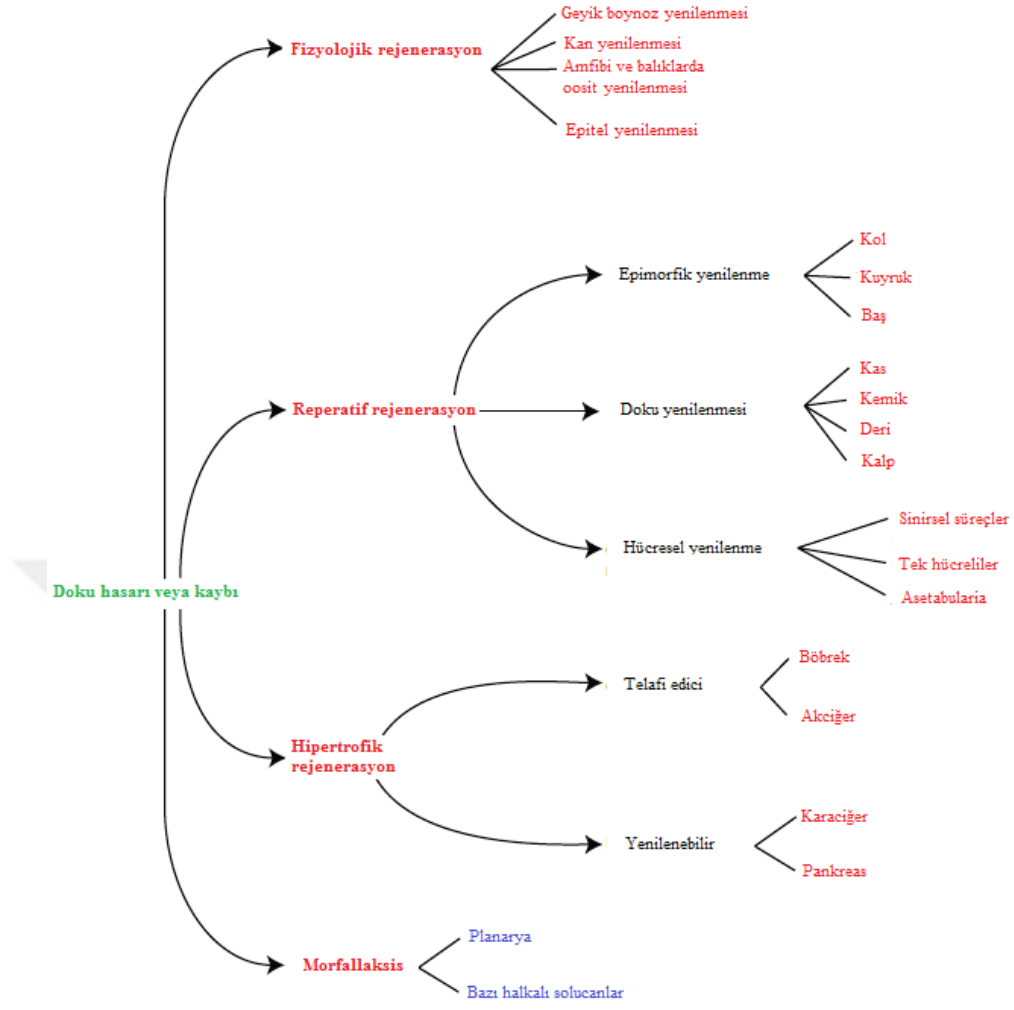
Rejenerasyon 20.yy'da birçok türün çeşitli yenilenme süreçleri hakkında detaylı histolojik tanımlamalarla başlamış ancak birkaç on yıl sonra memelilerin rejenerasyonuna olan ilgi pek çok insan dokusunun rejenere olabilme yeteneğinin eksikliği nedeniyle azalmıştır. Omurgasız rejenerasyon çalışmaları Child'ın metabolik gradient teorileri tarafından büyük oranda etkilenmiş ve amfibilerin ekstremitte rejenerasyonu yapılan gözlemsel açıklamalardan ziyade rejenerasyondaki özelleşmiş doku bileşenlerinin rolü, aynılaşmanın rolü ve morfogenezin rolü gibi deneysel açıklanmaya başlamıştır. II. Dünya Savaşı döneminde kurbağalar ve diğer rejenerasyon kapasitesine sahip olmayan canlıların ekstremitte yenilenmesi uyarılmaya çalışılmıştır. Rejenerasyon konusundaki ilgi, yüzyılın ikinci yarısında azalırken, memeli dokuları da dahil olmak üzere birçok sistemde rejenerasyon üzerine yoğun çalışmalar yapılmıştır. Sadece yüzyılın sonlarına doğru, morfogenez üzerine yeni görüşler, alana tekrardan genel bir ilgi uyandırmıştır. Bu yüzyılın başlarında önemli oldukları anlaşılan kök hücreler ve bu hücrelerin insan dokularının yenilenmesini teşvik etme potansiyeli adeta bu çalışma alanına yeni bir hayat vermiştir. Bu sebeple de günümüz rejenerasyon çalışmalarından beklentiler yüksektir.(2)



Rejenerasyon genel bir ifade olarak meydana gelen bir hasar sonucu kaybedilen vücut kısımlarının tekrardan yenilenmesi veya bölünen parçalardan tekrardan yeni bir canlının oluşturulmasıdır.(2) Bu olayın gerçekleşme kapasitesi canlılar arasında çeşitlilik gösterir. Örneğin planaryalar kopan başlarından veya küçük vücut parçalarından bütün yapılarını tamamen oluşturabilmekte, aksolotl gibi semender türleri hasar gören ya da ampute edilmiş ekstremitelerini tekrardan oluşturabilmektedir.(3, 4) İnsanlar ise kan, bağırsak epiteli, kemik dokusu, saç ve tırnakta ileri denilebilecek düzeyde rejenerasyon yaparken; karaciğer, böbrek ve deri gibi vücut organları ve kısımlarında da sınırlı düzeyde yapabilmektedir. Bu farklılıklar göz önünde bulundurulduğunda rejenerasyon; fizyolojik rejenerasyon, hipertrofik rejenerasyon, reperatif rejenerasyon ve aseksüel üreme olarak 4 ana başlık altında incelenebilir.(2)

Fizyolojik rejenerasyon; kopan veya hasar gören vücut üyelerinin, ölen hücre gruplarının doğal olarak, kendiliğinden yenilenmesidir. Memelilerin kan hücrelerinin yenilenmesi, bağırsak mukozasının yenilenmesi ve epitel hücrelerinin yenilenmesi ile geyiklerin boynozlarının yenilenmesi doğal olarak gerçekleşen fizyolojik rejenerasyona örnek olarak verilebilir.(5-7) Hipertrofik rejenerasyon; iç organlarda dokunun alınması veya kaybına bağlı olarak meydana gelen onarım ya da yenilenmedir. Bu sürecin kısa süre içerisinde gerçekleşmesi vücut homeostazının ayarlanması ve sistemlerinin organize bir şekilde çalışmasının devamı için son derece kritiktir. Karaciğer ve pankreas hücrelerinde görülen yenilenme hipertrofik rejenerasyona örnektir.(6, 8)

Reperatif rejenerasyon; vücudun hasar görmüş veya kaybedilmiş bir parçasının hücre düzeyinden başlayıp hasar gören kısmın organ düzeyinde yeniden yapımı ile sonuçlanan süreçtir. Epimorfik rejenerasyon, dokusal rejenerasyon ve hücrel rejenerasyon olmak üzere üç grup altında incelenebilir. Bu ayırımı yara iyileşmesinden sonra kök hücrelerin ve farklılaşmamış öncül hücrelerin sayıca bol olduğu blastema formunun oluşup oluşmamasına bağlı olarak değerlendirilmektedir.(2) Aseksüel üreme bir ya da daha fazla parçaya ayrılmış organizmanın o parçalardan her birinin tekrardan yeni bir organizmayı oluşturması olarak tanımlanır. Planarya'da gerçekleşen olay bu kavrama örnek olarak verilebilir. Süreç boyunca moleküler ve hücrel düzeyde gerçekleşen büyük ölçüdeki benzerliklerden ötürü rejenerasyon ile aynı kavram içerisinde yer almaktadır.(9)



Şekil 4.1.Farklı rejenerasyon süreçleri ve sınıflandırılmaları(1)

Epimorfik rejenerasyon sözcüğünü ilk olarak tanımlayan kişi Thomas Hunt Morgan'dır. Gelişimini tamamlayan yeni parçadan önce meydana gelen malzemelerin çoğalması şeklinde tanımlamıştır.(10) Günümüzde epimorfik rejenerasyon epitel-mazenkimal etkileşimler boyunca oluşup morfogenetik bilgiyi içerip ifade eden blastema formunun varlığına bağlı olarak gerçekleşen rejenerasyon olarak tanımlanır. Blastema formu hasar oluşuktan sonra kaybı gerçekleşen ekstremitenin aynı şekilde oluşmasına olanak sağlayan hücreleri içerir. Bu hücreler yeniden inşa edilecek hasarlı bölgenin hem hücresel hem de moleküler düzeyde büyümesini sağlayacak ve doğru paterni oluşturacak bilgiyi içerir. Hasar sonrası hasarın gerçekleştiği bölgede yara iyileşmesi ve bunu takiben hasarlı kısımların yeniden onarım amaçlı yıkımı gerçekleşir.(11) Yara iyileşmesini sonrasında, kemik hücreleri ve epidermal hücrelerin aynılaşması, inflamatuvar hücrelerin aktivitesi ve sinirsel uyarılarının da rolü ile hasarı içeren bölge ve etrafında blastema hücreleri lokalize olurlar.(12) Blastema formunun oluşumu daha çok amfibilerde gerçekleşen ekstremitte rejenerasyonunda çalışılmakta olan araştırma konularından birisidir. Epimorfik yenilenmenin kusursuzluğu için kolun ampütasyonunu takiben yara iyileşmesi, hasarlı kısımların yıkılması, hasar bölgesindeki kök hücre popülasyonunun artması, sinir hücrelerinin uyarımı ile kök hücreler ve farklılaşmamış hücrelerin hasarlı bölgeye göç edip toplanması ve son olarak yenilenme olayının anahtarı blastema formunun oluşması sırasıyla gerçekleşmesi gereken aşamalardır. Eğer bu olaylardan herhangi biri gerçekleşmez ya da yeterli oranda meydana gelmez ise hasar ya blastema oluşmadığı için tamir edilemez ya da anormal bir yenilenme süreci ile noktalanmaktadır.(13)

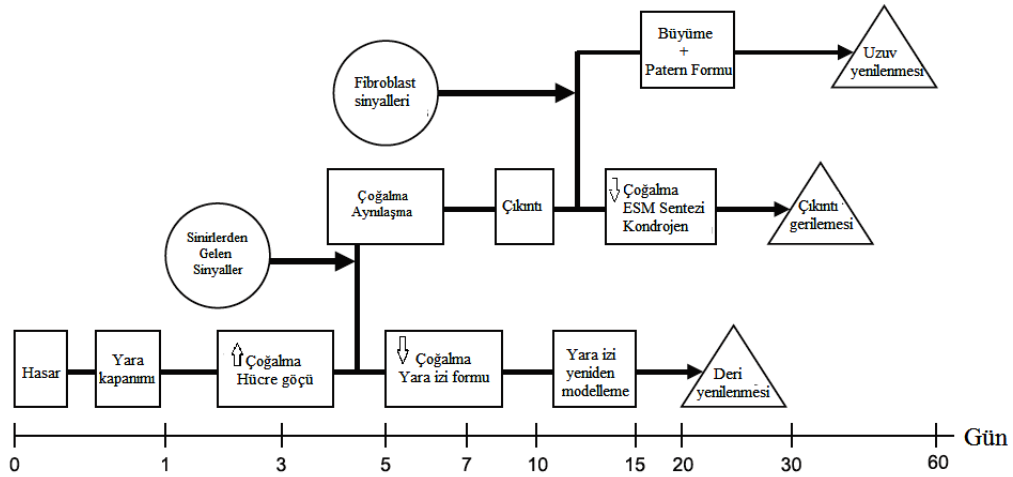
#### **4.2. Amfibilerde rejenerasyon**

Amfibilerin ekstremitelerinin doğal olarak yenilenebilmesi rejenerasyon çalışmalarında göze çarpan ve üzerine yoğunlaşılacak harikulade bir olay olarak yer tutmaktadır. Amfibilerde rejenerasyonu ilk defa kuyruğun ampütasyonu sonrası meydana gelen yenilenmeyi gözlemleyen İtalyan doğa bilimci Lazzaro Spallanzani'nin 18. yy'da rapor etmesi ile başlar. O zamandan itibaren günümüze kadar süre gelen araştırmalar bu eşi benzeri olmayan olayın gerçekleşmesinde rol oynayan faktörleri ve molekülleri bulmaya çalışmaktadır.(14) Kurulan hipotezlerle memeli sisteminde var olan veya olmayan aktörler tespit edilip rejenerasyonun optimal düzeyde memelilerde de gerçekleştirebilmek için çalışmaktadır. Hasar gören ya da ampüte edilen kol veya kuyruk kök hücreler ve farklılaşmamış hücreler ile bu hücrelerin etrafında gerçekleşen büyümeyi kontrol eden Tranforme edici büyüme faktörü beta(15), anterior-posterior büyümenin kontrolünü sağlayan Sonic Hedgehog ve Fibroblast büyüme faktörleri(16), sinirsel yönelim ve yenilenmede görevli Wnt sinyalleri(17, 18), kas-kemik gelişimi ve yenilenmesinde görevli Bone morfojenik protein(19), morfogenez, kontrollü büyüme ve kök hücrelerin farklılaşmasında görevli Hox proteinleri(20, 21) ve rejenerasyon tetikleyici olduğu bilinen retinoik

asit(22) gibi sinyal moleküllerinin yönlendirimi ile ampute olan kısım ile aynı olacak şekilde yeniden inşa edilen tam bir kol veya kuyruk üretilir.

#### 4.2.1. Yara iyileşmesi

Hasarın ya da amputasyonun hemen sonrasında ekstremitelerdeki kasların kasılıp gevşemesi sebebiyle yumuşak doku toplanıp geriye doğru çekilir. Daha sonra ilk dakikalar içerisinde kanayan damarlardaki kanama durur. Saatler içerisinde hasarın olduğu bölgedeki epidermal hücreler amputasyon yüzeyinden serum ve hücreler arası sıvıların yoğun olduğu iç kısımlara doğru göç etmeye başlarlar. Göç eden epidermis kısmı amputasyonun yapıldığı kısmı tamamen kapatır. Bu süreç amputasyonun büyüklüğüne bağlı olarak değişkenlik gösterir. Saatler içerisinde olabilir ya da bir gün veya iki gün sürebilir. Yara iyileşmesi sürecinin sonu memelilerde gözlenenin aksine iz kalmadan ya da ayırt edilemeyecek derecede iz kalacak şekilde gerçekleşmektedir.(11)



Şekil 4.2. Hasar sonrası gerçekleşmesi muhtemel olayların olası basamakları.(13)

#### 4.2.2. Fagositoz ve yıkım

Ampütasyon sonrası yara kısmının iyileşmesi ile beraber ampute edilen kolun distal kısmının sonunda tam olarak ayırt edilemeyen histolojik bir belirginlik bulunur. Bu histolojik yapı kasların, sinirlerin, kemiğin ve derinin en uçta kalan kısımlarının travma sonrası izlerini taşır. Buradaki histolojik kalıntı infalamatuvar hücreler tarafından yıkılır, fagosite edilir.. Bu yıkım süreci memelilerde kısa süreli olduğu ve tam olarak gerçekleşmediği için iz bırakmaktadır.(11, 15) Fagositoz ve yıkım aşaması sürecinin bu erken süreç içerisinde hızlı bir şekilde gerçekleşmesi kolun kasar görmüş kısmında yapılan yara iyileşmesi sürecini etkinliği artırılmış bir rejenerasyon sürecine dönüştürür. Bu süreçte distal hücre dışı matriksteki matriksin

metalloproteinazların aktiviteleri ile yeniden organize edilmesi ve trombin gibi serin proteazların uyarıcı etkisi ile hasar öncesi durumda sakin/pasif halde bulunan hücrelerin tekrardan hücre döngüsüne girmesinin tetiklenmesi gerçekleşir.(23, 24)

#### **4.2.3. Aynılaştırma**

Aynılaştırma süreci ampüte edilen kısmın çıkıntısının epimorfik rejenerasyon sürecine kesin karar verilmesi ile başlar. Bu aşama ampüte kısmın çıkıntısının distal ucundaki dokuların olgun haldeki histolojik karakterlerini kaybettiği ve ileride blastema hücrelerini oluşturacak olan daha çok embriyonik karakterdeki hücreleri üretmeye başladığı andan itibaren başlar. Bu süreçte hücreler tersine yönde farklılaşarak kendilerine özgü özelliklerini kaybedip daha genel olan başka hücre tiplerine farklılaşmasına olanak sağlayan forma dönüşebilirler.(25) Aynılaştırma sürecinin başlangıcının en belirgin özelliği kemik dokusunun aşımının başlaması, kas hücrelerinin kasılı durumlarını kaybederek yavaş yavaş olgunlaşmamış fenotipe sahip hücre tiplerine dönüşmesi, yara epidermisinin kalınlaşarak apikal epidermal örtüyü oluşturmasıdır. Sinir lifleri de rejener olmaya başlayarak aynılaştırma sürecinin başladığı kısma doğru uzanırlar.(26) Sinir hücrelerinin bu süreçteki rolü epimorfik rejenerasyonun en önemli noktası olan blastema formunun oluşumu için gereklidir.(27)

#### **4.2.4. Blastema**

Rejenerasyonun gerçekleştiği yerde bulunan hücreleri sinir liflerinin uyarması ile yenilenme sürecine katılan olgun hücrelerin aynılaştırması veya bazı durumlarda geçiş yaparak farklılaşması sonucu oluşan hücreler, farklılaşma geçirmeyen parankimal hücreler, yaralanmanın gerçekleştiği yerde bulunan kök hücrelerden çoğalmış hücreler ve hasarlı bölgenin dışından gelip biriken kök hücreler oluşturur.(12, 28) Bu hücreler birikerek çıkıntı benzeri formda bir yapı oluştururlar. Bu yapıya blastema denir.(29) Blastema formu hem yapısal hem de karakteristik özellikleri sebebiyle embriyonik gelişim sürecindeki ekstremite öncülü çıkıntıları andırmaktadır. Embriyonik gelişim sürecinde mazenkimal hücrelerin birbirinden ayırt edilemez olduğu gibi blastema formu için de aynı durum geçerlidir.(30) Ancak günümüze kadar gelen süreçte yaşanan teknolojik gelişmeler reperatif rejenerasyonun gerçekleştiği dokulardaki blastema formunda bulunan hücreleri birbirilerinden tamamen olmasa da genel olarak ayırt edilebilecek hale getirmiştir.(13) Blastema formundaki embriyonik çıkıntı formuna göre en belirgin farklılık damarlaşma olmaksızın sürecin başlamasıdır. Olgunlaşma sürecinde ise damarlaşma ağı ve kılcallar sürece dahildir.(31)

Hasarlanma sonrası ani yanıt olarak hemen yara iyileşmesi süreci başlar. Yaralanan bölgenin çevresi keratinosit türevli epitel hücreleri ile hızlı bir şekilde kapatılır. (32) Hücrelerin hasarlı bölgeye göç etmesi de bu epitel hücrelerin perifer hücrelerden su alıp hacimce yayılıp baskı yapması ile gerçekleşir.(33) Hasar

sonrasının ilk günlerinde hasar bölgesi ve yara epidermisinin bulunduğu bölgede blastema formu başlangıcı ve blastemaya ait hücre çoğalmalarının ilk aşamaları gerçekleşir. Yara epiteli sinir hücrelerinden gelen sinyalizasyon ile apikal epidermal örtü formuna geçiş için uyarılır. Bu geçişin sonucu olarak da bazal keratinositler çoğalma süreçlerini sonlandırıp bağ doku fibroblastlarının erken blastema formunu oluşturmasına olanak sağlayan sinyalleri üretirler. Apikal epidermal örtünün bazal katmanında bulunan genellikle sütun biçimli morfolojiye sahip hücreler alt tabakada uzanan doku matriksine gerekli madde salgılanmasını yaparlar. Yaranın bulunduğu kısımdaki hücreler de gen ifadesindeki farklılıklar ve kimyasal moleküllerin salınımı gibi gerçekleştirdikleri değişikliklerle yara yatağına göç edip blastema formuna katılırlar.(34, 35)

Hasar kısmındaki hücrelerin yanıtı yara oluşuktan sonra hasarın büyüklüğüne bağlı olarak gerçekleşir. En güçlü yanıt amputasyon sonrasında gerçekleşmekte ve blastema formunu oluşturmaktadır, küçük yaralanmalarda ise blastema formu oluşturulmadan yara iyileşmesi süreçleri ile yenilenme tamamlanmaktadır.(13) Bu sebeple rejenerasyon basamaklarının blastema formu kullanılarak gerçekleşmesi için yara epidermisi ve sonrasında öncül çıkıntı içerisinde meydana gelecek moleküler ve hücrel hadiselerin sinir hücrelerinden ve inflamatuvar hücrelerden gelecek erken sinyaller elzemdir.

#### **4.2.5. Morfogenez**

Morfogenez rejenera olan blastemada gerçekleşen patern formasyonu aktivitesinin morfolojik olarak amacına ulaşmasıdır. Blastemanın hızlı bir şekilde dışarıya doğru büyümesi ve bazı blastema hücrelerinin yoğunlaşarak rejenera olan kısmın iskelet sistemi unsurlarını oluşturacak öncül kıkırdak modellerine dönüşmesi ile morfogenez aşaması başlar. Bu aşamada gerçekleşen olaylar embriyogenez süreci ile aynı olup süreç boyunca, hem doku hem de hücrel seviyelerde belirgin proksimodistal ve anteroposterior farklılaşma gradyanları belirgindir. Morfogenez periyodu sonunda rejenera olan kısım yapısal hasar gören veya amputa edilmiş kısımdan neredeyse farksızdır.

#### **4.2.6. Büyüme**

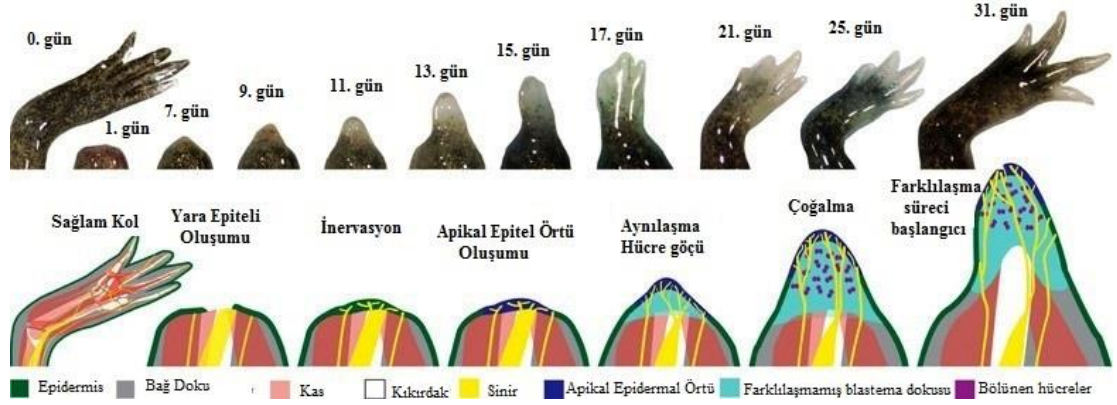
Aksolotl canlısının da dahil olduğu kuyruklu amfibiler omurgalılar arasında vücut üyelerinin birçoğunu yeniden yapabilen özel bir gruptur. Hasardan veya amputasyondan sonraki ekstremiteğin yenilenmesi, yara iyileşmesi, blastema formu oluşumu, hücre çoğalması ve yeni bir uzuv oluşturmak için yeniden geliştirme sürecinin gerçekleştirilmesini içermektedir.(36) Blastemanın oluşumu ve çoğalması, farklı hücre tipleri arasında karmaşık bir düzenlenme süreci içerir. Ekstremitenin amputasyonu sonrasında epidermal hücreler yarayı kapatmak için göç eder ve sonrasında da çok tabakalı bir apikal epitelial örtü formuna kadar kalınlaşır. Hücreler arası matriksin yapısı matriks metalloproteinazlar tarafından bozulur. Dermal ve kas

hücrelerini apikal epitelial örtü'ye doğru göç ederler. Daha sonra aynılaşma geçirip bu yapının altında blastema formu oluştururlar.(29) Fibroblastların migrasyonu için TGF $\beta$  sinyalizasyonunu gerektirir.(37) Bir akslotl ekstremitenin amputasyonu sonrası TGF $\beta$ 'nin düşük düzeydeki ifadesi amputasyondan 6 saat sonra tespit edilebilirken en yüksek düzeydeki ifadesi 48 saatte tespit edilir. Bu saatten sonra günlerce süren güçlü ifade artışı gözlenir. Belirli bir inhibitör kullanarak rejenerasyon olan ekstremitelerde TGF $\beta$  sinyalini bloke etmek ekstremitede gerçekleşecek olan rejenerasyonu engellemiştir. Amputasyondan hemen sonra inhibitör eklendiğinde, yara epidermisi oluşmuş, ancak biraz gecikmeli olarak gerçekleşmiştir. Yara iyileşmesinden sonra fibroblast hücrelerinin göç edişi gözlenmemiş ve blastema oluşmamıştır.(38)

Apikal epidermal örtü hücre çoğalmasını destekleyen önemli sinyal moleküllerinin üretilmesinden sorumludur. Wnt3a'nın apikal epitelial örtünün iç katmanındaki yüksek ifadesi yenilenen *Xenopus* kollarında tespit edilmiştir.(39) Wnt / $\beta$ -katenin yolağının bir inhibitörü Dickkopf-1 kullanılarak 52. aşamada kolu ampute edilen *Xenopus*'un Wnt/ $\beta$ -katenin sinyalizasyonu bloke edilmiş sonuç olarak ekstremitenin rejenerasyonunun engellediği, ancak normal ekstremit gelişimini engellemediği görülmüştür.(39, 40) *Xenopus*'un 53-54. aşamalarında Wnt/ $\beta$ -katenin yolağının aktivasyonu, rejeneratif potansiyelin büyük ölçüde azaltılmış olduğu durumlarda rejenerasyonun yeniden uyarılmasını sağlamıştır.(40) Wnt/ $\beta$ -katenin sinyalizasyonunun bloke edilmesi, yenilenen ekstremitelerde FGF-8 ifadesini azaltmaktadır.(41)

FGF'ler hem gelişim hem de rejenerasyon sırasında omurgalıların ekstremit büyümesini teşvik eden bir grup mitojendir. Birçok çalışma, FGF-8 ve FGF-10'un yenilenen ekstremitelerin apikal epidermal örtüsünde ve blastemasında yüksek oranda ifade edildiğini, ancak yenilenmeyen ekstremitelerde amputasyondan sonra olmadığını göstermiştir.(42, 43) Ayrıca, dışarıdan yenilenmeyen *Xenopus* ekstremit çıkıntılarına FGF-10 verilmesi tam kol bacak yenilenmesini başlatmak için yeterli olmaktadır.(41)

Hasar gören ya da ampute edilen ekstremitenin yenilenmesi elde edilen bilgiler doğrultusunda rejeneratif büyümeyi teşvik etmek için aynılaşma aşamalarını ve çok sayıda doku ve sinyalin birlikte çalışmasını içermektedir.



Şekil 4.2.6. Aksolotl modelinde kol rejenerasyonu günlere göre gelişim(12)

### 4.3. Aksolotl

*Ambystoma mexicanum* kuyruklu amfibiler sınıfına mensup canlılardır. Meksika'nın Xochimilco Gölü ve Chalco Gölü doğal yaşama alanlarıdır. Ancak günümüz şartlarında doğal yaşam alanının bozulması sebebiyle daha çok laboratuvarlarda ve evcil hayvan olarak yetiştirilmekte, büyütülmektedir. En yaygın kolonisi ise Kentucky Üniversitesi bünyesinde bulunan AGSC'dir. Aksolotl canlılarını endemik olmalarının yanında özel kılan en önemli özellikleri kendilerine öldürücü olacak şekilde zarar vermeyen herhangi bir yaralanma veya hasarı kusursuzca yeniden kaybedilen kısmın aynısı gibi fonksiyon kaybetmeyecek şekilde yapabilmeleridir. Bu özelliği yaşam döngülerinin herhangi bir sürecinde yapabilmeye kabiliyetine sahiptirler. Ancak rejenerasyon süreci larva formunda iken daha hızlı olmakla beraber metamorfik formunda ise sınırlıdır.(44, 45)

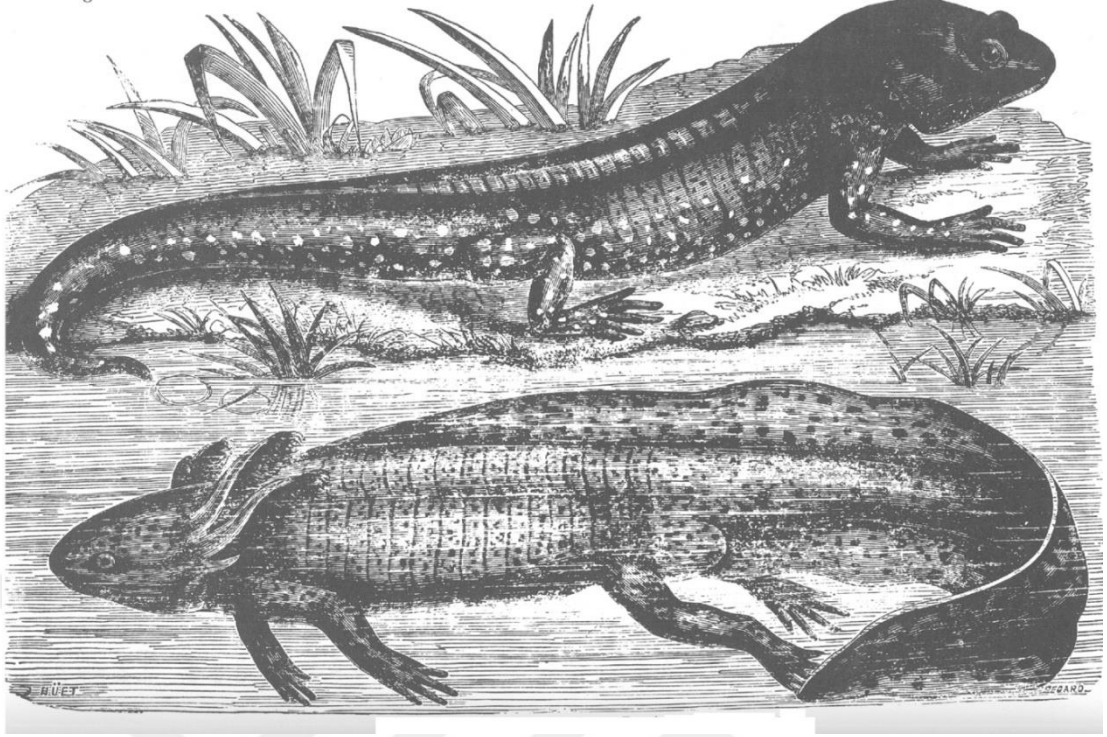
#### 4.3.1. Aksolotl tarihçesi

Aksolotl, gelişimsel sürecini tam olarak tamamlamamasına rağmen üreme yeteneğine sahip, neotenik, amfibi sınıfında yer alan bir semender türüdür. Doğal yaşama ortamı Meksiko City dolaylarında bulunan Xochimilco Gölü ve Chalco Gölü'dür. Bilim camiasına bu canlılar ilk olarak Avrupalı'lar tarafından tanıtılmıştır. İspanyol'lar yaklaşık 500 yıl önce Meksiko City'e vardıkları zaman Aztek'lerin bu semender türünü yemeye düşün olduklarını gözlemlemişlerdir. Meksika tarihinde ilk defa Aksolotl terimi o zaman tanımlanmıştır.(46) Aksolotl teriminin kökeni bir Aztek tanrısı olan xolotl'dan gelir. Sonraları çeşitli Aztek dilbilimciler tarafından bu terim "su kölesi" veya "su köpeği" şeklinde tercüme edilmiştir.(47)



Aksolotl'un bilim dünyasına ilk olarak girişi 19.yy'ın başlarında Amerika gezilerinden dönen biyocoğrafya dalı'nın kurucularından Alexander von Humboldt beraberinde getirdiği iki tane aksolotl'u Paris'te bulunan karşılaştırmalı anatomi ve bilimsel paleontolojinin kurucusu Georges Cuvier'e vermiştir. Cuvier aksolotl üzerinde yaptığı anatomik incelemelerle sınıflandırmaya çalışmıştır. Gzlemediği kıkırdağımsı iskelet varlığı ve az gelişmiş üreme organları sebebiyle canlının henüz tam olarak bilinmeyen bir sürüngen türünün larva hali olduğunu belirtmiştir.(48) Bu olaydan yaklaşık 50 yıl sonra Fransızlar'ın Meksika kaynaklarını ve kültürünü keşfetme amaçlı yaptıkları temaslarda ilk modern zoolojik bahçe olarak da bilinen Paris Jardin des Plantes'e yabani hayvanların bulunduğu bölümde sergilenmek üzere Meksika'dan 34 tane aksolotl getirilmiştir. Canlılardan 5 tanesi dişi 1 tanesi erkek olmak üzere 6 tanesi Paris Museum de Histoire Naturelle'de ihtiyoloji ve herpetoloji profesörü Auguste Dumeril'e verilmiştir. Dumeril'e verilen 5 dişi aksolotl'dan biri olan beyaz mutant aksolotl aynı zamanda günümüzde kullanılan beyaz mutantların da atasıdır.

Dumeril bu canlılarla yaptığı ilk gözlemlere dayanarak Cuvier'in çalışmasını doğrulamıştır.(49, 50) Ancak yaklaşık altı ay sonra yaptığı bildiri de bu görüşün tam zıttını savunmuştur. Bu süreç içerisinde canlıları iftleştirmiş ve gerçekleşen başarılı üreme durumunun sonucu olarak desteklediği görüşe karşı çıkmıştır. Çünkü başarılı bir Şekilde reme yapabilen canlının larva değil yetişkin bir canlı olması gerekmektedir.(50, 51) Sergilenen aksolotlar ile beraber Dumeril'in canlılarının da hızlı bir Şekilde üremesi sonucu bir yıl içerisinde canlı sayısı sekiz yzly rakamlara ulaşmıştır. Canlıların reme oranının yüksek bir Şekilde devam etmesi çevredeki ilgili kurumlarca yaygın olarak çalışabilmenin önünü açmıştır.(50, 52) Dumeril aynı yıl içerisinde yayınladığı raporunda da üretilen bazı canlıların solungalarını kaybedip gözle görülür bir Şekilde anatomik değişiklikler geçirerek karasal hayvanlara dönüştüğünü belirtmiştir. Bu gözlem sonucunda da aksolotları büyük benzerlik gösterdiği kuyruklu kurbağalar cinsinden olan Ambystoma formu olarak adlandırmıştır.(50, 53) Aksolotl'un transforme olup başkalaşım geçirmesinin nedeni bu yıllarda canlıya ilgi duyanların merak ettikleri ilk konulardan birisi haline gelmiştir. Canlı gl benzeri akvaryumlar içerisinde başkalaşıma indüklenmeye çalışılmış ve başarılı olunmuştur. Ancak etkenin evresel Őartlar mı yoksa fizyolojik Őartlar mı olduğu belirlenememiştir.(54)



Resim 4.3.Dumeril-başkalaşım geçirmiş aksolotl ve neotenik aksolotl (52)

Vilem Laufberger ve öğrencileri tiroid bezinin çeşitli çift yaşamlı canlı türlerinin başkalaşımı üzerindeki etkisini incelemek istemişlerdir. Buldukları enstitü yaklaşık 10 yıldır aksolotl da ürettiği için bu canlıyı da kullanmışlar ve başkalaşımı hızlandıran etken faktörün tiroid bezi olduğunu açıkça göstermişlerdir.(50, 55) 20. yy'nın başlarında Dumeril'in sadece 6 tane canlıdan üretip çoğalttığı aksolotl Avrupa aksolotl popülasyonunu oluşturmuş ve dünyaya yayılmıştır. İlk araştırmaların ve değerlendirmelerin yapıldığı bu canlıların fenotipik özellikleri günümüz stok canlıları da göz önünde bulundurularak değerlendirme yapıldığında muhtemelen Xochimilco Gölü kökenli oldukları düşünülmektedir.(47, 56)

Uluslararası düzeyde en büyük aksolotl kolonisine sahip olan İndiana Üniversitesi Aksolotl Kolonisi'nin kurucusu olan Rufus R. Humphrey 1930'lu yıllarda Buffalo Üniversitesi Anatomi Bölümü'nde kendi çalışmaları için aksolotl kullanmaya başlamış ve emekliliğine kadar çalışmalarını burada sürdürmüştür. Emekliliği sonrası İndiana Üniversitesinde çalışmalarına onursal profesör olarak devam ederken kendi çalışmaları için burada küçük bir yetiştirme kolonisi oluşturmuştur. İndiana Üniversitesi'nde kurulan yetiştirme kolonisindeki canlıların nesli günümüze kadar gelmiştir. Bu canlılar farklı doğal yaşama alanları olan Xochimilco gölü'nden ve diğer yerlerden alınan cinsler ile birlikte büyütülüp dünyanın en büyük aksolotl tesisi haline gelmiştir.

IUAC aksolotların çeşitli pigment varyantlarını da içermektedir. Kurum yılın her döneminde yetişkin aksolotl üretmekte ve haftalık yumurta, embriyo ve larva üretimi ile dünya çapında bulunan araştırmacıların ihtiyacını temin etmektedir.(57)

Günümüzde aksolotl laboratuvar hayvanı olarak öncelikle gelişim biyolojisi ve rejenerasyon çalışmalarında kullanılmaktadır. Gelişim biyolojisi çalışmalarında aksolotl canlısının embriyosunun şeffaf olup gelişimsel basamaklarının rahatlıkla izlenebilir olması ve genetik müdahalelerin yapımına da olanak vermesi bu alandaki çalışmalar için uygundur. Canlının başkalaşım sürecinde meydana gelen organ düzeyindeki büyük değişiklikler de kendini model olarak bu alan için özel kılar. Rejenerasyon çalışmalarında ise sahip olduğu eşsiz yenilenme kapasitesi, omurgalı bir canlı olup memelilere daha yakın olması sebebiyle sıklıkla kullanılmaktadır.

#### **4.3.2. Bir deneysel model olarak aksolotl**

Aksolotlar kendilerini öldürmeyen neredeyse her hasarı iyileştirip tekrardan yenileyebilmektedirler. Bu canlılarda rejenerasyon kalpte, kuyrukta, omurilikte, yüzeysel solungaçlarda, beyinde ve ekstremitelerde görülmektedir. Rejenerasyon aksolotların yaşam döngülerinin herhangi bir aşamasında gerçekleşebilir. Ancak bu süreç larva halinde daha hızlı ve mükemmel olmakla beraber başkalaşım geçirmiş olan aksolotlarda ise daha az güvenilir düzeyde ve yavaştır.(28)

Diğer kuyruklu amfibilerin dışında aksolotlar zorunlu pedomorfiklerdir. Çevrelerinde tiroid hormonu ile herhangi bir uyarım olmadığı sürece başkalaşım geçirmezler. Yetişkin canlılarda embriyonik karaktere ait özeller görülür.(58) Erkek aksolotlar olgunluk dönemine yaklaşık 10 ayda girerken dişi aksolotlar bu sürece 12 ay ile 18 ay arası bir zaman zarfında ulaşmaktadırlar. Doğal ortamında yaşamını devam ettiren aksolotların ömrü tam olarak bilinmemesine rağmen laboratuvarında yetiştirilen aksolotların ömrü 10 yıl ile 15 yıl arasında değişiklik göstermektedir.(59)

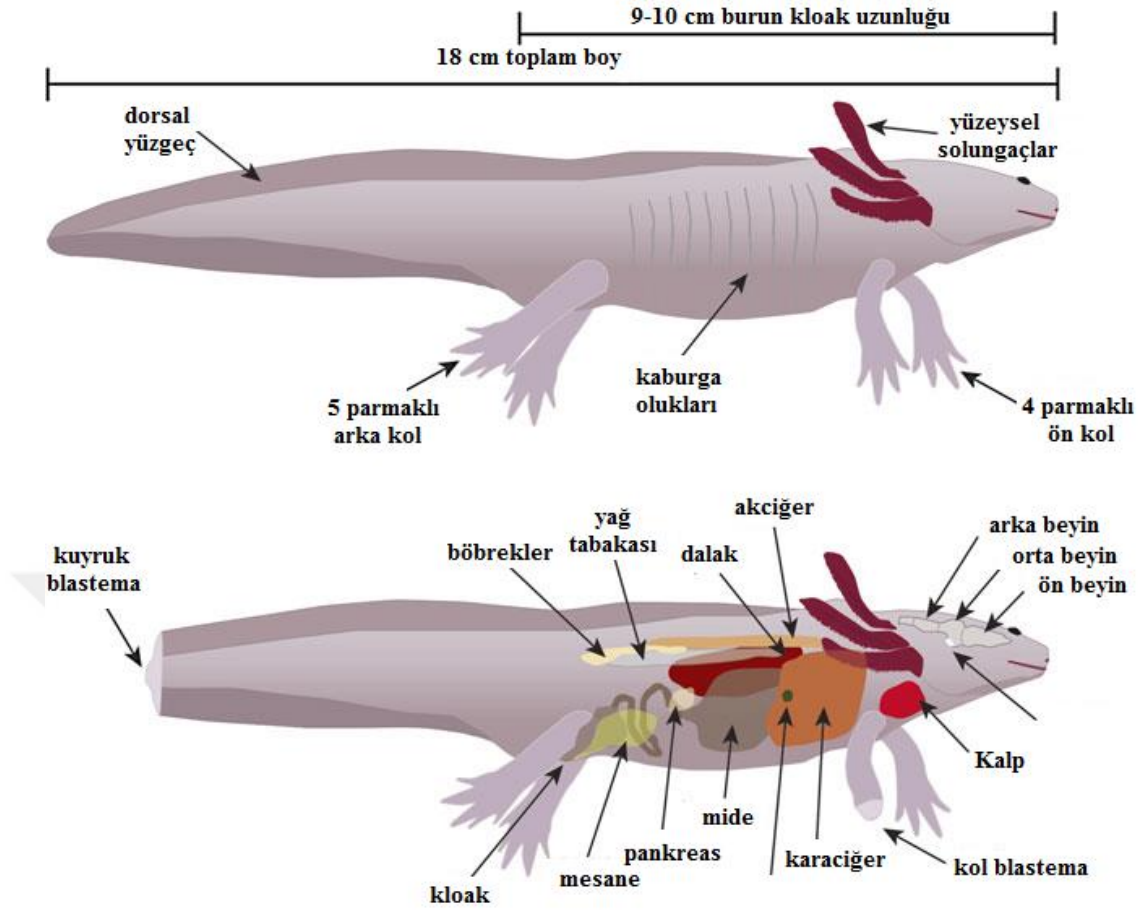
Aksolotl canlıları iç döllenme yaparak ürerler. Erkek aksolotlar kur yapma sürecinin ardından spermatoforlarını buldukları ortama dizerek bırakırlar. Dişi aksolotl spermatoforları sperm kesesine alıp burada spermleri birbirinden ayırır. Yumurtalama sürecinin gerçekleşeceği ana kadar spermatozoa kloakta depolanır. Yumurtalar yumurta kanalını terk ederek kloakal odaya girerler. Burada spermatozoanın yumurtalar ile temasa geçer ve birden fazla sperm yumurta sitoplazmasına girer.(60) Yumurtalar genellikle sıra halinde dizilir ve jelimsi yapışkan bir yapıya sahip olan kalın bir kaplama yapı ile korunur. Embriyonik müdahaleler veya nakiller için bu yapının kırılması gerekmektedir. Yumurtlamadaki yumurta sayısı bireyler arasında büyüklük, yaş vb. gibi durumlardan ötürü farklılık göstermektedir. Bir yumurtlama için elde edilen yumurta sayısı 200 ile 1000 yumurta arasında değişiklik göstermektedir. Yapılan gözlemler sonucu aksolotların çiftleşme durumlarının mevsimsel olduğu düşünülmüştür. Bu verilere göre en yüksek verimin sonbahar aylarında, en düşük verimin ise yaz aylarında olduğu tespit edilmiştir.(61)

Aksolotların koklama duyuları kuyruklu amfibiler gibidir. Benzer kimyasalları ve kokulu maddeleri birbirinden ayırt edebilen oldukça karmaşık bir yapıya sahiptirler. Koku epiteli ve koku soğancığının büyük olması bu durumu anlaşılır kılmaktadır.(59)

Aksolotların kalbi 3 odacıklı olup 2 atrium ve 1 ventrikülden oluşmaktadır. Kan ventrikülden ayrılıp akciğer atardamarlarına ya da vücudun diğer kısmına gönderilmek üzere aorta gider. Oksijen bakımından zengin olan kan, yüzeysel solungaçlardan ve akciğerlerden çıkıp kalbin ventrikülüne geri gönderilir. Kan burada vücutta dolaşımını yapmış oksijen bakımından az olan kan ile karışır. Bu sistem memelilerde ve kuşlarda bulunan 4 odacıklı sisteme göre daha az etkilidir. Canlının dokuları oksijence daha az beslenmektedir. Kuyruklu amfibi türlerinde aort yayı birbirilerine göre çeşitlilik göstermesine rağmen aksolotl 4 tane aort yayı içermektedir.(62) Bütün amfibilerde olduğu gibi aksolotlarda da vücut sıcaklığı değişiklik göstermekte, bu değişiklik sebebiyle kalp atım ritmi ve hızı da değişmektedir.

Aksolotlarda kan hücrelerinin üretimi karaciğer ve dalak tarafından sağlanmakta memelilerdeki gibi kemikiliği ön plana çıkmamaktadır. Aksolotların eritrositleri büyük, nükleuslu ve oldukça otofloresan özelliğe sahiptir. Hasarlanmaya bağlı olarak kan damarlarının hızlı bir şekilde daralması ile aşırı derecede kan kaybı önlenip hemen akabinde de pıhtılaşma gerçekleşmektedir. Bu durum başlıca önemli atar damarlarda meydana gelse bile süreç aynı şekilde gerçekleşmektedir.(63) Eşsiz bir özellik olan hızlı pıhtılaşma ve kan kaybının durdurulması sayesinde cerrahi müdahaleler sonucu canlının kaybı en aza inmektedir. Aksolotlar çevrelerindeki oksijeni yüzeysel solungaçlarda ve derileri boyunca gerçekleşen gaz değişimi ile alırlar. Aynı zamanda sahip oldukları akciğerleri ile de su yüzeyinden solunum yaparak yaklaşık %40-60 oranında oksijen alabilmektedirler.(64)

Aksolotların kazanılmış bağışıklık sistemi oldukça ilkindir. Suda eriyen antijenlere karşı humoral yanıt oluşturmazlar. Bu sebeple de immunolojik açıdan yetersiz kabul edilirler.(65) Sadece 2 çeşit immunoglobulin üretebilirler ve antijenlere karşı antikor üretimi oldukça yavaştır.(66) Bu durumdan ötürü aksolotlar diğer semender türlerinden ve amfibi türlerinden transplante edilen organ veya dokuları reddetmeme özelliğine sahiptir.(67) Günümüzde transgenik olarak üretimi yapılabilen beyaz mutant GFP aksolotların bulunması yapılan doku veya organ nakli sonrası rejenerasyon esnasında GFP dokuların hücrel plastisite ve pozisyonel hafızayı nasıl etkilediğini ortaya çıkarmak için kullanılmaktadır.(68)



Şekil 4.3.2.Aksolotl canlı görünümü ve organların organizasyonu(59)

Kazanılmış bağışıklık sistemindeki zayıflığa rağmen aksolotlar bakteriyel enfeksiyonlara karşı son derece dayanıklıdır. Bu durumun sebebinin muhtemelen mukoza tabakası ve kuyruklu amfibilerin bütün hayatları boyunca bağışıklık sistemini oluşturan doğuştan gelen bağışıklık sistemidir. Memeli canlılara oranla sayıca daha fazla bulunan nötrofiller ve makrofajlar dışarıdan gelen istilacıları hızlıca yutar ve yok ederler. Antimikrobiyal peptidler ise savunma sistemine ekstra katkı yaparlar.(69) İki haftalık aksolotlar bakteriyel enfeksiyonlara karşı dayanıklı hale gelir. Bu sebeple de cerrahi operasyonlar ve doğal yaralanmalarda risk altında olmaktan çıkarlar. Buna rağmen fungal ve viral enfeksiyonlara karşı duyarlıdır. Ayrıca kronik stres sonrasında da bakteriyel enfeksiyon da geçirebilirler. Viral enfeksiyonlara yatkınlığın temelini limfositlerin virüse maruz kalındığı andan itibaren çoğalmamasıdır.(70) Bağışıklık sistemi ile alakalı diğer bir husus da makrofajların rejenerasyon için olmazsa olmaz elemanlardan birisi olmasıdır. Makrofajların sayısının ampütasyon veya hasar sonrası ilk aşamalarda yetersiz olması aşırı derecede kollojen birikimine yol açmakta ve blastema formunun oluşmasına engel olmaktadır.(71) Ayrıca her ne kadar farklı doku tiplerinde aşırı derecede hücresel çoğalmaya yapsalar da aksolotlar kansere karşı oldukça dayanıklıdır.(72) Bazı istisnai durumlarda tümör oluşumuna rastlanılsa da bu kadar fazla hücresel bölünme görülen bu canlıda malignan bir büyümenin olmamasının nedeni hala bilinmemekte ve aydınlatılmayı beklemektedir.(73)

Yetişkin aksolotlun epidermisi diğer larval amfibilere benzemektedir ancak başkalaşım geçirenler amfibiler veya memelilerde olduğu gibi katmanları halinde belirginlik yoktur. Epidermal leydig hücreleri mukus salgılayarak benzerine az rastlanan damarlanmış yapının yeterli derecede gaz değişimine olanak sağlar ve mikrobiyal tehditlere karşı dayanıklılığı artırır. Salgılanan mukus tabakası aşırı derecede yapışkan bir kıvamdadır.(74) Epidermal yara iyileşmesi ve rejenerasyon tamamen yara izi kalmayacak şekilde hücreler arasında lifli bağ doku birikmesi olmadan gerçekleşmektedir.(75)

Aksolotl beyni çok basit bir yapıya sahiptir ve memeli beyinlerinin embriyonik süreci ile benzerlik göstermektedir. Düz, yassı ve uzun bir yapıya sahiptir. Ön beyin, orta beyin ve arka beyin rahatlıkla birbirinden ayırt edilebilecek şekildedir. Koku soğancığı büyük olmasına rağmen optik loblar küçük ve ayırt edilmesi zordur. Beyincik oldukça küçük olup az gelişim göstermiştir.(59) Başkalaşım geçiren aksolotların beyni hakkında çok fazla bilgi edinilememesine rağmen beynin de canlı ile beraber bir takım yapısal değişiklikler geçireceği konusu tartışılmazdır. En belirgin örnek olarak optik lobun büyüerek canlının yeni binoküler görüşü için geçirdiği uyum sağlama süreci örnek verilebilir.(76) Bu durum aksolotl beyninin plastisiteye sahip olduğunu ve yaşam döngüsü sürecince en zor değişimleri bile geçirebileceğini gösterir ve sinirsel plastisite araştırmaları için son derece uygunluk ifade etmektedir.

Aksolotl canlılarında ekstremite yenilenmesi kompleks doku yenilenmesi çalışmaları için en uygun örneklerden birisi olup halen de üzerine çalışmalar devam etmektedir. Canlılar ekstremitelerini içerisinde çoğalma potansiyeli yüksek derecede olan hücrelerin bulunduğu blastema formu ile yenilmektedir. Ampütasyon sonrasında öncül hücreler ve aynışma geçirmiş hücreler gelişimsel süreçte olduğu gibi kaybı yaşanan kolu tekrardan üretirler.(77) Olgunlaşma aşamasında olan aksolotlar ampüte edilen kolunu 32 gün içerisinde rejenere edebilmekte, 100 gün sonrasında ise kaybın yaşandığı andaki durumuna getirebilmektedir. 3 aylık olgunlaşmamış aksolotlar ise 22 günde kolu oluşturmakta 66 günde de tamamen yenilmektedir.(12, 45)

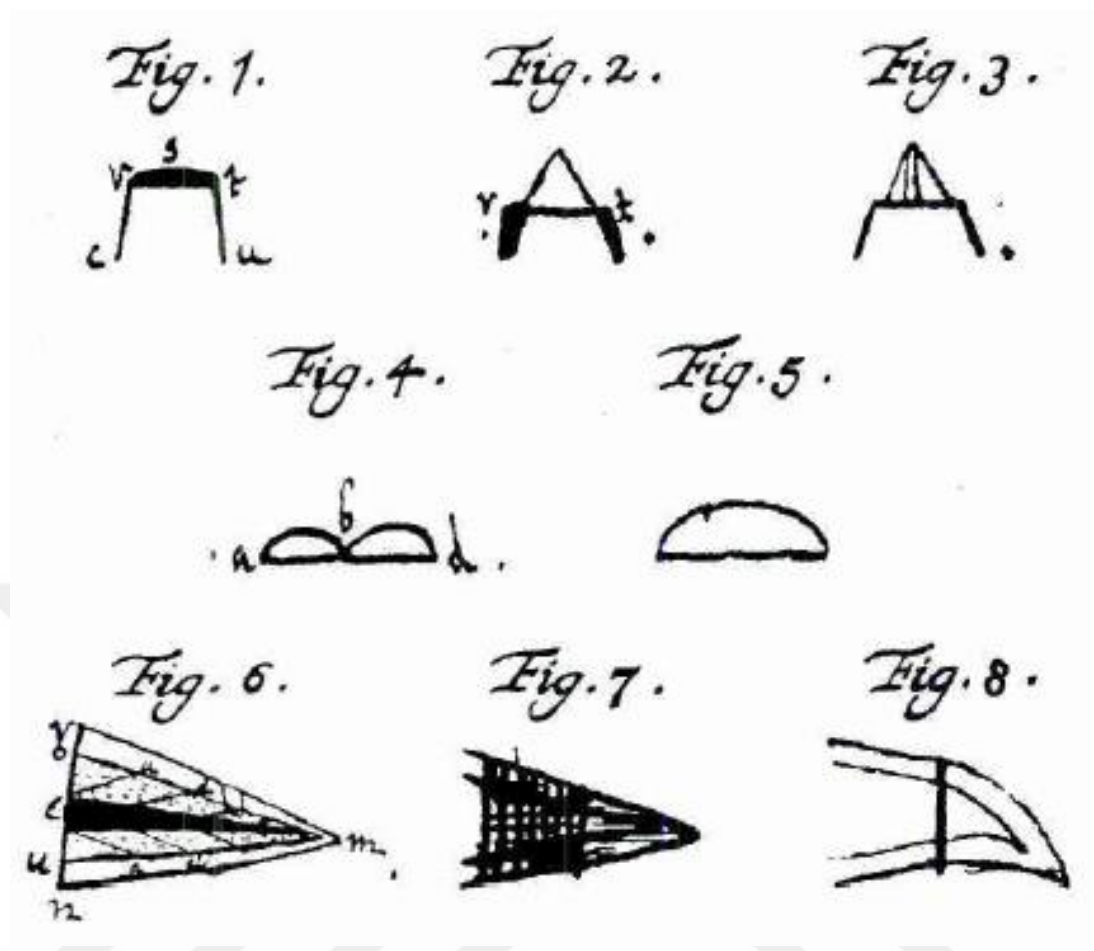
#### **4.3.3. Aksolotl sinir sistemi yenilenmesi**

Aksolotl periferik sinir sistemi oldukça basit bir şekilde organize olmuştur ve sinirlere bağlı rejenerasyon fenomeni sebebiyle araştırmacılar için özel ilgi görmektedir. Periferik sinirler miyelinlidir. Bu sinirlerin bulunması ve hasar verilmesi kolaydır. Eğer ampüte edilen ekstremite ilk 7 gün içerisinde denerve edilirse blastema formu oluşmamakta ve yenilenme meydana gelmemektedir. Bu olayın perde arkasında yenilenme süreci için önemli ve destekleyici olup sinirsel olarak salgılanması gereken mitojenik faktörlerin olduğu düşünülmektedir.(59)

Merkezi sinir sistemi hasarına maruz kalan aksolotlar memeli canlılardaki durumun aksine yaralanmalardan kurtulabilmektedirler. Beynin büyük bir kısmı alınan aksolotl hasar sonrası o kısmı tekrardan aynı şekilde kol örneğinde olduğu gibi yenileyebilmektedir.(78) Yapılan çalışmalarda yetişkin aksolotl beyinlerindeki ventriküler bölge boyunca sinir hücrelerinin çoğaldığı gösterilmiştir.(79) Aksolotlar aynı zamanda omurilik zedelenmelerini tamamen eski haline gelecek şekilde yenileyebilmektedirler. Omurilik içeren kuyruk kısmının ampüte edilmesi sonucu gerçekleşen rejenerasyon ile fonksiyonelliğini tekrardan kazanacak şekilde omurilik ve kuyruk yeniden yapılmaktadır. Bu süreçlerde memelilerde MSS hasarı sonucu aksonal büyümeyi önlediği tespit edilen glial yara izine rastlanmamaktadır.(80)

#### **4.4. Kuyruk - Omurilik yenilenmesi**

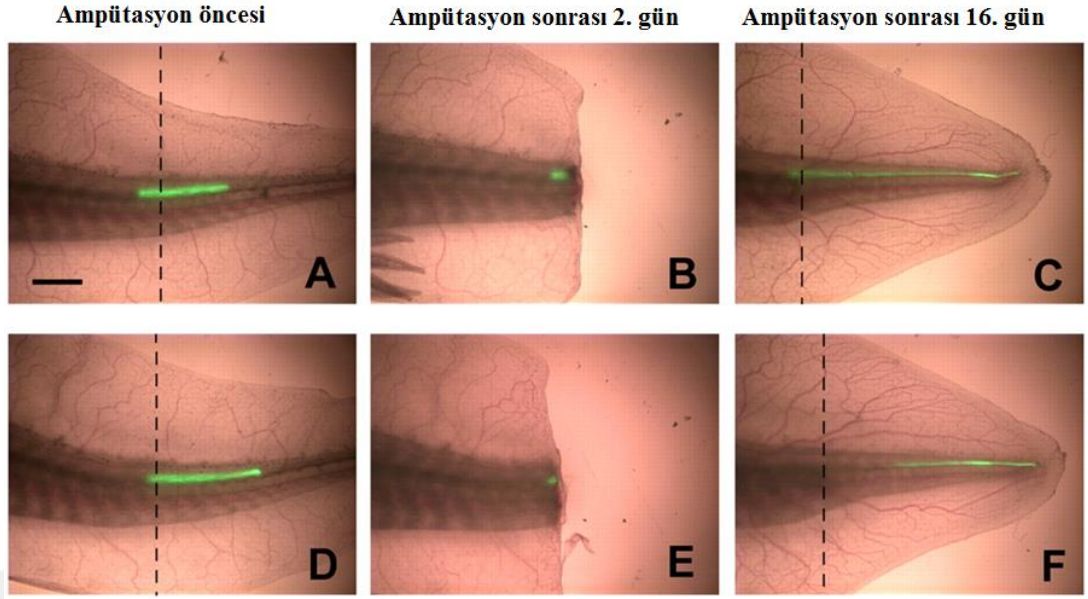
18.yy'ın üçüncü çeyreğinde İtalyan bir biyolog olan Lazzaro Spallanzani rejenerasyon yapan canlıları anlattığı kitabında semenderlerde görülen kuyruk yenilenmesi ile ilgili ilk bilimsel raporu da yazmıştır. Spallanzani bu raporunda semenderlerde gözlemlendiği kuyruk yenilenmesini yaptığı çizimlerle göstermiştir.(81) Kitabında rejenerasyon yapabilen canlılar arasında bahsettiği suçul semenderin tam olarak bilinmese de aksolotl olabilme ihtimali yüksektir.



Şekil 4.4.Spallanzani'nin çizimi ile semender(1-5) ve iribaş(6-8) kuyruk yenilenmesi(81)

Semenderler kuyruklarının hasar görmesi ya da amputé edilmesi sonucu kuyruklarını omurilik kısımları dahil tamamen yenileyerek önceki hareket kabiliyetlerini ve fonksiyonunu tekrardan kazanırlar. Hasar ya da amputasyon sonrasındaki birkaç saat içerisinde oluşan hasara bağlı yanıtlar hücre sağ kalımını artırır. Hasarlı doku çevresi onarım ve sonrasında gerçekleşecek rejenerasyon sürecine ortam hazırlayacak hale gelir.(82) Semenderlerin bulunduğu sınıf içerisinde yüksek düzeyde görülen rejenerasyon yeteneğine sahip olup diğer canlıların sahip olamamasının nedeninin hasar sonrası çok kısa süre içerisinde verilen erken yanıt evresine bağlı olduğu düşünülmektedir. Ancak bu süreçte ana rolü onayan genler ve ilişkili biyolojik süreçler hakkında çok fazla bilgi yoktur. Yapılan araştırmaların birçoğu rejenerasyonun aynılaşıma süreci ve gözle görülebilen yeniden modelleme sürecindeki hücrel ve gelişimsel değişiklikleri anlamaya yöneliktir.(83)





Resim 4.4.Ampütasyon sonrası kuyruk ve omurilik yenilenmesi(84)

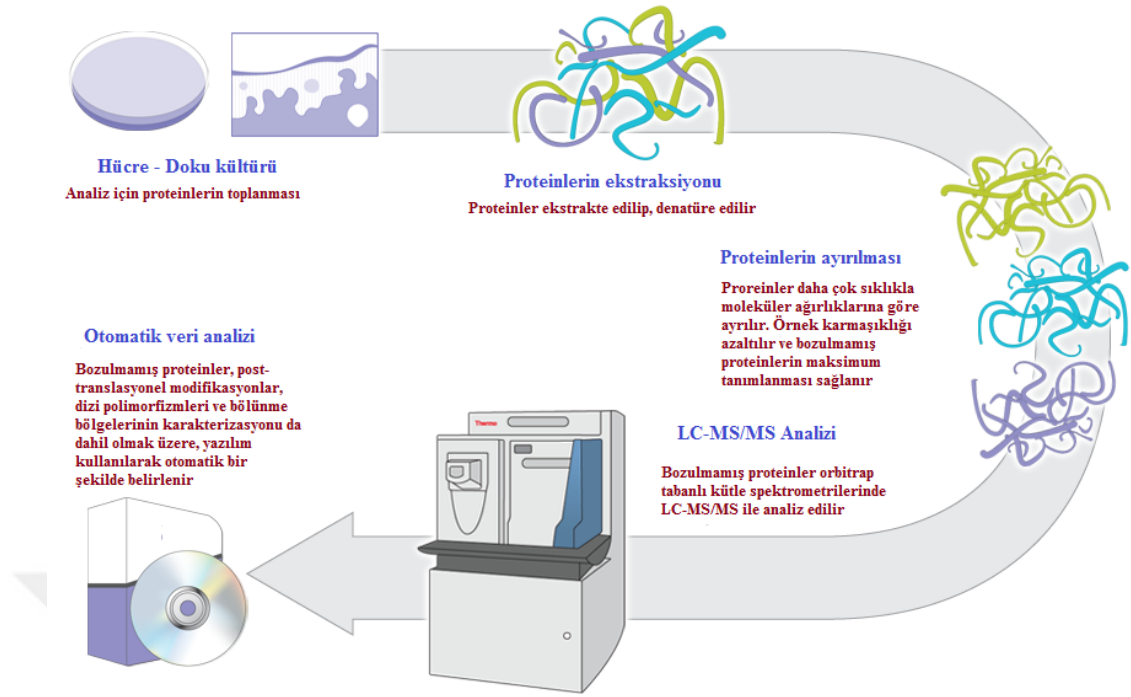
Kuyruklu amfibilerde gerçekleşen kuyruk rejenerasyonunun en önemli özelliği motor, duyu ve ara nöronlar olmak üzere bütün sinir hücresi tiplerinin dahil olarak eski fonksiyonuna sahip merkezi sinir sisteminin yeniden oluşturulmasıdır.(84) Bu mekanizmanın altında yatan en temel soru ise hasar sonrası geride kalan omurilik hücrelerinin omurilik rejenerasyonu sürecini nasıl başlattığı ve bütün sinir hücresi çeşitlerinin nasıl oluşturduğudur. Histolojik yöntemlerle yapılan analizlerde bu canlıların yaşamları boyunca radyal glial özelliğe sahip hücrelerin tutulduğu gösterilmiştir. Omuriliğin ampüte edilmesi veya lezyonu sonucu terminal radyal glial hücreler kuyruk ucuna doğru polarize olmakta ve epitel-mazenkimal geçiş ile lezyonun olduğu bölgeye göç etmektedirler.(85) Radyal glial hücreler daha sonra tek katlı nöroepitel hücrelerinin oluşturduğu ependimal tüp formunu alır. Ependimal tüp kuyruk rejenerasyonu süresince posterior yönde uzamaya devam eder. Belli bir büyüme periyodundan sonra ependimal tüp etrafında gerçekleşen büyüme rostro-kaudal yönde de devam eder. Kuyruğun en uç kısmı rejenerasyonun en son aşamasına kadar farklılaşmadan devam eder. Rejenerasyon tamamlandıncaya bu kısım da farklılaşır.(86)

#### 4.5. Proteomiks

Omiks araştırmaları organizmaların biyolojik moleküllerinin yapı, fonksiyon ve birbirileri ile etkileşimlerine göre karakterize edilmesi ve miktar tayininine bağlı analizlerinin yapılabilmesini amaçlar. Bu yeni nesil teknoloji sayesinde olayların bütün bir şema halinde inceleyebilmek mümkün hale gelmiştir. Genomiks, metabolomiks ve proteomiks bu alanın en öne çıkan çalışma dallarındandır. Genomiks organizmanın bütün genomunda meydana gelen olayları inceler. Genlerin ve proteinlerin fonksiyonları ile onların ilişkilerini inceleyen fonksiyonel genomiks,(87) farklı türler arasında meydana gelen genler arası yapısal ve fonksiyonel ilişkileri inceleyen komperatif genomiks,(88) çevresel materyallerden elde edilen genetik materyallerin çalışıldığı metagenomiks(89) bir hücrenin bütün genetik materyalinde meydana gelen epigenetik modifikasyonların incelendiği epigenomiks(90) ve sadece bir kişinin genom diziliminin ve analizinin yapıldığı kişisel genomiks(91) öne çıkan genomiks dallarındandır. Metabolomiks hücre içerisinde küçük moleküller aracılığı ile gerçekleşen olayların sahip olduğu profillerin çalışıldığı daldır. Metabolom bir hücrenin, bir dokunun veya organizmanın gerçekleştirdiği biyolojik süreçlerin sonunda oluşan bütün molekülleri temsil eder.(92)

Proteomiks hücrenel olaylarda ifade edilen bütün proteinlerin büyük ölçekli olarak çalışıldığı omiks dalıdır. Bu alanda hücrenel olaylar esnasında kompleks sistemlerde bulunan farklı proteinlerin birbirileri ile olan etkileşimleri incelenmektedir. Proteomiks yöntemi proteinlerin varlığını ve var olan kantitatif miktarını doğrular.(93) Daha önceleri mRNA seviyesi üzerinden proteom çalışmaları yapılmış olmasına rağmen günümüzde her mRNA'nın protein karşılığının olmadığının ispatı sonucu bu analizler sadece proteinler üzerinden yapılmaktadır.(94) Ancak bu süreçte de proteinde meydana gelen post-translasyonel modifikasyonlar çeşitli farklılıklara neden olabilmektedir.(95)

Proteomiks verilerinin tam olarak herhangi bir proteinin varlık seviyesini gösterebilme gücü hastalıklar üzerinde sağlıklı ve hasta bireylerin karşılaştırılması sonucu elde edilen farklılıkların tedavi yöntemlerinde kullanılmasına olanak sağlamıştır. Bu sayede birçok hastalık için erken teşhis konulmasına olanak sağlayacak belirteçler geliştirilmekte ve canlılığın hizmetine sunulmaktadır.(96)



Şekil 4.5. Proteomiks veri analizi akış şeması

Proteomiks analizinde kullanılacak proteinlerin yapısal olarak bozulmaya uğramamış olması gerekmektedir. Bu sebeple analizi yapılacak olan hücre veya doku örneklerinden protein izolasyonu yapılarak, proteinler denatüre edilir. Denatürasyon sonrası birincil yapılarına geri dönen proteinler moleküler ağırlıklarına ve iyon değerlerine göre ayrıştırılır. Olanlardan ayrılır. Bozulmaya uğramamış proteinler kütle spektrometrisi aracılığı ile analiz edilir. Süreç sonunda elde edilen otomatik veriler istatistiksel analizlere tabi tutularak proteinlerin o an için anlamlılık düzeyleri değerlendirilir. Anlamlı değişikliğe sahip proteinler daha önce tanımlanmamışsa tanımlanırlar. Eğer tanımlanmış bir protein ise protein sınıflandırma analizlerine tabi tutularak diğer proteinler ile ilişkisi araştırılır.(97, 98)

Protein sınıflandırma sistemi genel anlamda proteinlerin hücresel olaylarda sahip olduğu rolleri belirlemeyi amaçlar. Bu sebeple de proteinlerin yapısına, sekansına ve fonksiyonuna bağlı sınıflandırma yaparak proteinlerin çeşitli şekillerde organize olmasına olanak sağlar.(99) En çok kullanılan protein sınıflandırma sistemi moleküler fonksiyon, hücresel bileşen ve biyolojik süreç olarak 3 farklı ontolojiye ayıran gen ontoloji analizidir. Gen ontoloji analizi bir proteini diğer proteinle veya daha fazlası ile ilişkilendirirken onun potansiyel olan fonksiyonları, lokasyonları ve süreçleri ile ilişkilendirerek yansıtır.(100)

## **5.MATERYAL VE METOT**

### **5.1. Aksolotlar**

Bu çalışmada kullanılan aksolotlar Kentucky Üniversitesi bünyesinde bulunan Ambystoma Genetic Stock Center(AGSC)'den alınıp İstanbul Medipol Üniversitesi Tıbbi Araştırmalar Merkezi olanaklarında büyütülen canlılardır. Deneyde kullanılacak 64 canlı için gerekli etik kurul izni alınmış olup bu tez için yapılan çalışma etik kurul içerisinde yer alan proteomik analiz kısmını kapsamaktadır. Canlıların bakımı 18°C ile 20°C arası sıcaklıkta her iki günde bir pellet yem(JBL novotl) verilerek canlılar için en uygun sıvı ortam koşullarını sağlayan Holtfreter solüsyonunu içeren bireysel akvaryumlarında yapılmıştır.

### **5.2. Örneklerin alınması:**

Deney için kullanılacak aksolotlara %0.1 Benzocaine içerisinde anestezi yapıldı. Anesteziye giren canlılardan 0. gün 1. gün 4. gün ve 7. günde blastema örneği alınmak üzere aksolotların kloak kısmına yakın kısımdan toplam boy ile yaklaşık 1/5 oranında olacak şekilde bisturi yardımıyla kuyrukları kesildi. İlk kesim günü 0. gün örnekleri kesim işlemi yapılan yerden proksimal kısma doğru bisturi yardımıyla yaklaşık 500 mikron kalınlığında kesilerek alındı. Diğer günlerin örnekleri de blastema formunun bulunduğu kısımdan aynı şekilde bisturi yardımıyla alındı. Her grup için de geçerli olacak şekilde alınan örnekler -196°C'deki sıvı azot içerisine alınıp donduruldu. Proteom ve transkriptom analizi için örnekler alındıktan sonra her gün için de immünojenik boyamalarda kullanılacak doku örnekleri -196°C'deki sıvı azot içerisine alınıp donduruldu. Bu örnekler dondurma işleminin ardından boyamanın yapılacağı zamana kadar -80°C'de muhafaza edildi. Proteom ve transkriptom analizi için örnek alımı tamamlanınca her gün kendi içerisinde 5'er örnekten 3 grup olacak şekilde gruplandırıldı. Gruplandırılan örnekler içerisinde sıvı azot bulunan havanda ezilip çözülüp protein lizatı elde edildi.

### **5.3. Histokimyasal boyama**

Her boyama öncesinde -80°C'de muhafaza edilen örnekler histokimyasal boyamalar için çıkartılıp uygun sıcaklık bileşeni(OCT) solüsyonu içerisine gömüldü. Mikrotom-kriyostat cihazı -40°C'ye ayarlandı ve OCT ile muamale edilmiş doku haznesine yerleştirildi. Kriyostat cihazı kullanılarak 14µm kalınlığında alınan kesitler polarize lamlara alınıp boyama işlemlerinde kullanılmak üzere -20°C'ye kaldırıldı.

### 5.3.1. Hematoksilen eozin

Hücre çekirdekleri, eritrositler ve sitoplazmanın organizasyonunun görülmesi için aksolotl kuyruk örneğinden alınan 14µm'lik kesitler -20°C'den çıkartılıp 30 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Beklemeden sonra örnekler 15 dakika aseton ile fikse edildi. Daha sonra aşamalı alkol yıkaması sırasıyla %100, %96 ve %70 etanol kullanılarak 30'ar saniyeden yapıldı. Sıralı etil alkol yıkamasını takiben örnekler distile su(dH<sub>2</sub>O) ile yıkandı. Hematoksilen ile 5 dakika boyunca oda sıcaklığında örnekler inkübe edildi. İnkübasyon sonrası 15 dakika damlamalı olarak musluk suyu altında örneklere yıkama yapıldı. Bu aşamadan hemen sonra örnekler 3 dakika oda sıcaklığında eozin içerisinde bekletildi. Eozin'den sonra tekrardan sıralı etil alkol yıkaması seyreltikten derişige doğru %70, %96, %100 olacak şekilde 30'ar saniye yapıldı. Aşamalı alkol yıkamasından hemen sonra ksilol ile örnekler muamele edilip 10 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Örnekler mounting medyum ile kapatıldı. Görüntüleme işlemi AxioZoom V16 (Zeiss) altında yapıldı.

### 5.3.2. Masson'un anilin mavili trikrom boyama yöntemi

Kollojen içeren dokuların gösterilmesi için aksolotl kuyruk örneğinden alınan 14µm'lik kesitler -20°C'den çıkartılıp 30 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Beklemeden sonra örnekler oda sıcaklığında %4'lük Paraformaldehit(PFA) içerisinde 15 dakika fikse edildi. Fiksasyon sonrası örnekler PFA'dan çıkartılıp 2 dakika Fosfat tamponlu tuzlu su(PBS) içerisinde inkübe edildi. PBS inkübasyonu sonrası örnekler hızlıca dH<sub>2</sub>O ile yıkandı. Sonrasında da oda sıcaklığında 2 dakika yine dH<sub>2</sub>O ile yıkama yapıldı. Masson-Trichrome Assay Kiti(Bio-Optica- 010802) A ve B ayırıcından aynı anda 50'şer µl eklendi. Sonrasında 10 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Bekleme sonrası yıkama yapılmadan örneklerin üzerine 100µl C ayırıcı eklendi ve 4 dakika inkübe edildi. Daha sonrasında örnekler 4 defa dH<sub>2</sub>O ile yıkandı. Yıkama sonrası 100µl D ayırıcı eklenip 4 dakika oda sıcaklığında bekletilip 4 defa dH<sub>2</sub>O ile yıkandı. Yıkamadan sonra örneklere 50µl E ayırıcı eklendi. E ayırıcı bulunan örnekler 10 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Örnekler yıkanmadan E ayırıcının üzerine 50µl F ayırıcı eklenip 5 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Bekleme süresinin sona ermesini takiben örnekler dH<sub>2</sub>O ile yıkanıp aşamalı alkol yıkamasına tabi tutuldu. Örnekler sırasıyla %70 ve %96'lık etanol ile hızlı bir şekilde yıkandı. Son yıkama olan %100'lük etanol aşamasında ise örnekler şaleler içerisinde 1 dakika bekletilerek yıkama yapıldı. Aşamalı alkol yıkamaları sonrasında örnekler kurutma kağıdı üzerinde kurutuldu. Örneklerin şeffaflaştırılması için üzerlerine 50µl toluen eklendi. Örneklerin üzerine örnekleri kaplayacak şekilde Biomount(Bio-Optica W01030706) damlatıldıktan sonra lamel ile kapatıldı. Görüntüleme işlemi AxioZoom V16 (Zeiss) altında yapıldı. Kollojenler; mavi renkte boyanmıştır.

### 5.3.3. Luksol fast blue boyama

Miyelin ve sinir hücrelerinin bulunduğu kısımların gösterilmesi için aksotl kuyruk örneğinden alınan 14µm'lik kesitler -20°C'den çıkartılıp 30 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Beklemeden sonra örnekler oda sıcaklığında %4'lük Paraformaldehit(PFA) içerisinde 15 dakika fikse edildi. Fiksasyon aşamasının tamamlanmasının ardından örnekler %96 etil alkol ile muamele edildi ve kurumaya bırakıldı. Kuruma sonrası örneklerin etrafı hidrofobik sıvı önleyici ile daire içerisine alındı. Örneklerin üzerine Luksol Fast Blue Boyama Kiti (Bio Optica,200812) A ayırıcında 200µl eklenip 56°C'de gece boyunca bekletildi. Sonraki gün örnekler 56°C'den alınıp %96 etil alkol ile sonrasında da dH2O ile yıkandı. Örnekler 500µl B ayırıcı eklenip ve etki göstermesi için 1 dakika bekletildi. Bekleme sonrasında B ayırıcı %70 etanol kullanılarak iyice yıkandı. Yıkamayı takiben örnekler 500µl C ayırıcı ve 250µl D ayırıcı sırası ile eklenip 56°C'de 20 dakika inkübasyon yapıldı. İnkübasyon bitince örnekler önce %96'lık, sonra %100'lük etanol ile yıkandı. Alkol yıkamaları sonrasında örnekler ksilen eklenerek iyice netleştirildi ve üzeri Biomount damlatıldıktan sonra lamel ile kapatıldı. Görüntüleme işlemi AxioZoom V16 (Zeiss) altında yapıldı. Miyelin; turkuaz mavisi, nöron-glia nükleusu mor-pembe, nisli cisimciği uçuk pembe

### 5.3.4. Periyodik Asit Schiff(PAS) Boyama

Doku karbonhidratlarının gösterilmesi için aksotl kuyruk örneğinden alınan 14µm'lik kesitler -20°C'den çıkartılıp 30 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Beklemeden sonra örnekler oda sıcaklığında %4'lük Paraformaldehit(PFA) içerisinde 15 dakika fikse edildi. Fiksasyon aşamasının tamamlanmasının ardından örnekler dH2O ile yıkanıp kurumaya bırakıldı. Kuruma sonrası örneklerin etrafı hidrofobik sıvı önleyici ile daire içerisine alındı. Örneklerin üzerine PAS Periodic Acid Schiff Hotchkiss Mc Manus 04 (Bio-Optica-130802) kiti A solüsyonu 250µl eklenip 10 dakika bekletildi. Örnekler dH2O ile yıkanıp 250µl B ayırıcı eklenip ve 20 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Örnekler dH2O ile yıkanıp 250µl C ayırıcı eklenip etkisini göstermesi için 2 dakika oda sıcaklığında bekletildi. C ayırıcı üzerine yıkama yapılmadan D ayırıcından 250µl eklenip 2 dakika inkübe oda sıcaklığında edildi. Örnekler dH2O ile durulanıp üzerine 250µl E ayırıcı damlatıldı. Örnekler musluk suyu altında 5 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Sonrasında kurutma kağıdı üzerinde kurutuldu. Örneklerin üzerine şeffaflaşması için toluen eklendi. Örneklerin üzeri Biomount damlatıldıktan sonra lamel ile kapatıldı. Görüntüleme işlemi AxioZoom V16 (Zeiss) altında yapıldı. PAS+ olan polisakkaritler; magenta kırmızı, nükleus; mavi renkte boyanmıştır.

### 5.3.5. Weigert - Von Gieson Boyama

Elastik liflerin gösterilmesi için aksotl kuyruk örneğinden alınan 14µm'lik kesitler -20°C'den çıkartılıp 30 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Beklemeden sonra örnekler oda sıcaklığında %4'lük Paraformaldehit(PFA) içerisinde 15 dakika fikse edildi. Fiksasyon aşamasının tamamlanmasının ardından örnekler dH2O ile yıkayıp kurumaya bırakıldı. Kuruma sonrası örneklerin etrafı hidrofobik sıvı önleyici ile daire içerisine alındı. Örneklerin üzerine 250µl Weigert - Von GIESON kiti(Bio-Optica - 053812) A solüsyonu eklenip 5 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Bekleme sonrası örnekler dH2O ile durulanıp örneklerin bekletildiği ortama 1ml B ayırıcı damlatıldı. Örneklerin üzerine de 250µl C ayırıcı eklenip inkübasyon ortamında 30 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Bekleme sonrasında örnekler iki defa dH2O ile yıkayıp üzerine 250µl D ayırıcı eklenip etkisini göstermesi için 2 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Bekleme sonrasında örnekler 5 dakika musluk suyu altında yıkandı. Sonrasında ise dH2O ile durulandı. Durulama sonrası örneklere art arda olacak şekilde 250µl E ve F ayırıcı eklenip 10 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Bekleme sonrası musluk suyu altında 10 dakika yıkama yapıldı. Yıkama sonrası 250µl G ayırıcı eklenip oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edildi. Örnekler inkübasyon sonrası hızlıca dH2O ile durulanıp ardından hızlıca sıralı etil alkol yıkamasına tabi tutuldu. Sıra ile %70, %96 ve %100'lük etil alkol yıkaması yapıldı. Aşamalı etil alkol yıkaması sonrası örnekler kurutma kağıdında kurutuldu. Örneklerin üzerine toluen eklenerek şeffaflık sağlandı. Örneklerin üzeri Biomount damlatıldıktan sonra lamel ile kapatıldı. Görüntüleme işlemi AxioZoom V16 (Zeiss) altında yapıldı. Elastik lifler; kırmızı kahverengi, nükleus siyah, eritrositler; sarı renkte boyanmıştır.

### 5.4. Biyoinformatik:

İlk olarak, bir araya getirilmiş 173,130 mRNA dizisi örneği mRNA kütüphanesine eklendi. Alınan aksotl mRNA verisine önceden anotasyon yapılmaması sebebiyle mRNA dizilerini tanımlamak üzere, NCBI'dan indirilen bir lokal nükleotid(nt) ve non-redundant protein sakansı(nr) veritabanı kuruldu. (ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/blast/db/). Sonrasında, Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) aracılığıyla nükleotid anotasyonu mevcut olan bütün nükleotid veri tabanlarına karşı yapıldı. mRNA dizilerinin anotasyonundan sonra nükleotid dizilerinden protein dizileri elde etmek için Tablo 5.4.1 'deki algoritma kullanıldı. Protein dizilerinin adlandırılması için mRNA anotasyonu ile elde edilen amino asit dizileri kullanıldı. Nükleotid BLAST kullanılarak sayıca az olan tanımlanmamış mRNA anotasyonlarının protein anotasyonlarını bulmak için de protein BLAST yapıldı. Elde edilen bütün verilerin analizi MATLAB ortamında gerçekleştirildi. İstatistiksel analizler sonucunda anlamlı değişen proteinlerden 1.5 kat ve üzeri olan 465 protein farklı günler arası karşılaştırma için seçildi. Günler arası karşılaştırma; 1. gün'ün diğer günler(0,4 ve 7. gün) ile kıyaslanarak yapıldı.

Anlamalı değişikliğe sahip proteinlerden de 36 tane sinirsel görevi olan protein bulundu. Bu proteinler üzerine yoğunlaşarak moleküler fonksiyonları, hücrenel bileşen olarak görevleri ve biyolojik süreçlerdeki görevleri gen ontoloji analizi yapılarak araştırıldı.

Tablo 5.4.Nükleotid - protein dönüşüm algoritması

<b>Input:</b> nucleotide sequences of 173,130 instances of mRNA
<b>Output:</b> amino acid sequences of 173,130 instances of mRNA
1: <b>for all</b> nucleotide sequences <b>do</b>
2:     COMPUTE 6 different reading frames from both 3'->5' and 5'->3'
3:     DETERMINE start and stop codons
4: <b>end for</b>
5: <b>for all</b> nucleotide sequences <b>do</b>
6: <b>for all</b> open reading frames <b>do</b>
7:         COMPUTE largest length of open reading frame
8: <b>end for</b>
9: <b>end for</b>
10: <b>for all</b> nucleotide sequence <b>do</b>
11: <b>for all</b> open reading frames <b>do</b>
12:         DETERMINE start and stop codons whose length is maximum
13:         DETERMINE the sequence of the longest nucleotide sequenc eidentified by
14:         start and stop codons
14:         COMPUTE the amino acid sequence of the longest nucleotide sequence
15: <b>end for</b>
16: <b>end for</b>

Anlamalı değişikliğe neden olduğu saptanan proteinlerin elde edilmesinden sonra; tanımlanan proteinin hesaplamalı analizi yapıldı. Gen ontolojisi analizinin yapılması için PANTHER Sınıflandırma Sistemi kullanıldı.(101) PANTHER veritabanına yüklenecek olan protein referansları aksotl için tanımlı olmadığından, elde edilen proteinlerin non-redundant fare(Mus musculus) ortologları NCBI üzerinden BLASTP kullanılarak elde edildi. Elde edilen referanslar PANTHER veritabanına yüklenip sınıflandırma analizi yapıldı. Tanımlanan aksotl proteinlerinin fare ortologları kullanılarak PANTHER veritabanı üzerinden hücrenel bileşen analizi, biyolojik süreçlerin analizi ve moleküler fonksiyon analizi yapıldı.



## 5.5. Proteomik Analiz Aşaması

Üçlü peptidlerin oluşturulması için filtre destekli örnek hazırlama yöntemi(FASP) kullanıldı.(17) 50µg protein lizati 6M üre (Sigma Aldrich) ile yıkandı. Sonrasında 10mM iyot asetamid(Sigma-Aldrich) ile karanlık ortamda ve oda sıcaklığında 20 dakika alkilleme yapıldı. Alkillemeden sonra örnekler ilk olarak 6M üre ile sonra da NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> ile yıkandı, daha sonrasında da tripsin/protein oranı 1/100 olacak şekilde gece boyunca tripsinizasyon işlemi yapıldı. Örnekler 100ng/µl'lik peptid konsantrasyonunda hazırlandı. LC-MS/MS analizi daha önce Tang ve ark. tarafından yapılan protokole göre yapıldı.(102)

Parçalanmış peptid dizilerini içeren örnekler 2µl asetonitril(ACN), 2µl trifloroasetik asit (TFA)(Sigma-Aldrich), 5µl standard solüsyon(MassPREP Enolase Parçalama Standardı) (Waters Corp., Milford, MA) ile çözüldü ve 50 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> ile toplam hacim 200µl'ye tamamlandı. Solüsyon 400 rpm 60°C'de 2 saat karıştırıldı. Karıştırma işlemi sonrası 21,000g 4°C'de 15 dakika santrifuj yapıldı. Yaklaşık 500 ng üçlü peptid karışımı içeren 2µl örnek LC-ESI-qTOF yüksek basınçlı sıvı kromatografi sistemine [nanoACQUITY yüksek basınçlı sıvı kromatografisi] (UPLC) ve SYNAPT nanolockspray iyon kaynaklı yüksek tanımlı kütle spektrometrisi, Waters] yüklendi. Enjeksiyondan önce kolonlar %97 mobil faz A[Su (LC-MS grade, Sigma) ile %0.1 Formik asit(FA)] ve %3 mobil faz B(ACN içeren %0.1 FA) ile kalibre edildi. Kolon sıcaklığı 35°C'ye ayarlandı. İlk olarak peptidler nanoACQUITY UPLC Symmetry C18 Yakalama kolonu(5µm partikül büyüklüğü, 180 µm iç diyametre(i.d.) × 20 mm uzunluk) ile 5µl/dk akış hızında 5 dakikada yakalandı. Peptidler, 300 nL/dakika akış hızında analitik kolon(nanoACQUITY UPLC BEH C18 Kolon, 1.7 µm partikül büyüklüğü, 75 µm i.d. × 250 mm uzunluk, Waters), üzerinde gradyan elüsyon yoluyla 90 dakika boyunca %5-40 ACN arasında lineer gradyan ile seyreltilerek yakalama kolonundan ayrıştırıldı. Veri bağımsız alım modu(MSE) cihazın pozitif iyon V modunda çalıştırılması, MS ve MS/MS fonksiyonlarının 1,5 saniye aralıklarda 6V düşük enerji ve 15-40V yüksek enerji uygulanarak peptid kütle/peptid yükü oranı(m/z) elde edilmesi ve amino asit dizisini anlamak için de ürünün iyon bilgisinin kullanılması ile gerçekleştirildi. Kütleli sürüklenmeyi düzeltmek için de her 45 saniyede iç kütle kalibre edici glu-fibrinopeptid(500 pmol/µL)(Sigma-Aldrich) 300nL/dk akış hızında nanolockspray iyon kaynağı vasıtasıyla eklendi. Peptid sinyallerinden 50 m/z ile 1900 m/z değerleri arasındaki veriler değerlendirilmeye alındı.(103)

Elde edilen proteinlerin gen referansları ve nükleotid referansları alınıp BLAST ile non-redundant fare ortologları bulundu. Fare ortologlarının da gen referansları ve erişim referansları alınarak Panther database üzerinde gen ontoloji analizi yapıldı. Yapılan analizler; biyolojik süreçler, moleküler fonksiyon ve hücresel bileşenler başlığı altında incelendi.

## 5.6. İmmünofloresan boyama

-80°C'de tutulan örnekler immünojenik boyamalar için alınıp OCT solüsyonu içerisine gömüldü. -40 ° C'ye ayarlanan mikrotom-kriyostat cihazına OCT ile muamele edilmiş doku yerleştirildi ve 14µm kalınlığında kesitler polarize lamlara alındı. Kesitler şaleler içerisinde 100 ml ph=7.4 PBS içerisinde çözülen %4'lük PFA karışımı ile fikse edildi. Fiksasyon sonrası PBS ile oda sıcaklığında 20 rpm'de 3 defa yıkama yapıldı. Yıkama sonrası örneklerin bulunduğu lam kurutma kağıdı ile örnekler zarar verilmeden kuruldu. Örneklerin etrafı sıvı engelleyici ile çizildi. Örneklerin üzerine 50'şer µ geçirgenlik solüsyonu(%0.3 Triton-X içeren PBS) damlatıldı. Sonrasında örnekler oda sıcaklığında 20 rpm'de 20 dakika bekletildi. Bekleme aşamasından sonra geçirgenlik solüsyonu ortamdaki uzaklaştırıldı. Örnekler 45µl bloklayıcı solüsyonu eklendi. Bloklayıcı %0.1 Triton-X-PBS ve %10 keçi veya tavuk serumu içerisinde gerçekleştirildi. Serumun keçi veya tavuk olarak tercihi kullanılacak birincil ve ikincil antikorlara göre yapıldı. Bloklayıcı solüsyonunun ilavesinden sonra oda örnekler sıcaklığında 20 rpm'de 1 saat bekletildi. Bekleme sonrası örnekler 3 defa hızlı bir şekilde PBS ile yıkandı. Daha sonra yine 3 defa olacak şekilde oda sıcaklığında 20 rpm'de 10'ar dakika PBS ile yıkandı. Yıkama sonrası lam iyice kurutulup örneklerin üzerine birincil antikorlar[Tubulin (1: 100, tavşan, Sigma, T3526), Laminin (1:50, tavşan, Sigma, L9393), αSMA (1: 100, fare, Sigma, A2547), Hsp70 / Hsc70 (1:50, fare, SantaCruz, sc-24) ve PP1β (1:50, keçi, SantaCruz, sc-6107)] eklendi. Birincil antikorlar eklendikten sonra örnekler +4°C'de gece boyunca bekletildi. Gece boyunca bekletilen örnekler 3 defa PBS ile hızlıca yıkandı. Sonrasında 3 defa oda sıcaklığında 20 rpm'de 10'ar dakika PBS ile yıkama yapıldı. Yıkama aşamaları bitince örnekler karşılık gelen ikincil antikorlar keçi-anti tavşan 488 (1: 200, Life Technologies, A-11008), keçi-anti fare 488 (1: 200, Life Technologies, A-11001) veya tavuk-anti keçi 488 (1: 200, Life Technologies, A21467) ile muamele edildi. İkincil antikorların eklenmesini takiben oda sıcaklığında 20 rpm'de 1 saat inkübasyon yapıldı. Bu esnada ikincil antikorların ışıktan etkilenmemesi için örneklerin üzeri alüminyum folyo ile kapatıldı. Sonrasında 3 defa PBS ile hızlı yıkama yapıldı. Ardından da 3 defa oda sıcaklığında 20 rpm'de 10'ar dakikadan PBS ile yıkama yapıldı. Yıkama aşamalarından sonra örnekler, hücrelerin nükleuslarının boyanması için içerisinde DAPI(Life Technologies, P36931) solüsyonu olan şale içerisinde oda sıcaklığında 20 rpm'de 5 dakika bekletildi. DAPI muamelesi sonrası örnekler bir kez PBS ile hızlıca yıkandı. Sonrasında oda sıcaklığında 20 rpm'de 5 dakika PBS ile yıkandı. Yıkama işlemi sonrası örnekler kurutma kağıdında kurutuldu. Örneklerin üzeri mounting medyum ile kapatıldı. Örneklerin görüntüleme işlemleri konfokal mikroskop LSM 780 NLO (Zeiss) kullanılarak yapıldı.

## 6. BULGULAR

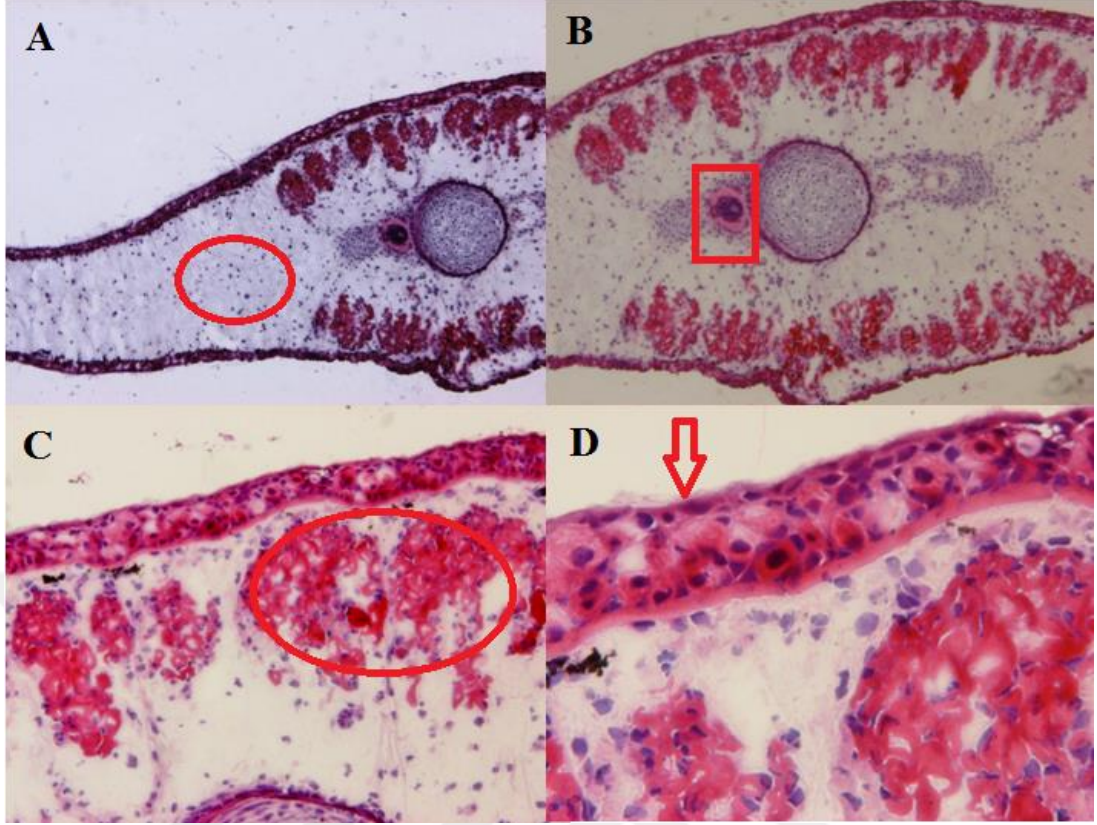
Aksolotl, rejenerasyonu ve kanseri araştırmak için çok uygun bir deneysel modeldir. Kanser türlerine karşı dayanıklı olup kanserin görülme sıklığının çok düşük düzeyde olması, rejenerasyon yeteneği, yaşam boyu larval döneme ait özelliklere sahip olması bu canlıyı deneysel model olarak cazip kılan genel özelliklerdir.(4) Aksolotlar; kalp, dalak ve karaciğer gibi iç organlarını,(63) ekstremitelerini,(25) kuyruklarını,(104) beyinlerini(79) ve omuriliklerini,(105) hasarlanma veya amputasyon sonrasında tamamen yenileyebilirler. Yenilenme süreci sonrası yeniden yapılmış olan kısım hasara uğrayan kısmın yapılmış olduğu fonksiyonel işlevi aynı şekilde yerine getirebilmektedir.(106) Ancak yapılan bütün gözlemlere ve analizlere rağmen aksolotl modelinin sahip olduğu rejenerasyon yeteneğinin altındaki hücresel sinyaller ve moleküler yollar gizemini korumaktadır. Rejenerasyon yapma yeteneği en düşük omurgalılar olan memeli canlılarda rejenerasyonun tam anlamıyla yapılabilmesi için gelişmiş omurgalılar arasında eşsiz rejenerasyon yeteneğine sahip aksolotlar ile memeliler arasındaki ortak hücresel sinyallerin ve moleküler yolların tanımlanması gerekmektedir. Ancak bu tanımlamaların yapılacağı rejenerasyon çalışmaları için en uygun deneysel araştırma modeli olan aksolotl canlısının genom haritasının hâlâ tanımlanmamış olması ve aksolotl ile alakalı genomik, transkriptomik ve proteomik verinin de azlığı yapılmış olduğu yeteneğin anlaşılmasına neden olmaktadır.

Aksolotl canlısının sahip olduğu rejenerasyon kapasitesinin memeli canlılar için de kullanılabilir hale getirilmesi için günümüz teknolojisinin gelişmiş imkanlarını kullanmak belki de yenilenmenin moleküler mekanizmalarının anlaşılmasına olanak sağlayacaktır. Hücresel sinyallerin ve moleküler yolların anlaşılmasında önemli bir role sahip olan genomik, transkriptomik ve proteomik analizler günümüz teknolojisinde bunun için en uygun imkan sağlayan teknolojidir. Aksolotl modelinde daha önce tanımlanmış protein profilinin sınırlı sayıda olması rejenerasyon esnasında rol alan proteinlerin çalışılmasını güçleştirmekte, aksolotl proteom veri tabanı oluşturmak için yetersiz kalmaktadır.(107, 108)

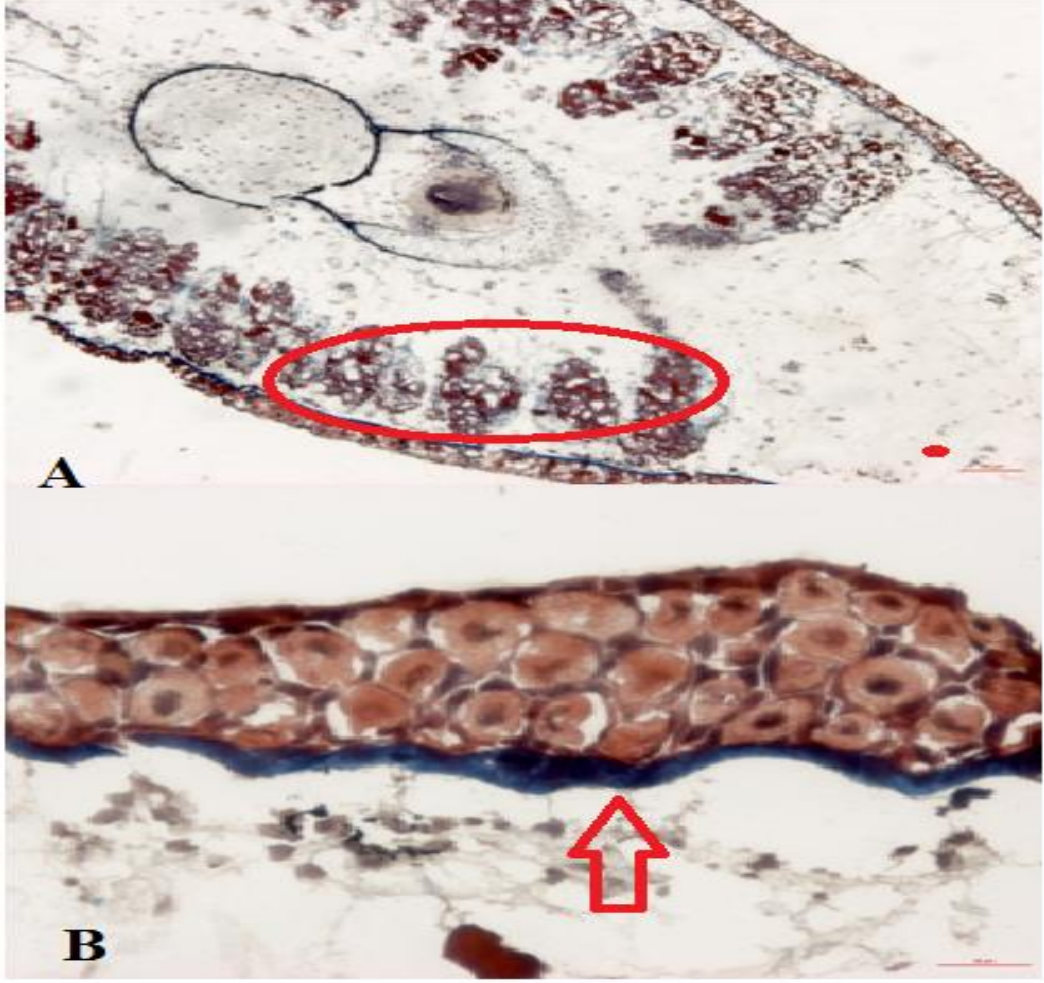
řu ana kadar yapılmış olan bütün proteom çalışmaları aksolotl ekstremitelerine ait proteomik analizlerini içermekte olup, proteom veritabanı oluşturmak için sayıca yetersiz kalmaktadır. Bu çalışmada aksolotl canlısının omurilik içeren kuyruk amputasyonu sonrası rejenerasyonda görev alabilecek proteinler annotate edilmiş ve rejenerasyonunun 1. günü, 4. günü ve 7. gününde meydana gelen protein değişiklikleri ilk defa gösterilerek farklılık gösteren gen ifadesi analizi yapılmıştır. Çalışmanın devamında da literatür bilgileri ışığında aksolotl omurilik rejenerasyonunda görev alması muhtemel proteinler detaylı olarak analiz edilmiştir.

## 6.1. Histolojik Boyamalar

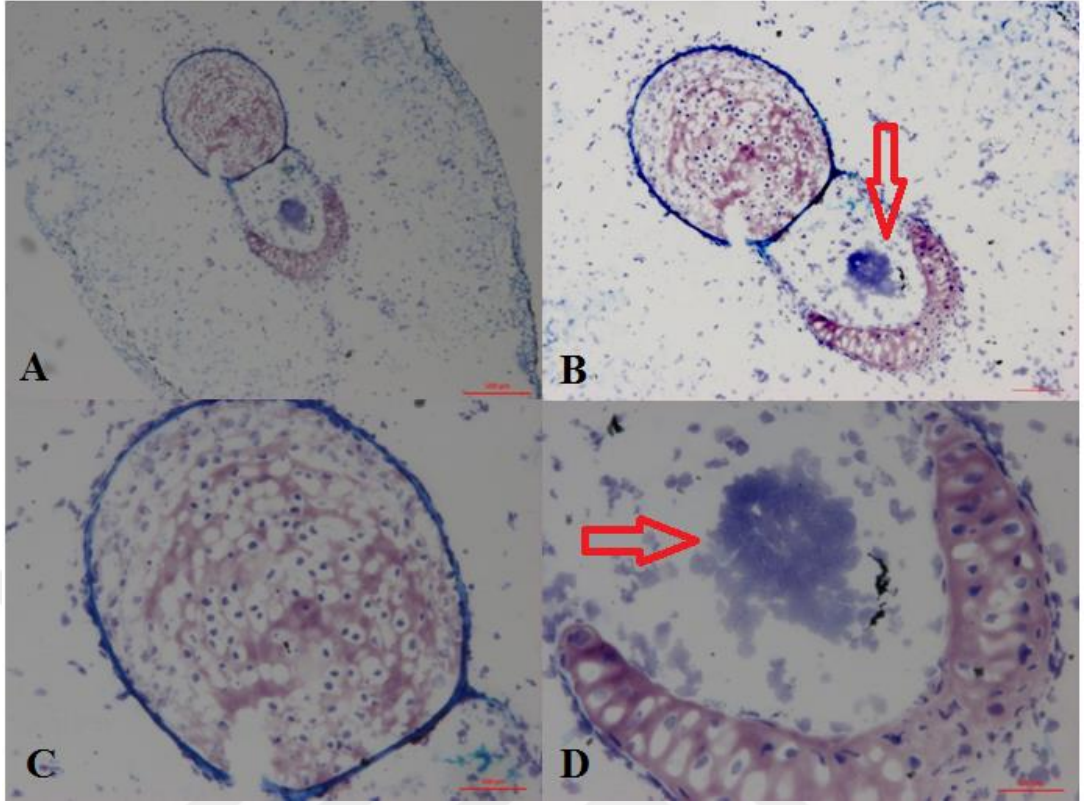
Aksolotlardan alınan kuyruk örneklerinin histolojik yapısının belirlenmesi ve omurilik rejenerasyonunun gerçekleştiği bölgelerin gösterilmesi ve tanımlanması için histolojik boyamalar yapıldı. Hasar sonrası gerçekleşen süreçte sinir hücrelerinin yöneliminin ve uzamasının gerçekleştiği gevşek bağ doku ve hücreler arası bölgeler süreci gerçekleştiği kısmı açık bir şekilde gösterme amaçlı histolojik boyamalara tabi tutuldu. Hücre çekirdekleri ve sitoplazma organizasyonunun belirlenmesi için Hematoksilen-Eozin boyaması, kollajen içeren dokuların belirlenmesi için Masson'un anilin mavili trikrom boyaması, elastik liflerin belirlenmesi için Weigert Von Gieson boyama, doku karbonhidratlarının belirlenmesi için Periyodik Asit Schiff boyama ve sinir hücreleri ile miyelinizasyonun bulunduğu kısımların belirlenmesi için Luksol Fast Blue boyama üreticinin(Bio-Optica) protokollerine uygun olarak yapıldı.



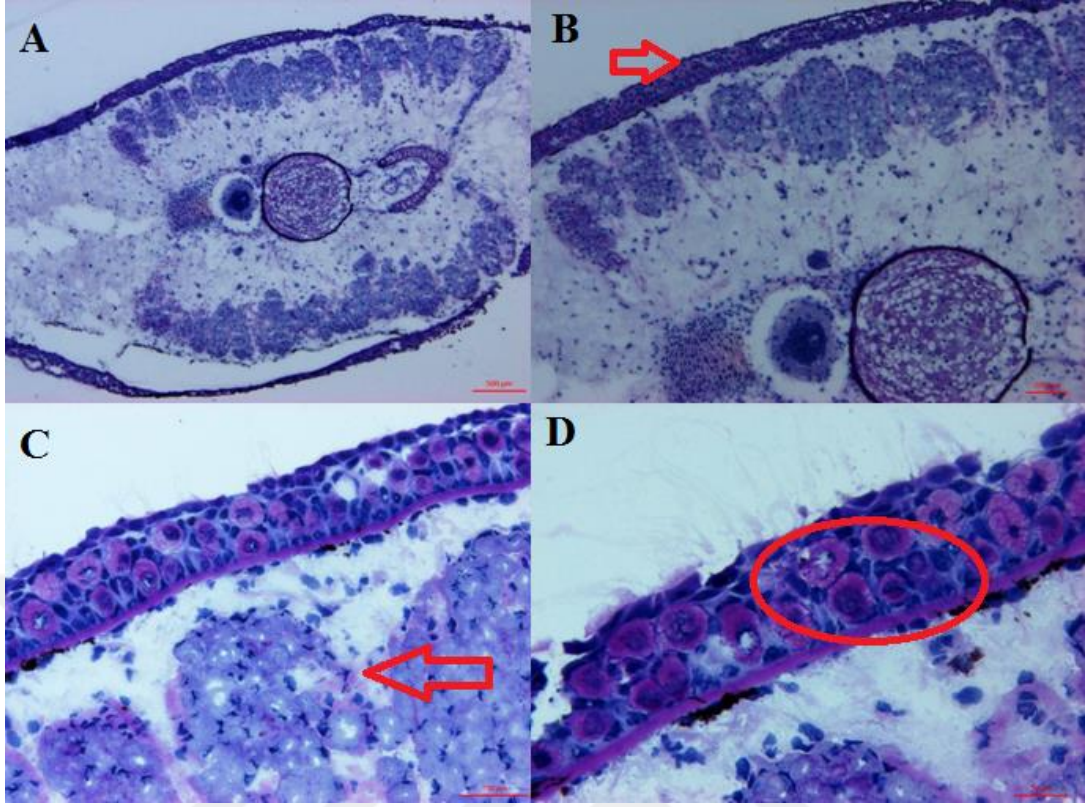
Resim 6.1.1.Aksolotl kuyruk Hematoksilen-Eozin boyama. (A)Yumuşak bağ doku(daire), (B)Omurilik(dikdörtgen), (C)İskelet kası lifleri(daire), (D) Epidermis(ok). Hücre çekirdekleri; koyu mavi-menekşe renkte, sitoplazma; pembe renkte boyanmıştır.



Resim 6.1.2.Aksolotl kuyruk Masson'un anilin mavili trikrom boyama. (A)İskelet kası lifleri(daire), (B)Bazal mebran(ok). Kollojen içeren dokular; mavi renkte, kas lifleri; kırmızı renkte, nukleus; koyu kahverengi-siyah renkte boyanmıştır.

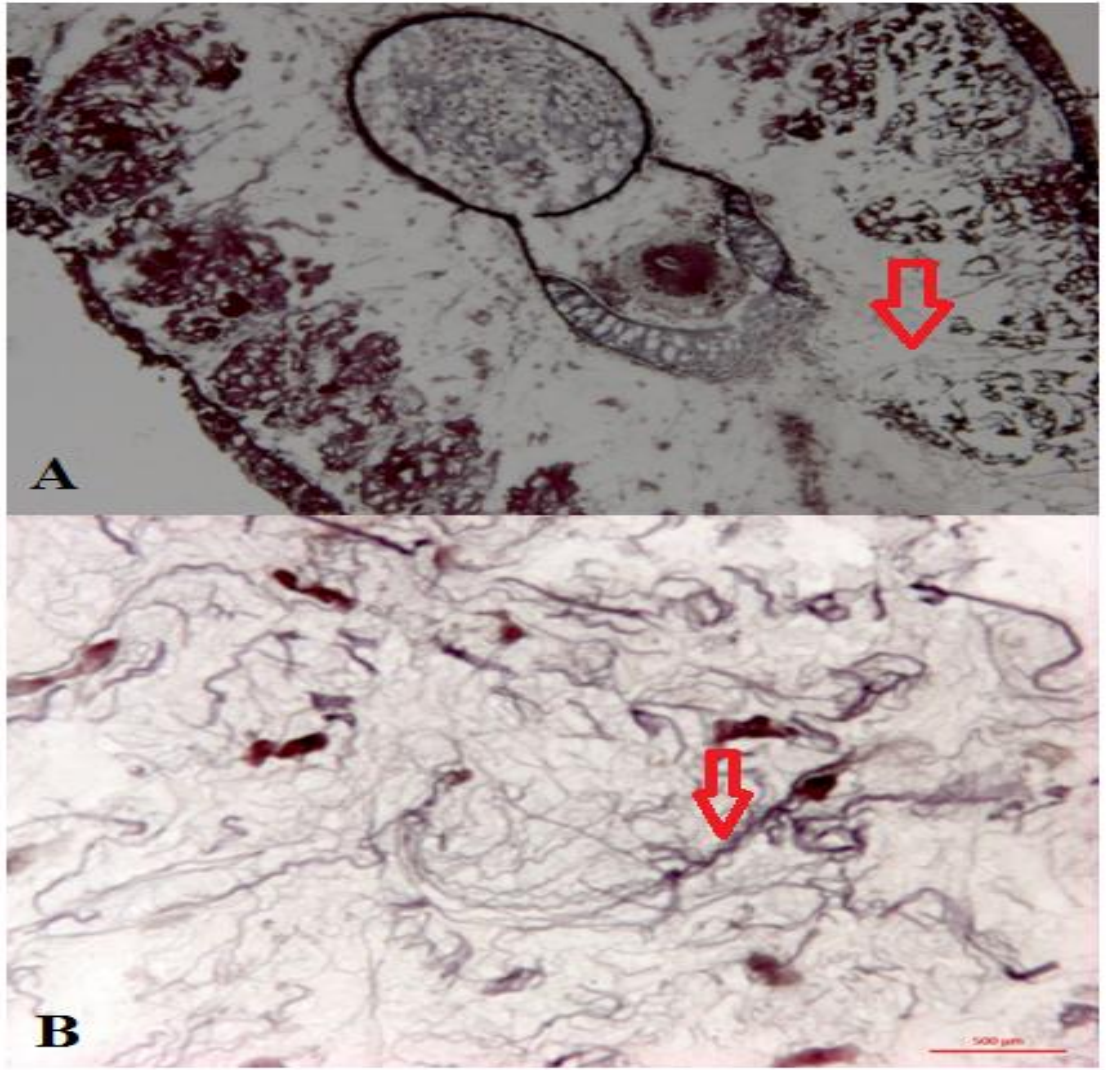


Resim 6.1.3. Aksolotl kuyruk Luksol Fast Blue boyama. (A) Miyelinizasyon ve sinir hücrelerinin geniş açı görünümü (B) Omurilik(ok), (C) Sinir hücresi topluluğu (D) Omurilik(daire), Miyelin; turkuaz mavisi renkte, sinir hücreleri ve glial hücreler; mor-pembe renkte, nissl cisimcikleri uçuk pembe renkte boyanmıştır.



Resim 6.1.4.Aksolotl kuyruk Periyodik Asit Schiff Boyama. (A)PAS+ hücrelerin görünümü, (B)Epidermis(ok), (C)İskelet kası lifleri(ok), (D)Epidermal leydig hücreleri(daire). Doku karbonhidratları; magenta-kırmızı renkte, nukleuslar; mavi renkte boyanmıştır.





Resim 6.1.5.Akslotl kuyruk Weigert Von Gieson boyama. A)Kuyruk boyama pozitif elastik lifler(ok) üstten görünüm, (B)Elastik lifler(ok) yakın görünüm, Elastik lifler; kırmızı kahverengi, nukleus; siyah, eritrositler; sarı renkte boyanmıştır.

## 6.2. Aksolotl kuyruk rejenerasyonunda görevli proteinler

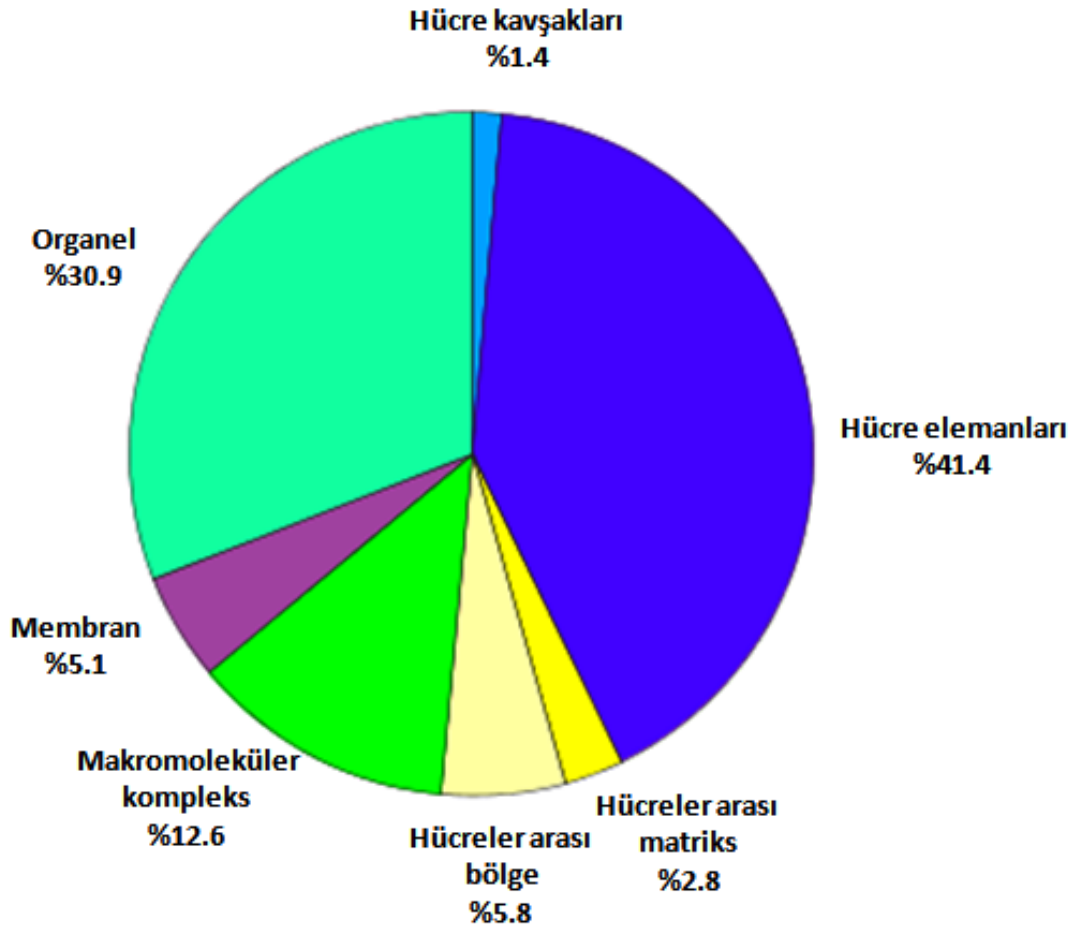
Proteom analizinin yapılması için öncelikle filtre yardımıyla örnek hazırlama metodu kullanıldı.(109) 50µg protein lizati iyot-asetamit ve ditiyotreitol ile indirgenme ve alkilleme basamakları için inkübe edilip tripsinizasyon için gece boyunca inkübe edildi. 200 ng üçlü peptid karışımının LC-MS/MS nano sistem ile analizi yapılarak farklı günlere ayrılmış gruplara ait farklılaştırılmış protein ifadesi analizi yapıldı.(102)

Proteom analizi sonucunda 1864 tane peptid sekansı elde edildi. Elde edilen bu sekanslardan 1103 tanesi protein tanımlama kriterlerini geçti. Oluşturulan peptidlere karşılık gelen proteinlerin tanımlanması hedeflendi. Ancak aksolotl modeline ait herhangi bir protein veri tabanı olmadığı için daha önce elde edilen aksolotl mRNA sekanslama verisi protein veritabanının oluşturulması için kullanıldı. Elde edilen 1103 peptid içerisinde 1001 peptid ökaryotik proteinlere karşılık gelirken, diğer proteinler de bakterilere ait proteinler veya henüz herhangi bir eşleniği olmayan proteinler, tanımlanmamış olabilecek proteinler, olarak elde edildi.

Anlamli değişikliğe neden olduğu saptanan proteinlerin elde edilmesinden sonra; tanımlanan proteinin hesaplamalı analizi yapıldı. Hesaplamalı analizin yapılması için PANTHER Sınıflandırma Sistemi kullanıldı.(101) PANTHER veritabanına yüklenecek olan protein referansları aksolotl için tanımlı olmadığından, elde edilen proteinlerin non-redundant fare(*Mus musculus*) ortologları NCBI üzerinden BLASTP kullanılarak elde edildi. Elde edilen referanslar PANTHER veritabanına yüklenip sınıflandırma analizi yapıldı. Tanımlanan aksolotl proteinlerinin fare ortologları kullanılarak PANTHER veritabanı üzerinden hücresel bileşen analizi, biyolojik süreçlerin analizi ve moleküler fonksiyon analizi yapıldı.

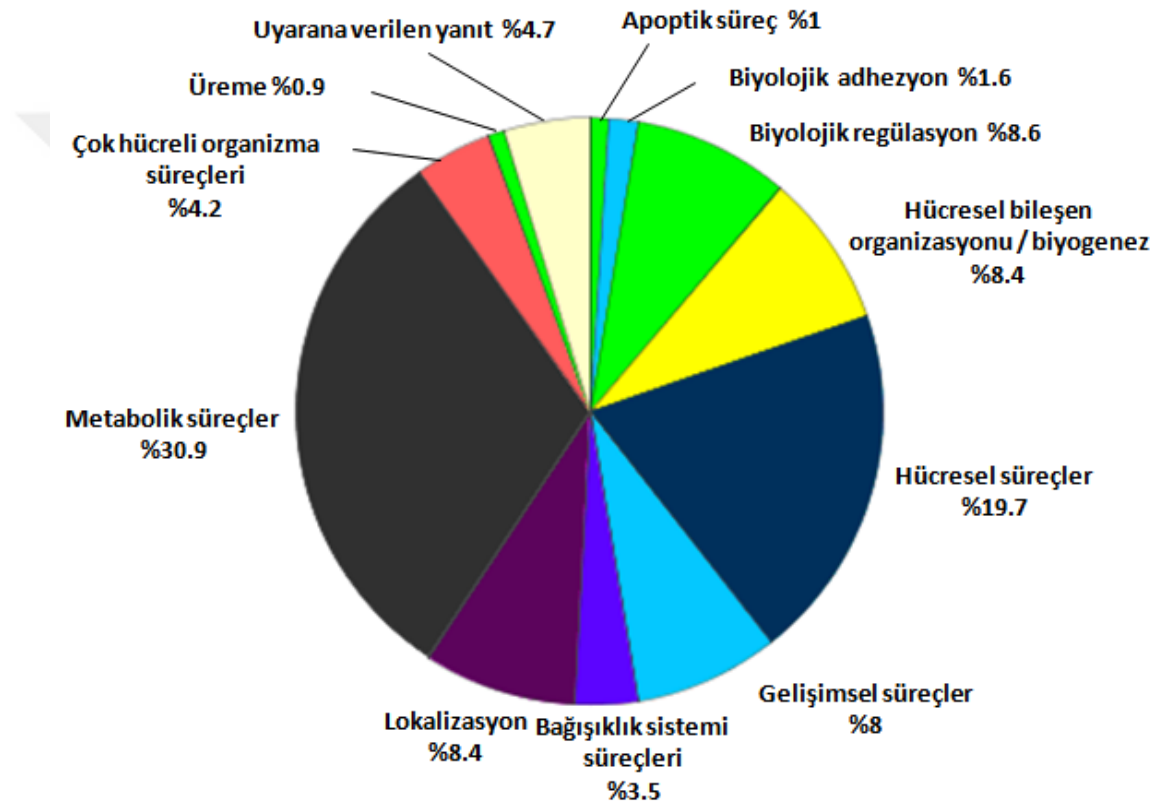
Yapılan istatistik analizleri doğrultusunda elde edilen proteinlerden 1.5 kat ve üzeri olan 465 proteinin anlamli değiştii kabul edilip farklı günler arası karşılaştırma yapıldı. Karşılaştırma; 1. gün baz alınarak diğer günler(0,4 ve 7. gün) ile kıyaslama yapıldı. Anlamli değişikliğe sahip proteinlerden 36 tanesinin sinirsel süreçler ile ilgili görevi olduğu tespit edildi. Bu proteinlerin moleküler fonksiyonları, hücresel bileşen olarak görevleri ve biyolojik süreçlerdeki görevleri gen ontoloji analizi yapılarak araştırıldı.

PANTHER veritabanında tanımlanan aksotl proteinlerinin hücresel bileşen analizi sonuçlarına göre daha çok yapısal ve sitoplazma içerisinde görev yapan proteinler olduğu analiz edildi. Bunların dışında makromoleküler komplekslerde, hücreler arası bölgede, hücre zarında, hücreler arası matrikste ve hücre kavşaklarında görevli oldukları analiz edildi.



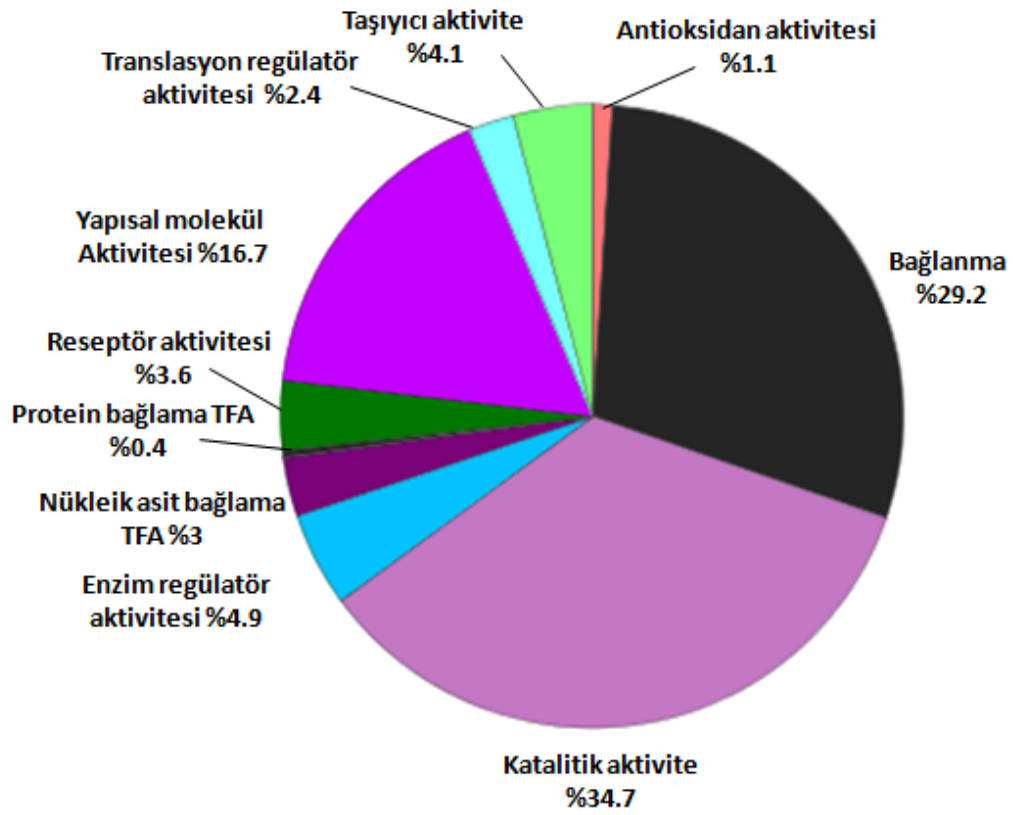
Şekil 6.2.1.Kuyruk rejenerasyonunda tanımlanan proteinlerin hücresel bileşen analizi.

Biyolojik süreçlerin analizi sonucunda tanımlanan aksotl proteinlerinin çoğunluğunun metabolik olaylarda, hücresel olaylarda ve biyolojik düzenlemelerde rol aldığı analiz edildi. Diğer önemli görevler ise hücresel bileşenlerin organizasyonu, lokalizasyonel düzenlemeler, gelişimsel süreçler, çok hücreli organizmalara ait süreçler, uyarana yanıt süreçleri bağışıklık sistemi süreçleri, biyolojik adezyon süreçleri ve apoptotik süreçler olarak analiz edildi. Biyolojik süreç analizi değerlendirildiğinde metabolik, hücresel ve gelişimsel süreçler ile hücresel bileşenlerin organizasyonu ve çok hücreli organizmalara ait süreçlere ait proteinlerin elde edilenlerin yarısından fazla yüzdeye sahip olması yapılan analizleri kantitatif olarak doğrulamaktadır.



Şekil 6.2.2. Kuyruk rejenerasyonunda tanımlanan proteinlerin biyolojik süreç analizi

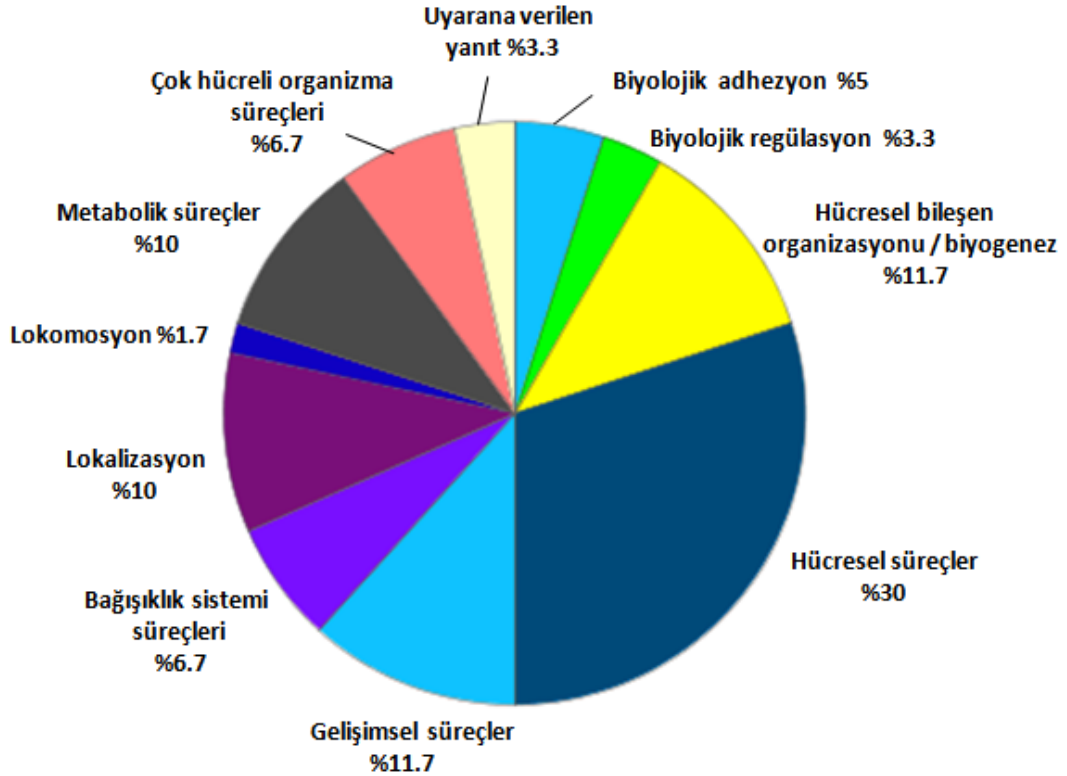
Moleküler fonksiyon analiz sonuçlarına göre proteinlerin büyük çoğunluğunun katalitik aktivite, bağlanma aktivitesi ya da yapısal molekül aktivitesi gösterdiği elde edildi. Diğer yapılan görevlerin enzim düzenleyici aktiviteye, taşıyıcı aktiviteye, reseptör aktivitesine, nükleik asit bağlama aktivitesine, translasyon düzenleyici aktiviteye, antioksidan aktivitesine ve protein bağlama aktivitesine sahip olduğu analiz edildi. Rejenerasyonun tamamı göz önüne alınarak elde edilen moleküler işlevler değerlendirildiğinde yüksek oranda etkinliğe sahip aktivitelerin, yapısal molekül aktivitesi, katalitik aktivite ve bağlanma aktivitesi, yapım-yıkım süreçlerinde rol alması elzem olan fonksiyonlar olması analizin doğruluğunu desteklemektedir.



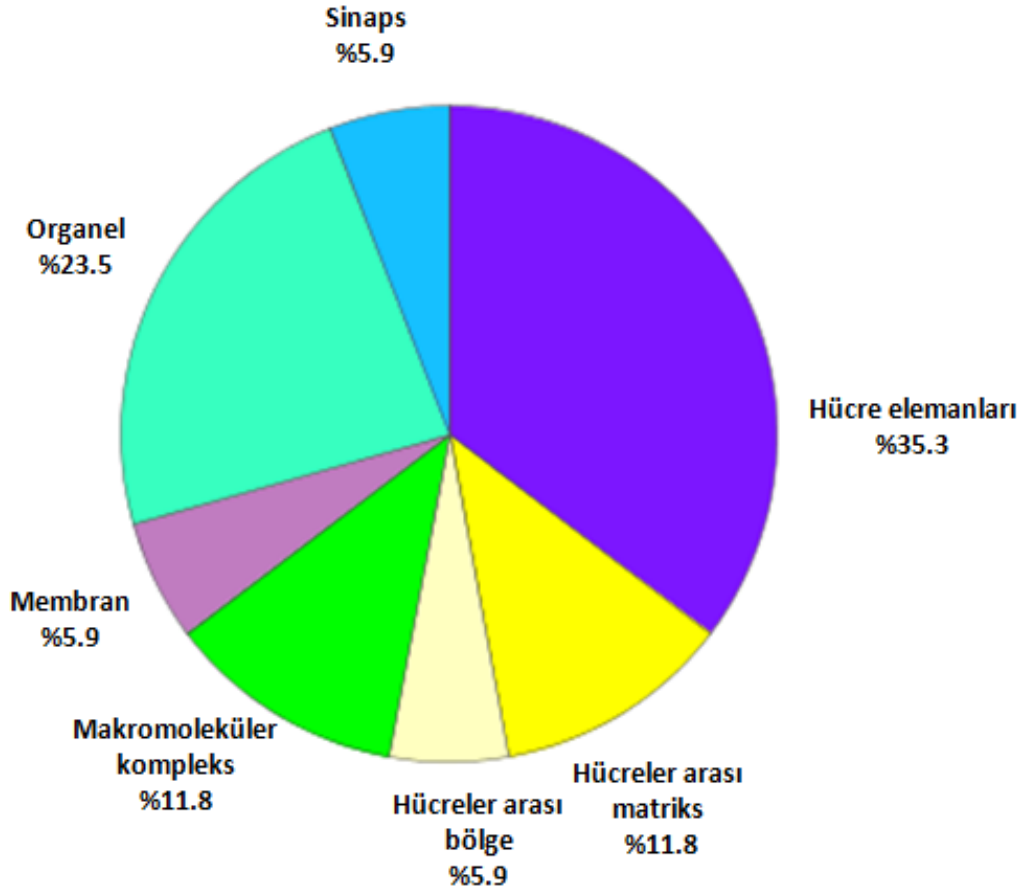
Şekil 6.2.3. Kuyruk rejenerasyonunda tanımlanan proteinlerin moleküler fonksiyon analizi.

### 6.3 - Aksolotl omurilik rejenerasyonunda görevli proteinler

Aksolotl kuyruk rejenerasyonunu sağlayan proteinlerin hesaplamalı analizinin incelenmesini takiben omurilik rejenerasyonunda görevli proteinlerin seçilmesi için fare ortologlarına ait referanslar üzerinden anlamlı değişikliğe sahip her proteinin görevleri tespit edildi. Anlamlı değişikliğe sahip 465 protein arasından sadece 36 tanesinin sinirsel işlevleri olduğu bulundu. Bu proteinlere ait hücresel bileşen analizi, biyolojik süreç analizi ve moleküler fonksiyon analizi kendi ortolog referansları kullanılarak PANTHER veritabanı üzerinden yapıldı. Sinirsel aktiviteye sahip olan ve omurilik rejenerasyonunda görev alabilecek proteinler ayrıca 1. güne ait örnekler ile yapılan kıyaslamalarda hangi günde en yüksek ve en düşük ifade değerine sahip olduğu analiz edildi. Uniprot veritabanında tanımlanan proteinlerin fare ortologları kullanılarak yapılan işlev araştırmalarında Tablo 6.3.2.'de de gösterildiği üzere sinirsel rejenerasyon, aksonal yenilenme, merkezi sinir sistemi yenilenmesi, aksonal yönelim, sinir hücresi göçü, sinir hücresi olgunlaşması, öğrenme ve hafıza, sirkadyen ritim, sinaps regülasyonu, miyelinizasyon vb. önemli rollere sahip oldukları analiz edildi.

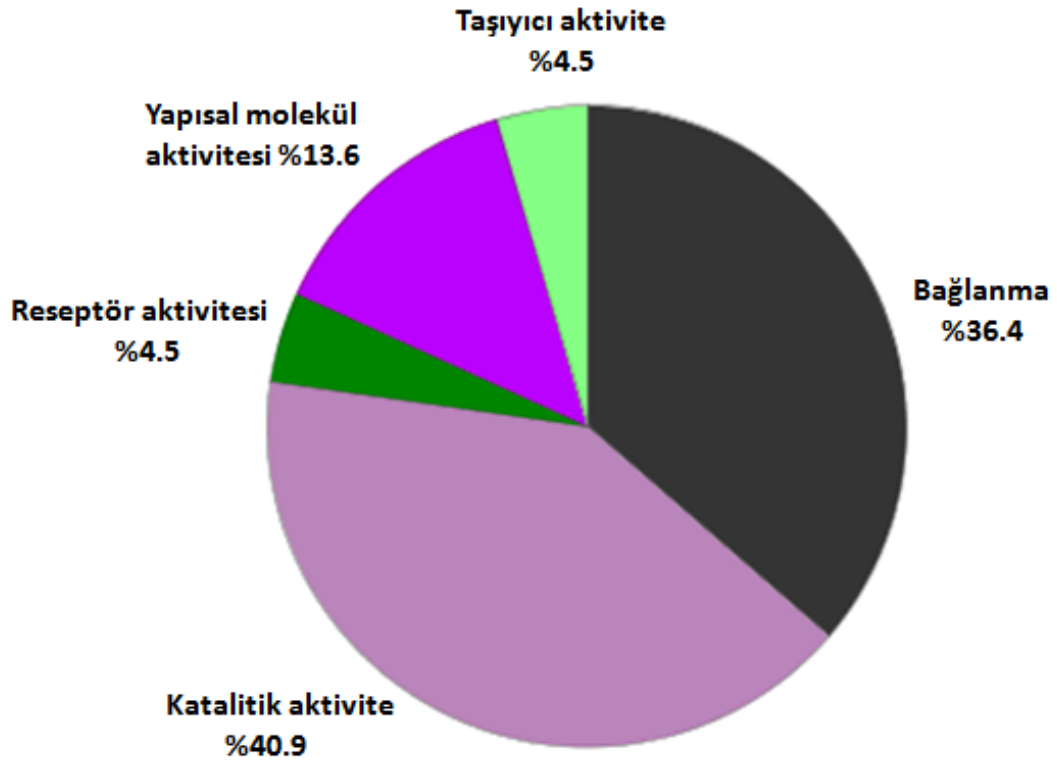


Şekil 6.3.1. Omurilik rejenerasyonu için tanımlanan proteinlerin biyolojik süreçler analizi.



Şekil 6.3.2.Omurilik rejenerasyonu için tanımlanan proteinlerin hücresel bileşen analizi.

Sinirsel aktivite ile ilgili görevi olduğu bulunan proteinlerin PANTHER analizi yapılarak biyolojik süreçlere ait verilerinde en çok hücresel, gelişimsel, metabolik süreçler ile bağışıklık sistemi süreçlerinde rol aldığı analiz edilmiştir. Bu proteinlerin hücresel bileşen analizlerinde en çok hücre ve organel elemanları olarak görev aldıkları, makromoleküler kompleks, hücreler arası matriks, hücreler arası bölge, membran ve sinapsta da rol aldığı tespit edilmiştir.



Şekil 6.3.3. Omurilik rejenerasyonu için tanımlanan proteinlerin moleküler fonksiyon analizi.

Sinirsel olaylarda ilgili görevleri olduğu tespit edilen proteinlerin literatür verilerine göre çoğunlukla aksonal uzama, aksonal yönelim, merkezi sinir sistemi projeksiyonu, nöronal olgunlaşma, sinir sistemi gelişimi, astrosit göçü, miyelinizasyon, nöral tüp katlanması, periferel sinir sistemi aksonal yenilenme, öğrenme ve hafıza, sinirsel apoptotik süreçler, sinaptik geçiş, TRK reseptör sinyal yolağı, aksonal taşınma, sirkadiyen ritmi akson ve dendrit gelişimi ve sinirsel dallanma süreçlerinde rol aldığı tespit edildi.



Tablo 6.3.1.Sinirsel görevi olan proteinlere ait hit verileri ile fare gen ve protein ortoloğu

<b>Gen Ref.</b>	<b>Gen Sembolü</b>	<b>Nükleotid Ref.</b>	<b>Fare Gen Ort.</b>	<b>Fare Prot. Ort.</b>
gi 823468215	SLIT3	XM_012575664.1	226823283	NP_035542.2
gi 513195606	NR4A2	XM_004943055.1	7305325	NP_038641.1
gi 556954967	KDM2B	XM_005988984.1	755513744	XP_01124651 2.1
gi 733913777	OLFM1	XM_010720989.1	2599125	AAB84058.1
gi 719779164	HEXB	XM_010223492.1	148668553	EDL00872.1
gi 641774671	HOOK3	XM_008172652.1	46559745	NP_997542.1
gi 674085002	VASP	XM_008852040.1	1617402	CAA67108.1
gi 530565088	RAB8A	XM_005279051.1	38372905	NP_075615.2
gi 641775877	SPTBN1	XM_008173041.1	568970049	XP_00651466 4.1
gi 727055498	DPYSL2	XM_010408272.1	568986628	XP_00651857 1.1
gi 213410	NVTN1	M76615.1	126722834	NP_035737.2
gi 837809781	ARG1	XM_004587236.2	71059675	CAJ18381.1
gi 823466735	AARS	XM_012570372.1	148679537	EDL11484.1
gi 542155741	RRAS2	XM_005486626.1	165972315	NP_080122.2
gi 591367768	GPI	XM_007058670.1	254553458	NP_032181.2
gi 641759755	RASA1	XM_005288152.2	227170	1615347A
gi 524978917	COL4A2	XM_005037479.1	226437587	NP_034062.3
gi 542156244	COL6A3	XM_005486868.1	339895744	NP_00122993 7.1
gi 564260954	MAPK1	XM_006269319.1	6754632	NP_036079.1

gi 529443255	COL6A1	XM_005241291.1	6753484	NP_034063.1
gi 701346251	RHOA	XM_009993263.1	31542143	NP_058082.2
gi 533166094	DBNL	XM_005396685.1	226423873	NP_00113978 1.1
gi 640805780	NDEL1	XM_008061138.1	9965368	AAG10061.1
gi 641795146	KIF5B	XM_005290971.2	148691088	EDL23035.1
gi 701400654	EPHA7	XM_009970533.1	568926053	XP_00653766 9.1
gi 557276295	SYAP1	XM_006021240.1	270265917	NP_080208.2
gi 699658014	NAMPT	XM_009883548.1	257153454	NP_067499.2
gi 836709591	SPTAN1	XM_004613285.2	568913212	XP_00649787 7.1
gi 557278113	COL6A2	XM_006022067.1	22203747	NP_666119.1
gi 641779766	LUZP1	XM_005309372.2	187950785	AAI37785.1
gi 542163307	EZR	XM_005490247.1	83921618	NP_033536.2
gi 830222311	KIF4A	XM_004694456.2	162287089	NP_032472.2
gi 697443123	COL3A1	XM_009666273.1	30851550	AAH52398.1
gi 46849362	G6PD	AB111377.1	6996917	NP_032088.1
gi 557330839	MPZ	XM_006038221.1	162139829	NP_032649.2
gi 27436374	GAPDH	AF482996.1	62201487	AAH92267.1

Tablo 6.3.2.Omurilik yenilenmesinde görevli proteinlerin işlevleri ve ifade değişiklikleri

Gen Sembolü	Fonksiyon	E.Y.K.D.	E.Y.O.D.	E.D.O.D.
SLIT3	Aksonal uzama, Aksonal yönelim(110)	16,786336	7. gün	0. gün
NR4A2	Dopaminerjik sinir farklılaşması,(111) Nöronal göç, Nöronal olgunlaşma(112)	7,0450382	0. gün	0. gün
KDM2B	Ön beyin gelişimi, Orta beyin gelişimi, Arka beyin gelişimi, Nöral tüp katlanması(113, 114)	5,0416237	1. gün	7. gün
OLFM1	Nöron göçünün negatif regülasyonu, Sinir sistemi gelişimi(115, 116)	3,7101250	7. gün	0. gün
HEXB	Astrosit göçü, Miyelinizasyon(117)	3,5663559	4. gün	0. gün
HOOK3	Nöral kök hücre devamlılığı, Nörogenез regülasyonu(118)	3,4085317	7. gün	0. gün
VASP	Aksonal yönelim, Nöral tüp katlanması(119)	3,3336488	1. gün	7. gün
RAB8A	Sinaptik vesikül ekzositozu, Uzun süreli nöronal sinaptik plastisite(120) Aksonogenez(121)	2,9896313	1. gün	0. gün

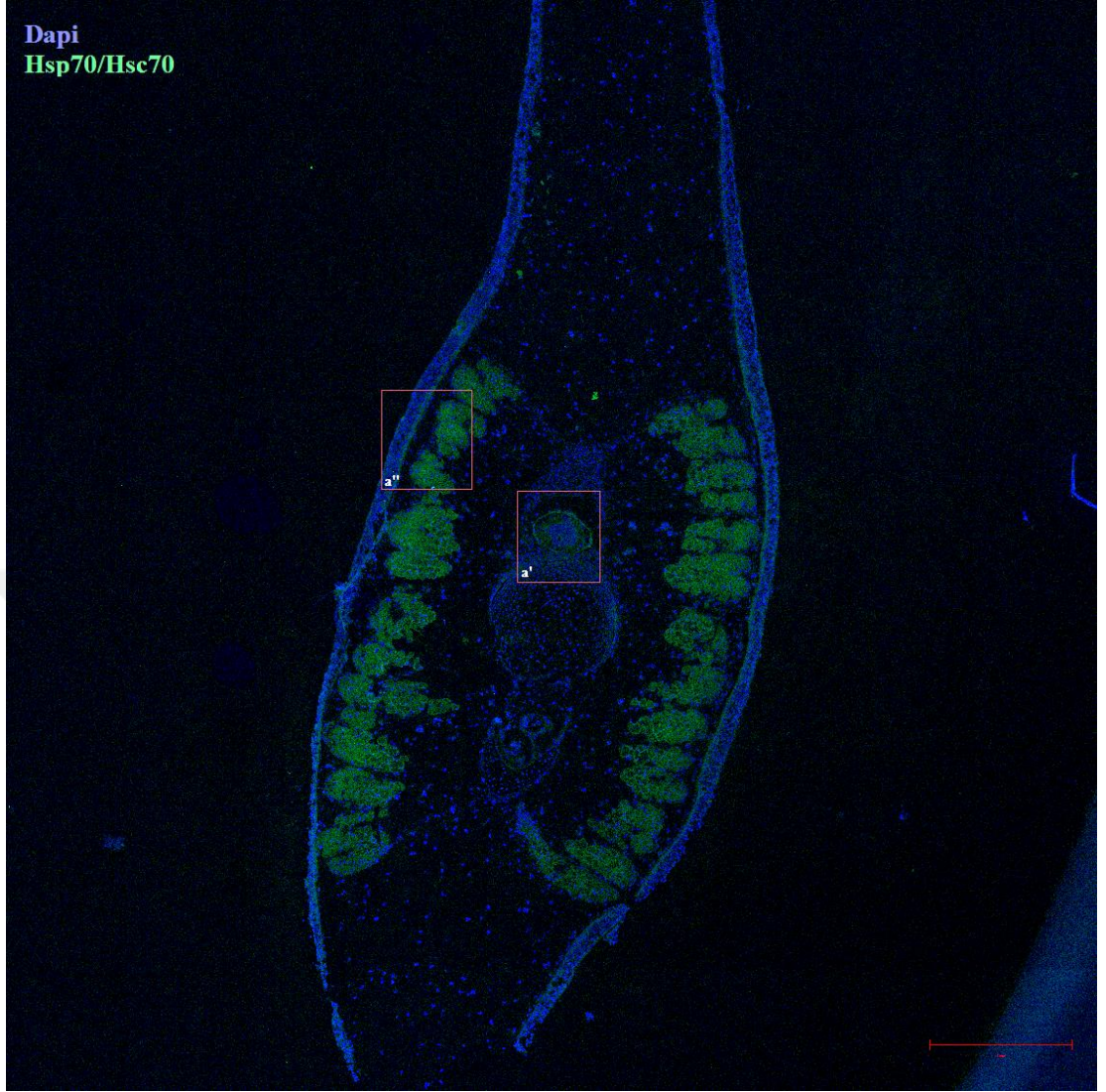
SPTBN1	Aksonal yönelim(122)	2,6612293	1. gün	0. gün
DPYSL2	Nörogenez, Akson yönelimi, Sinir sistemi gelişimi,(123) Omurilik gelişimi(124)	2,4918418	7. gün	1. gün
NVTN1	PSS akson rejenerasyonu(125)	2,1370208	0. gün	7. gün
ARG1	Nöronal yönelim(126)	2,0768127	4. gün	0. gün
AARS	Nöromusküler süreç(127, 128)	1,9383703	4. gün	7. gün
RRAS2	Nöron ölümü regülasyonu(129)	1,9214275	0. gün	7. gün
GPI	Öğrenme ve hafıza(130)	1,9014677	4. gün	0. gün
RASA1	Aksonal yönelim(131)	1,8016997	4. gün	0. gün
COL4A2	Aksonal yönelim(132)	1,7666800	7. gün	0. gün
COL6A3	Aksonal yönelim(132)	1,7631617	7. gün	0. gün
MAPK1	Aksonal yönelim(133) TRK reseptör sinyal yolağı(134)	1,7409652	7. gün	1. gün
COL6A1	Aksonal yönelim(132)	1,7408401	4. gün	7. gün
RHOA	Aksonal yönelim, Aksonogenez(135) TRK reseptör sinyal yolağı(136)	1,7351643	0. gün	1. gün
DBNL	Nöronal yönelim(137)	1,6458690	4. gün	7. gün

NDEL1	Nöronal yönelim(138)	1,6258642	4. gün	7. gün
KIF5B	Aksonal yönelim,(139) Sinaptik geçiş(140)	1,6227492	4. gün	0. gün
EPHA7	Nöronal dallanma morfogenezi,(141) Nöronal apoptoz regülasyonu,(142) Beyin gelişimi, Aksonal yönelim(143)	1,6143805	4. gün	7. gün
SYAP1	Kısa süreli plastisite(144) Memelilere ait tanımlanmış fonksiyonu yok	1,6123487	1. gün	7. gün
NAMPT	Sirkadiyen ritim(145)	1,6091697	0. gün	4. gün
SPTAN1	Aksonal yönelim(146)	1,5803860	1. gün	7. gün
COL6A2	Aksonal yönelim(132)	1,5803860	1. gün	7. gün
LUZP1	Sinir plakasının bükülmesi(147)	1,5666979	0. gün	7. gün
EZR	Aksonal yönelim(148)	1,5575269	4. gün	0. gün
KIF4A	Aksonal yönelim(149) Aksonal kargo taşınımı(150)	1,5483489	0. gün	4. gün
COL3A1	Aksonal yönelim, Nöronal göç(132)	1,5377415	4. gün	7. gün
G6PD	Nöronal apoptoz süreci(151) S. nigra gelişimi(152)	1,5304921	4. gün	0. gün

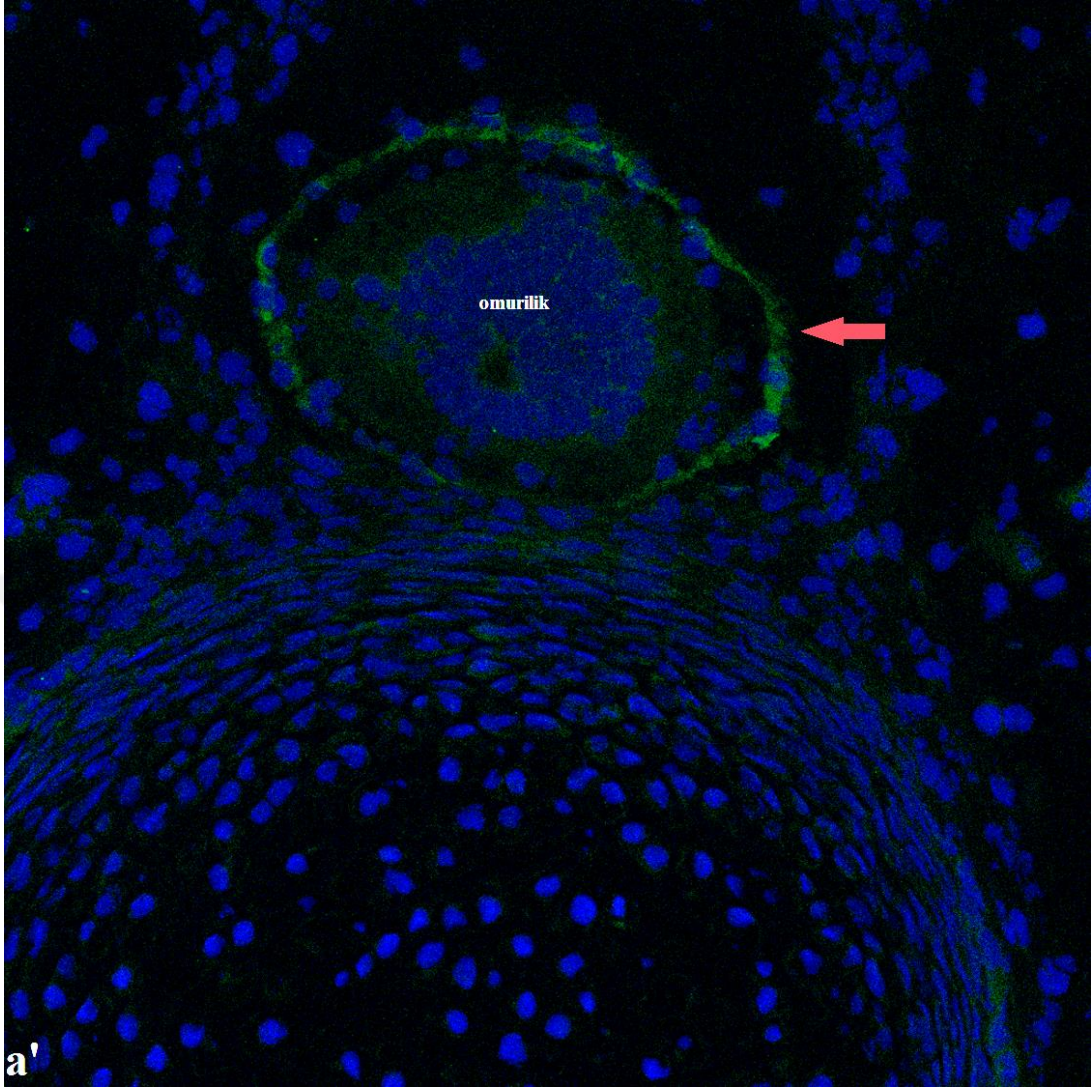
MPZ	Sinaptik geçiş(153)	1,5285940	0. gün	7. gün
GAPDH	Nöronal apoptoz süreci(154) akson ve dendrit gelişimi(155)	1,5092005	0. gün	4. gün

#### 6.4 - İmmunoflöresan boyama

Proteomiks verilerinin doğrulanması için analizler sonucu tanımlanmış proteinlerin varlığının aksotl kuyruk kesitlerinde gösterilmesi amacıyla Hsp70/Hsc70, Laminin, Tubulin, Protein fosfataz 1 katalitik alt ünite beta ve alfa-smooth muscle aktin antikorları kullanılarak immunoflöresan boyamalar yapıldı. İmmunoflöresan boyama için aksotl proteinlerine özel antikorların olmaması sebebiyle insan ve fare antijenlerine yönlendirilen ticari antikorlar kullanıldı. Yapılan immunoflöresan boyamalar sonucu annotate edilen proteinlerin varlığını gösteren pozitif sonuçlar elde edildi.

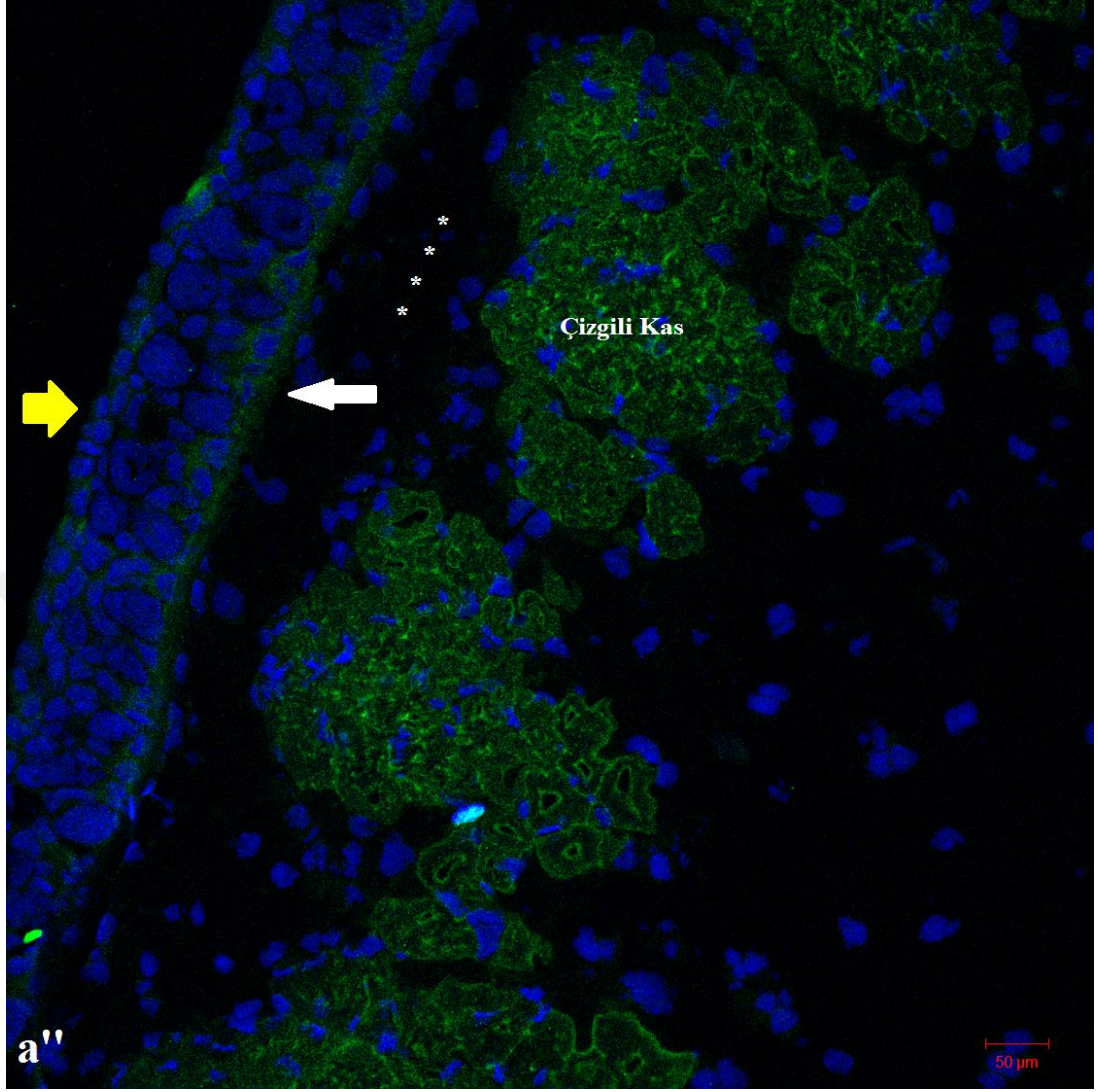


Resim 6.4.1. Aksolotl kuyruk Hsp70/Hsc70 immunoflöresan boyama. Kırmızı kutular içerisinde omurilik bölgesi(a') çizgili kas ve epidermal bölge(a'') gösterilmektedir. Dapi boyaması mavi renkte, antikör boyaması yeşil renkte boyanmıştır.

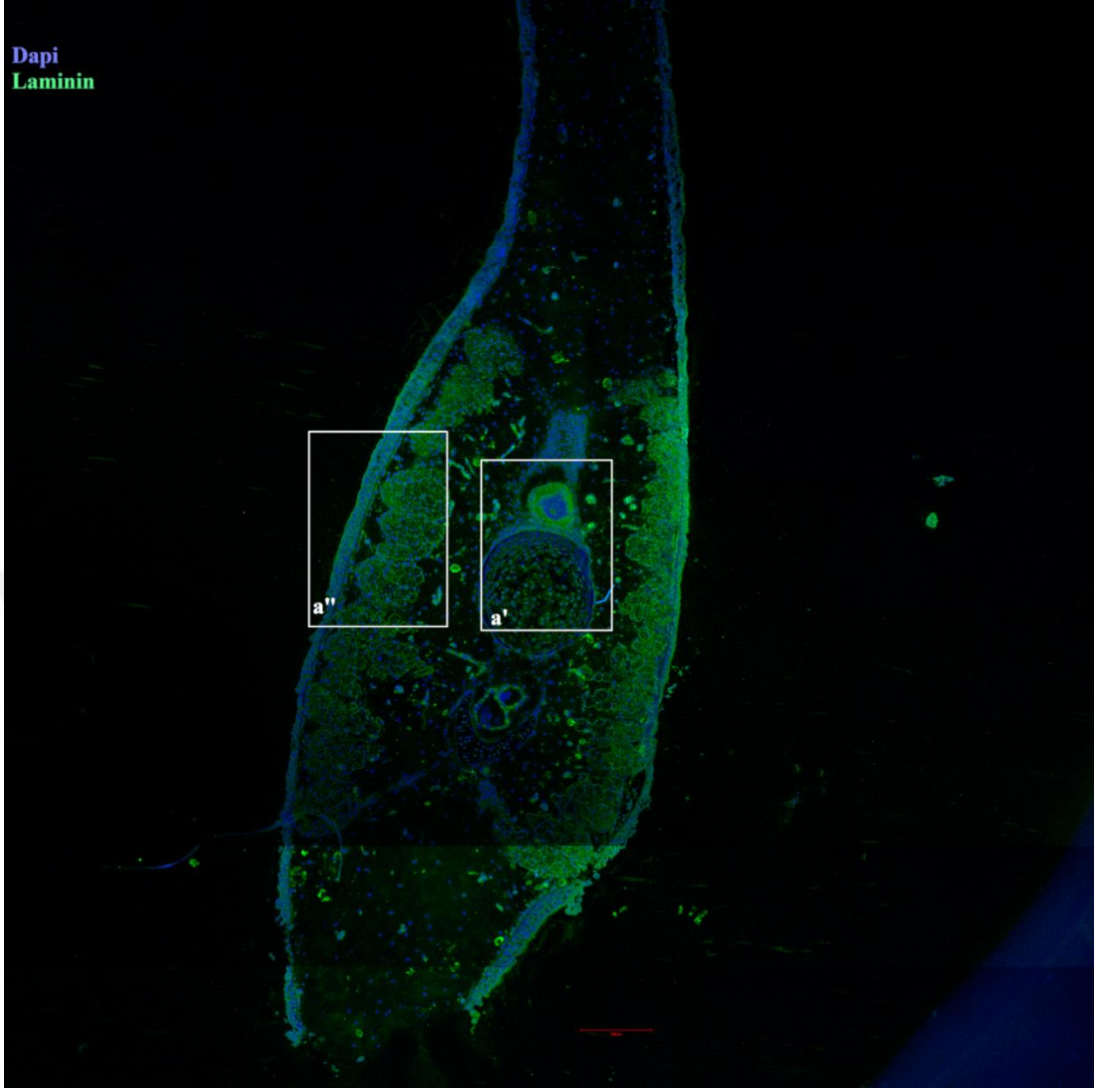


Resim 6.4.1.1.Aksolotl kuyruk Hsp70/Hsc70 immunoflöresan boyama omurilik bölgesi. Hsp70/Hsc70 omurilik perifer bölgesinde ok ile gösterilen glial hücrelerde tespit edilmiştir.

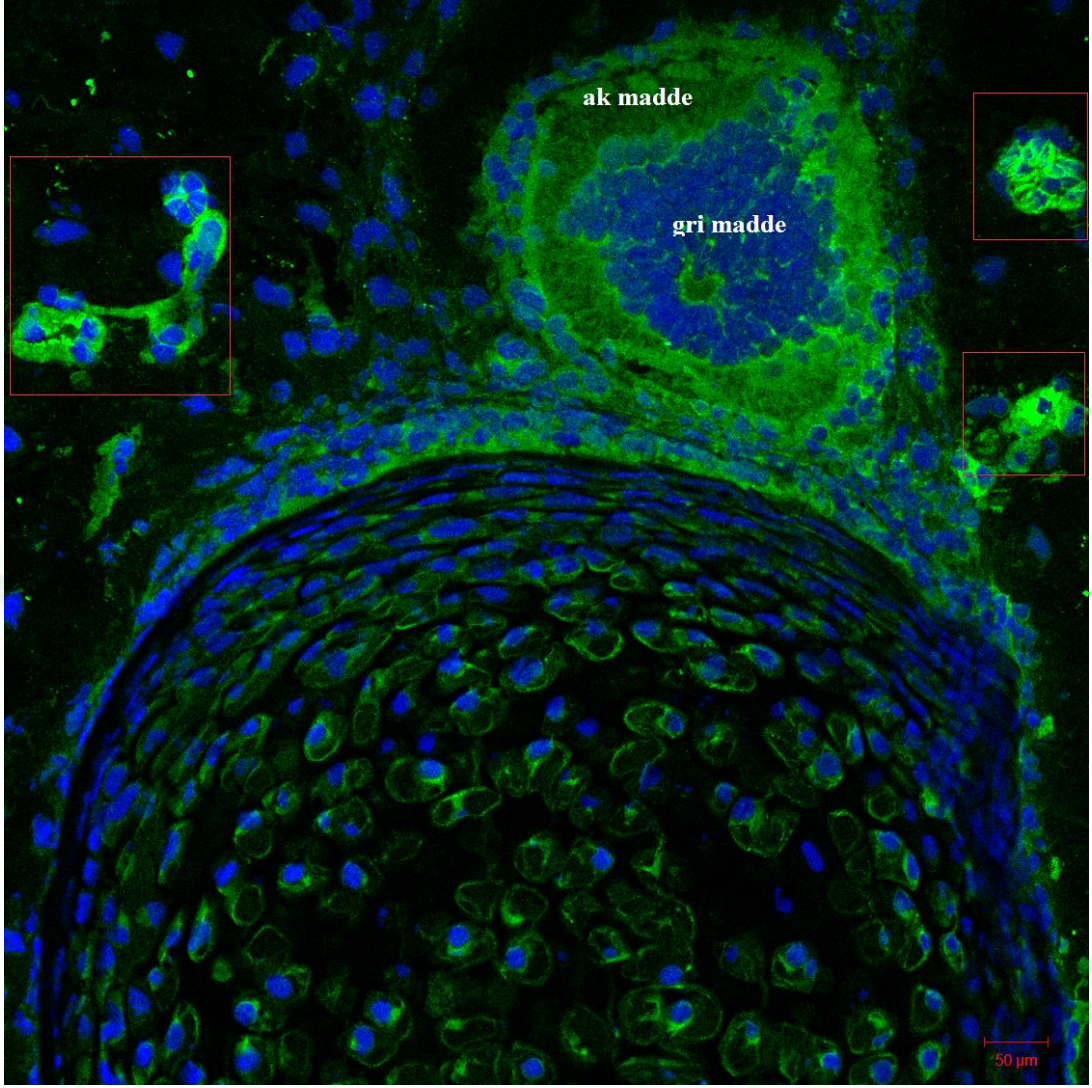




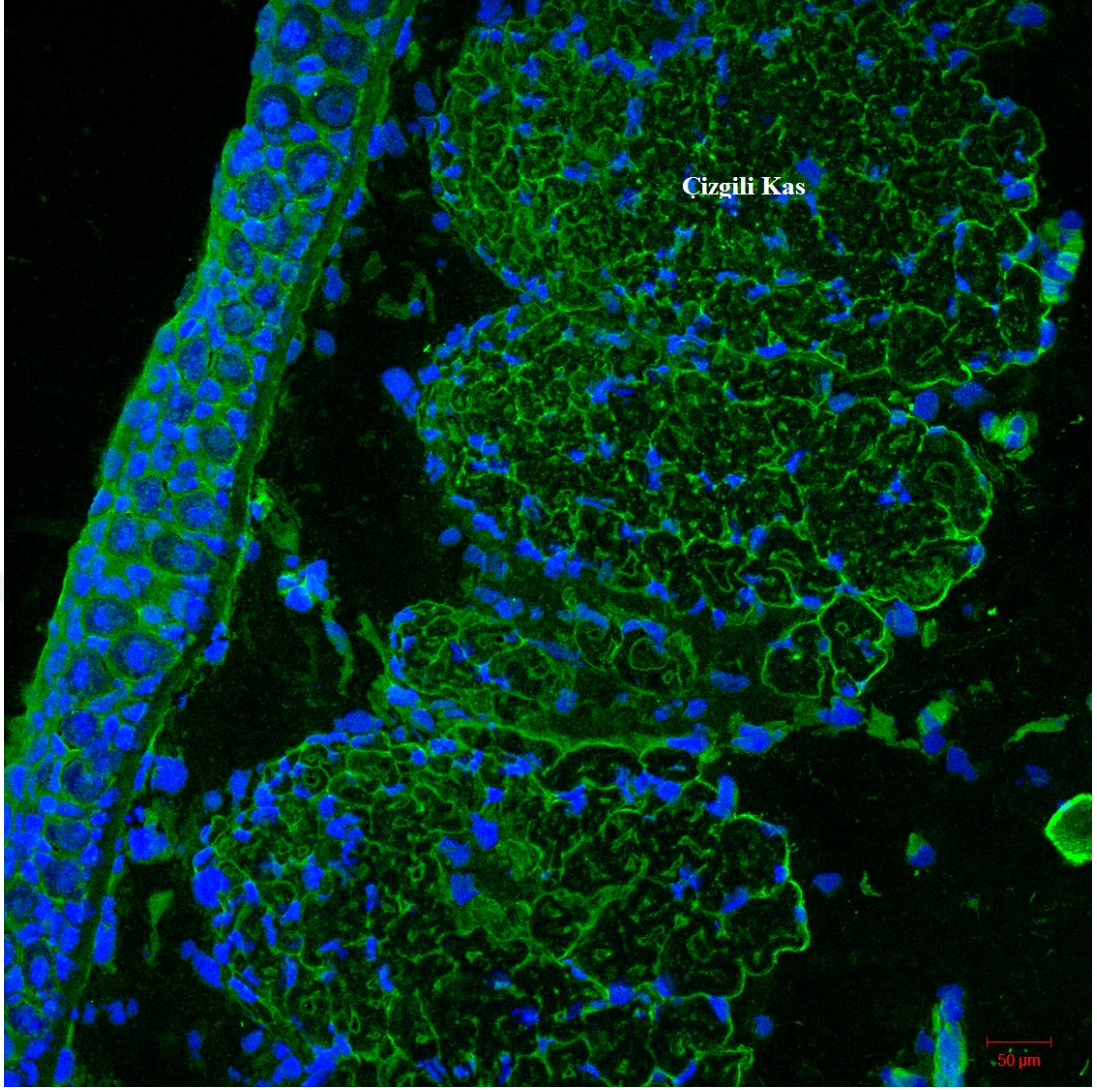
Resim 6.4.1.2.Aksolotl kuyruk Hsp70/Hsc70 immunoflöresan boyama epidermal bölge. Epidermal bazal bölgedeki silindirik hücrelerdeki Hsp70/Hsc70 ifadesi beyaz ok ile, keratinsiz epidermal hücrelerdeki Hsp70/Hsc70 ifadesi sarı ok ile, gevşek bağ dokudaki Hsp70/Hsc70 ifadesi \*\*\*\* ile gösterilmiştir. Çizgili kaslarda da Hsp70/Hsc70 ifadesi belirgin bir şekilde görülmektedir.



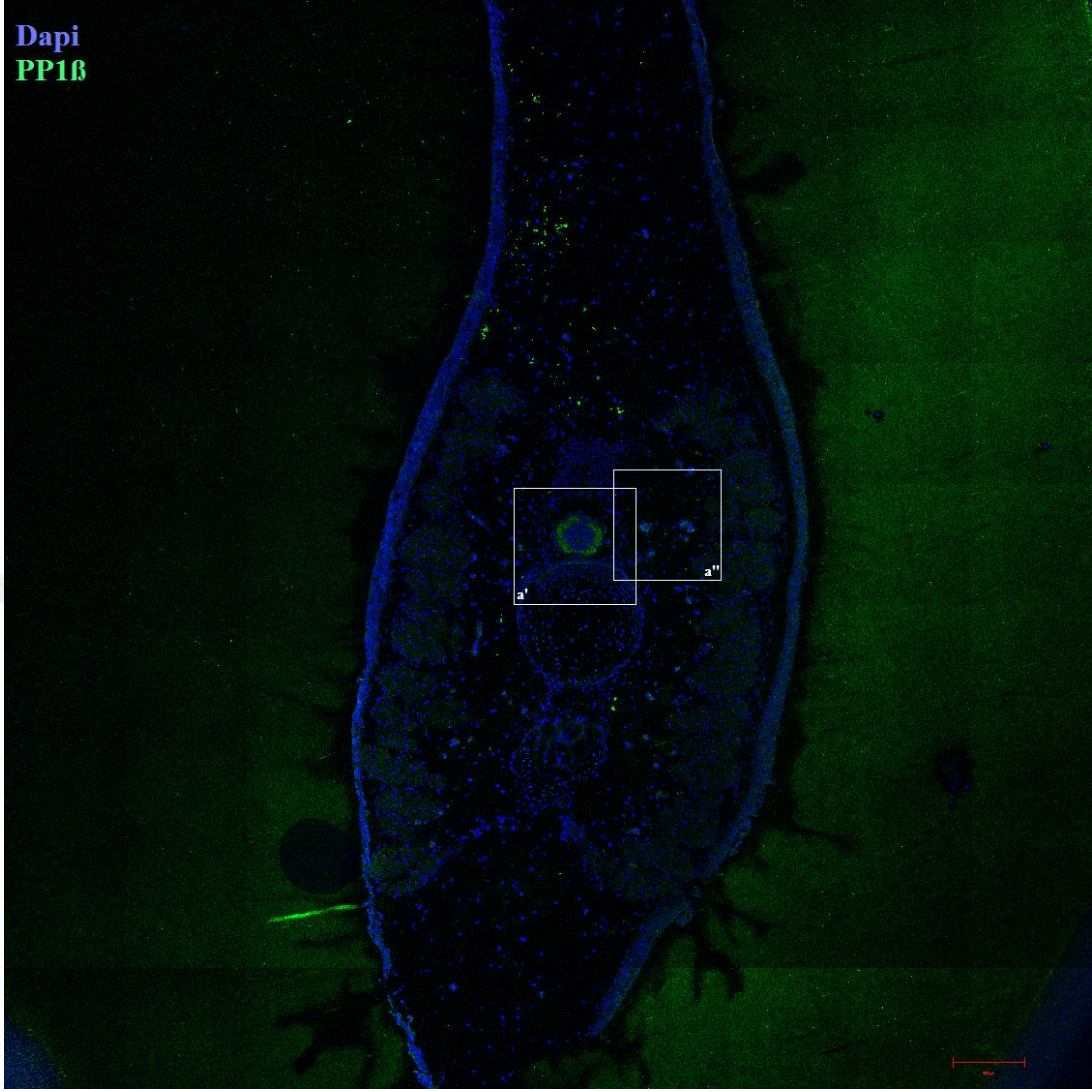
Resim 6.4.2.Aksolotl kuyruk Laminin immunoflöresan boyama. Beyaz kutular omurilik(a') ve epidermal katman hücreleri ve çizgili kas hücreleri(a'') göstermektedir. Dapi boyaması mavi renkte, antikor boyaması yeşil renkte boyanmıştır.



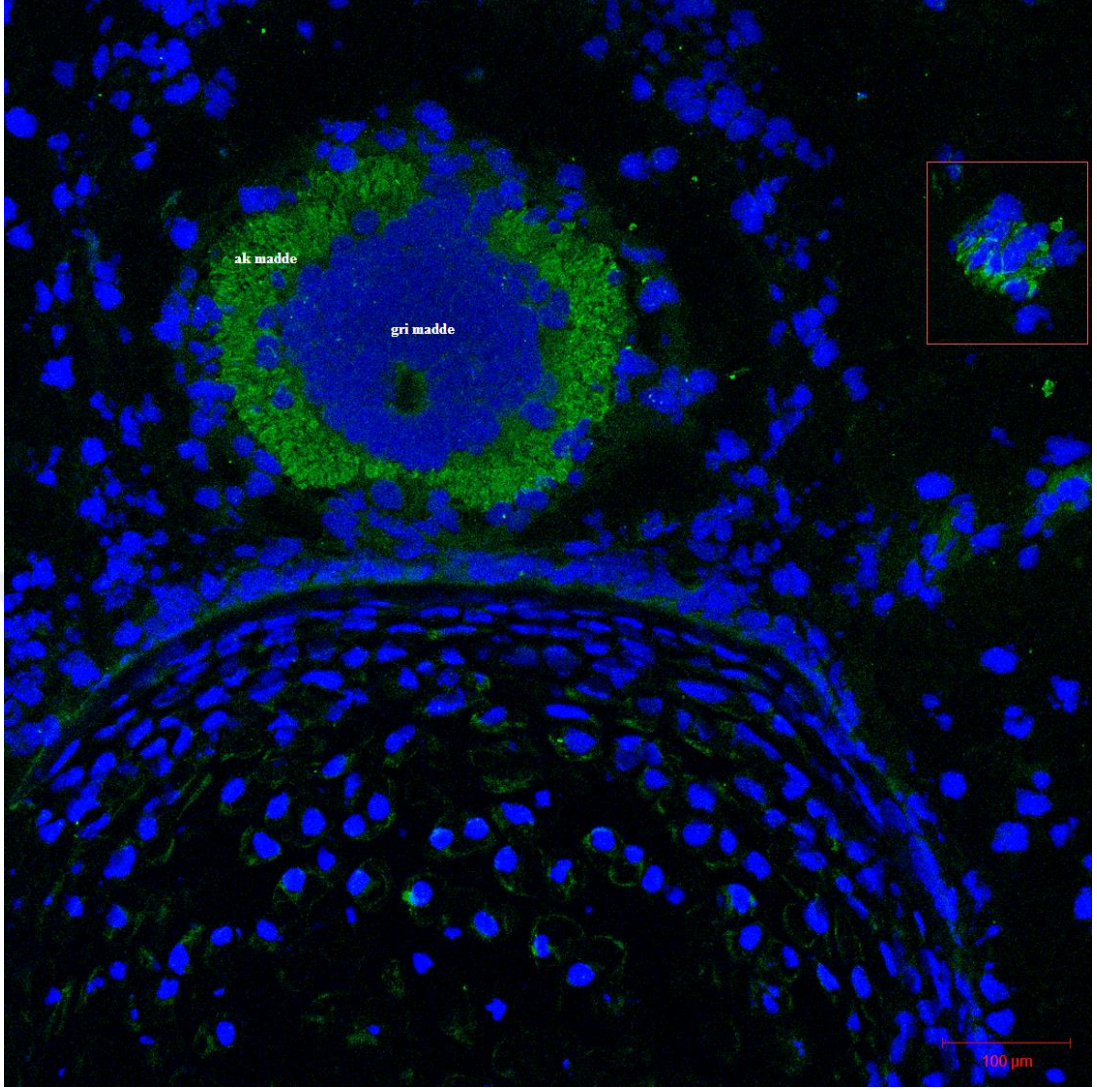
Resim 6.4.2.1. Akslotl kuyruk Laminin immunoflöresan boyama-omurilik. Laminin ifadesi omurilik beyaz maddede ve arka kök gangliyonlarda (kırmızı kutular) belirgin bir şekilde görülmektedir.



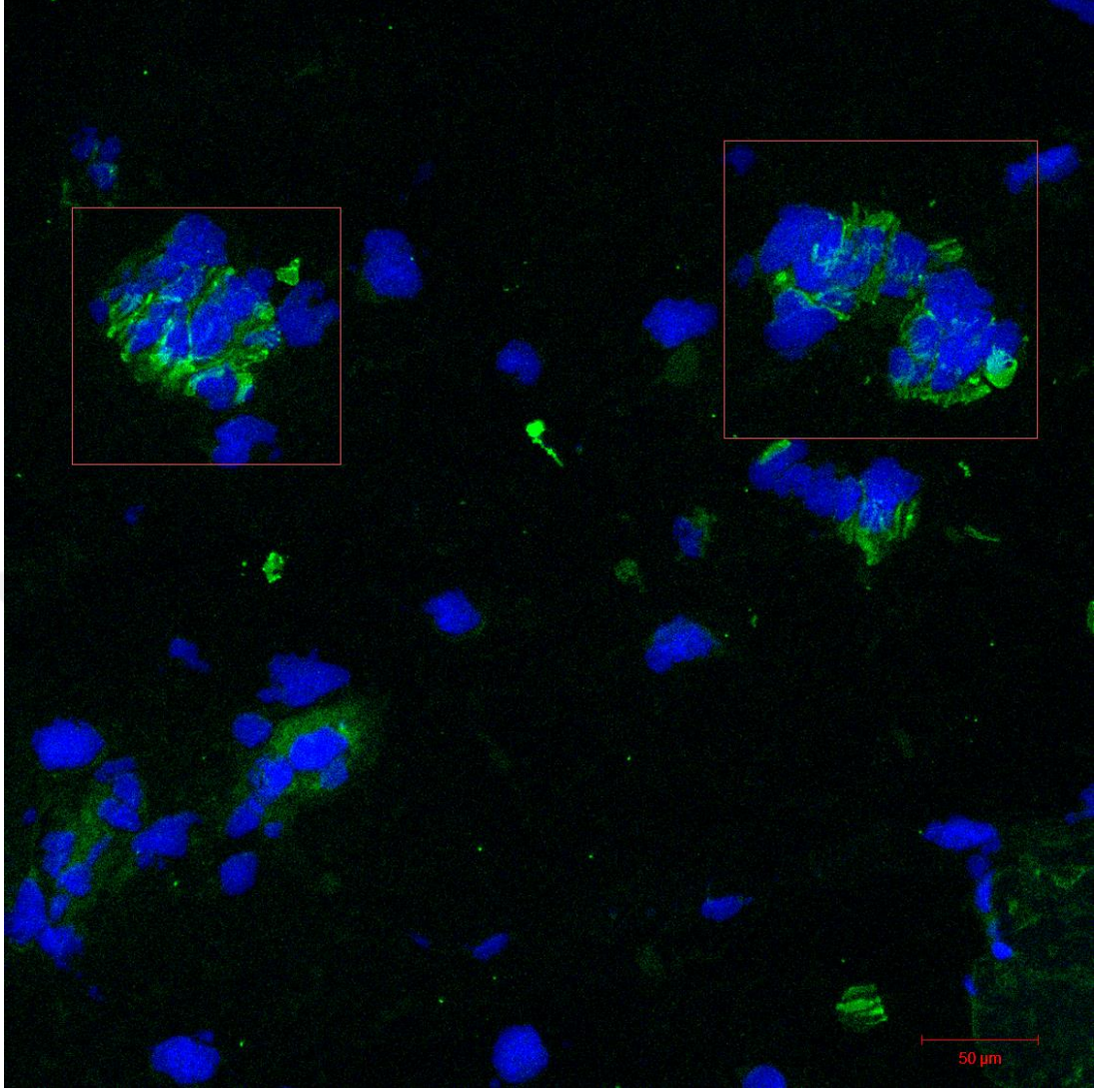
Resim 6.4.2.2. Aksolotl kuyruk Laminin immunoflöresan boyama-epidermis. Laminin ifadesi epidermal hücrelerde ve çizgili kaslarda belirgin bir şekilde görülmektedir.



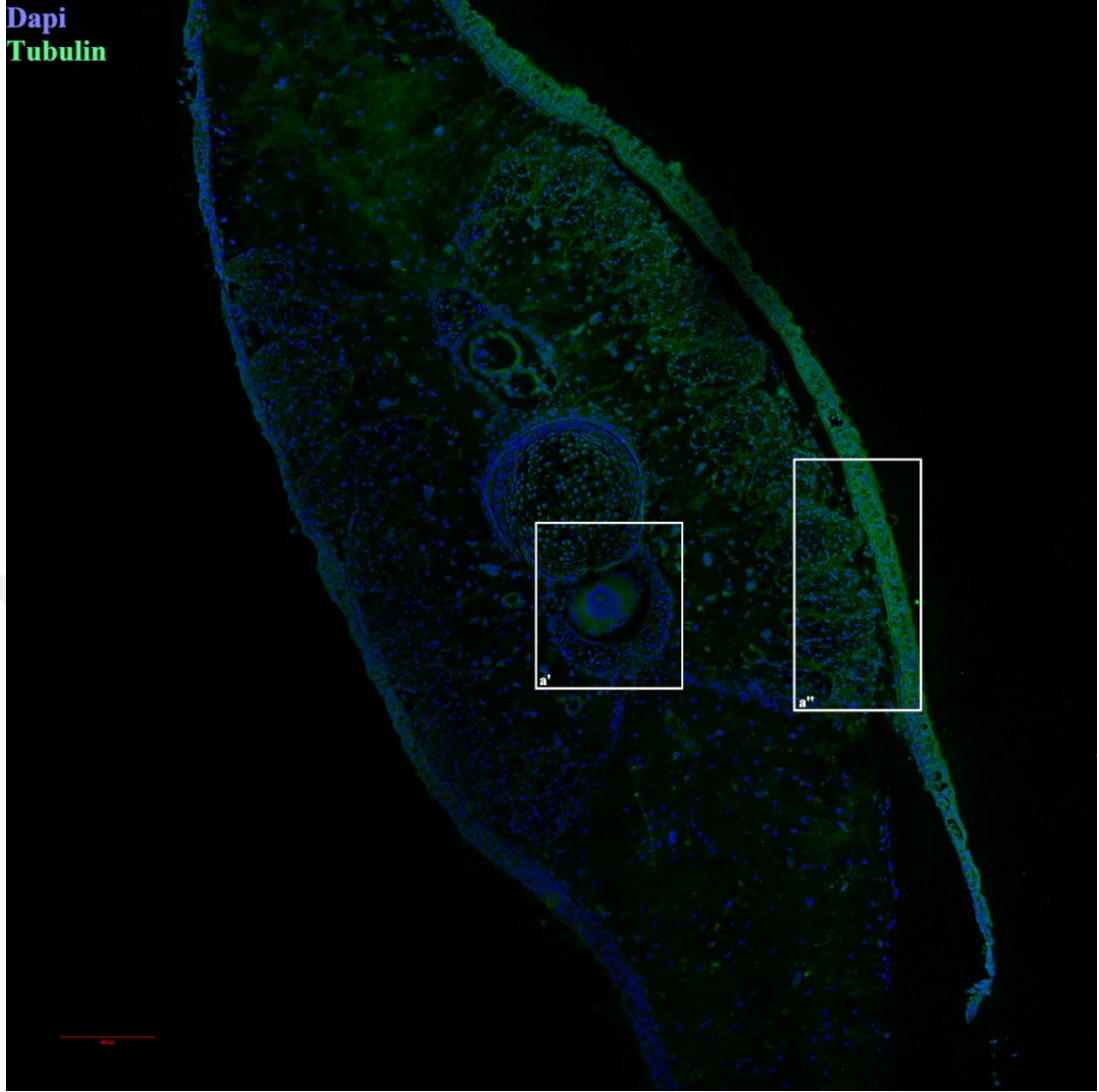
Resim 6.4.3. Akslotl kuyruk Protein fosfatase 1 katalitic subunit beta immunoflöresan boyama. PP1 $\beta$  ifadesi omurilik ak madde kısmında(a') ve sinir liflerinde(a'') görülmektedir. Dapi boyaması mavi renkte, antikor boyaması yeşil renkte görülmektedir.



Resim 6.4.3.1. Akslotl kuyruk PP1 $\beta$  omurilik immunoflöresan boyama. PP1 $\beta$  ifadesi omurilik ak madde bölgesinde net bir Şekilde görülmektedir.

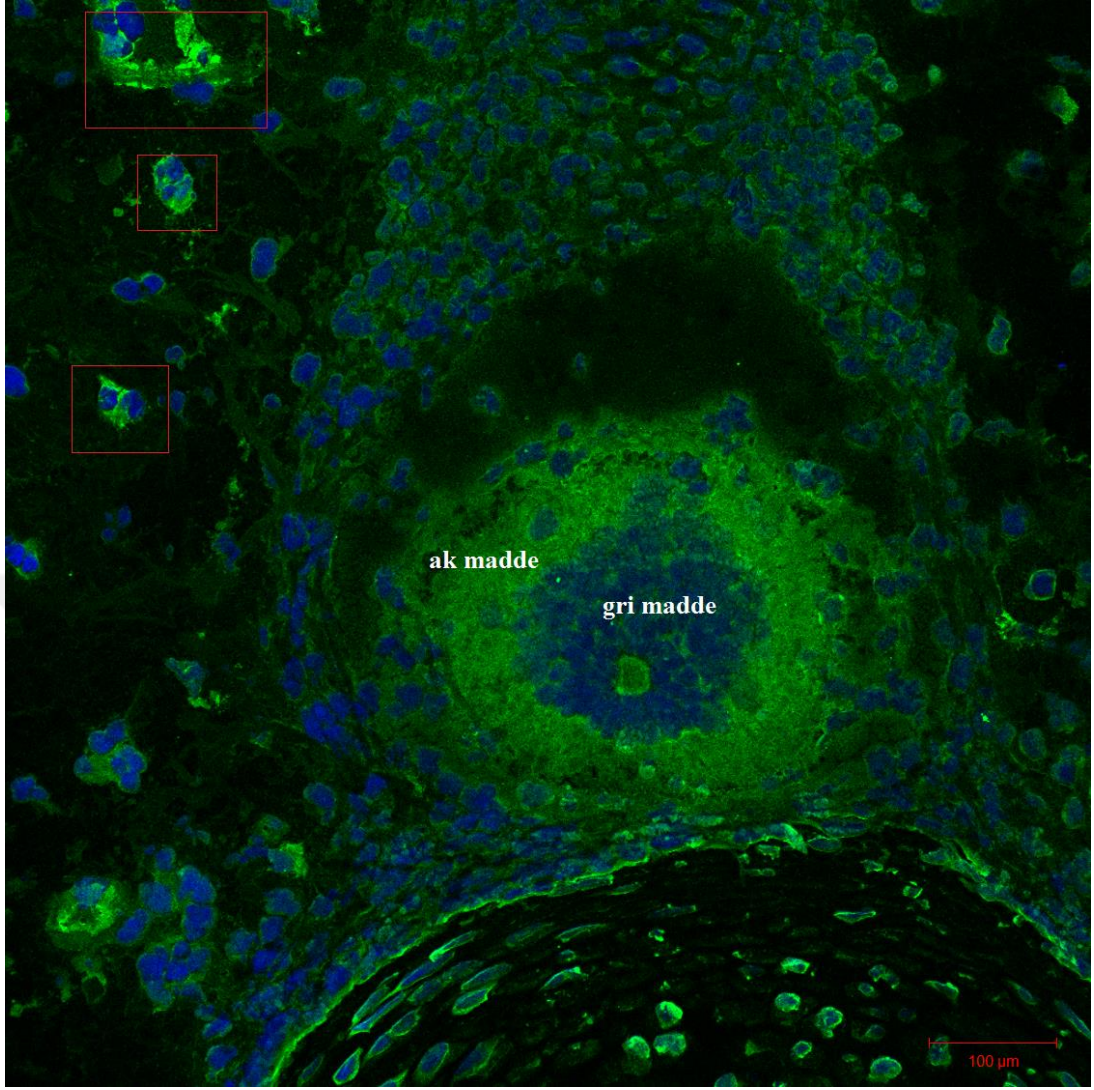


Resim 6.4.3.2. Aksolotl kuyruk PP1 $\beta$  sinir lifleri immunoflöresan boyama. PP1 $\beta$  ifadesi sinir liflerinde(kırmızı kutular) net bir şekilde görülmektedir.

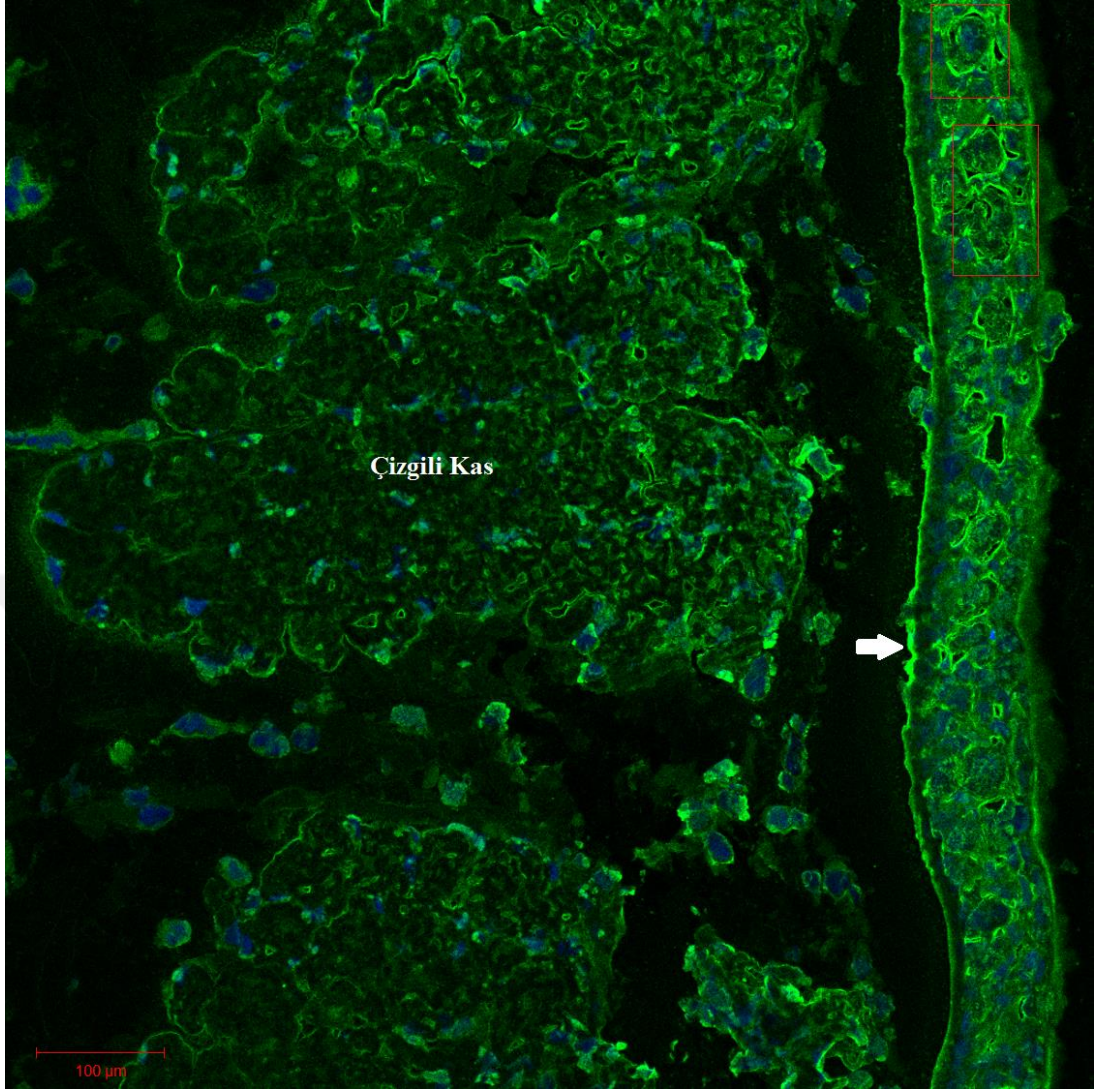


Resim 6.4.4.Aksolotl Tubulin immunoflöresan boyama. Tubulin ifadesi omurilik aksonal uzantılarında(a') ve çizgili kas lifleri, epidermis tabakasının bazal membranı ve epidermal leydig hücrelerinde görülmektedir.(a'') Dapi boyaması mavi renkte, antikor boyaması yeşil renkte görülmektedir.

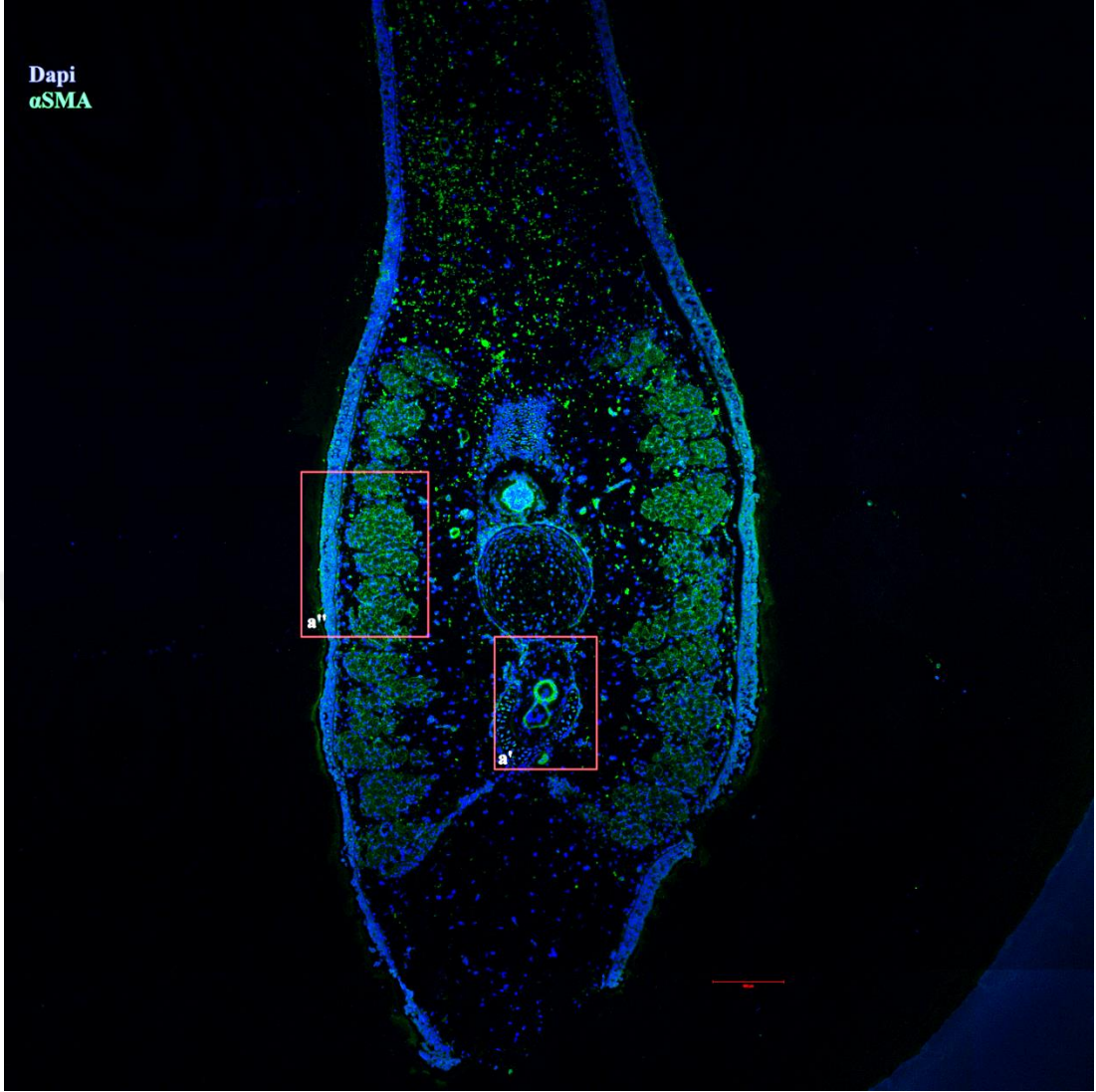




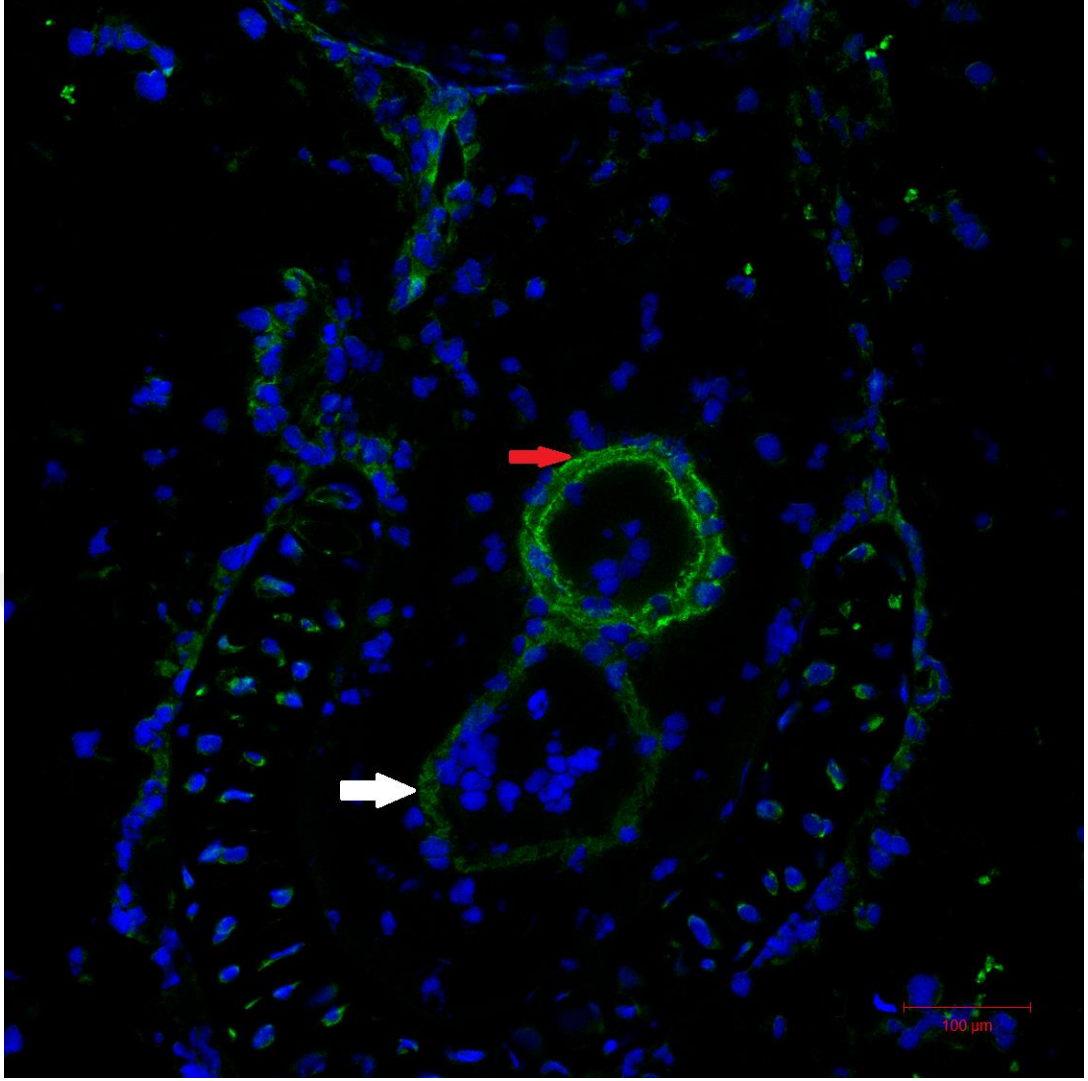
Resim 6.4.4.1. Aksolotl Tubulin immunoflöresan boyama omurilik. Tubulin ifadesi omurilik ak madde bölgesi ve aksonal uzantıları ile sinir liflerinde(kırmızı kutular) görülmektedir.



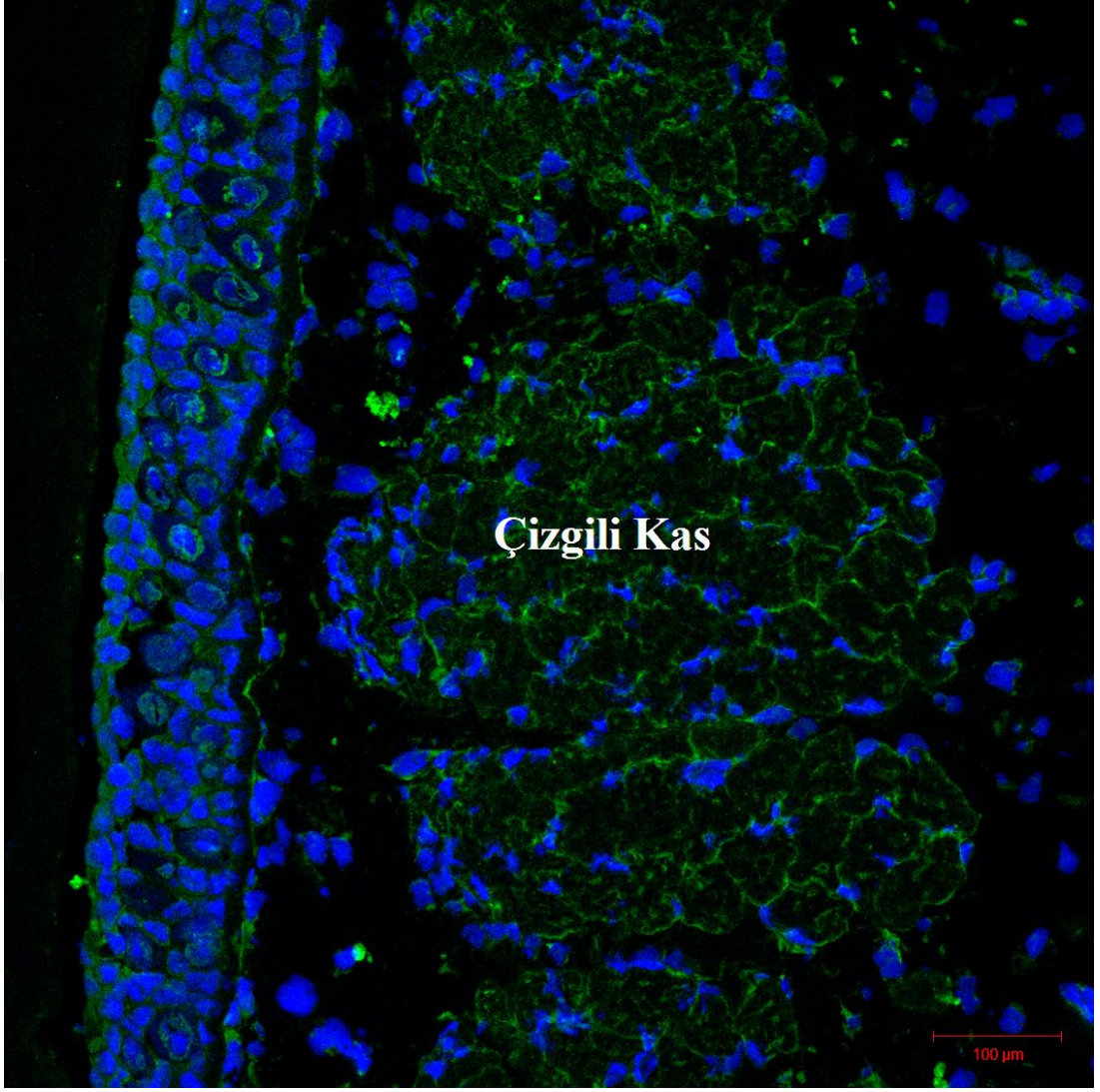
Resim 6.4.4.2. Akslotl Tubulin immunoflöresan boyama epidermal bölge. Tubulin ifadesi çizgili kaslarda, epidermal leydig hücrelerinde(kırmızı kutular) ve epidermis bazal membranda(beyaz ok) görülmektedir.



Resim 6.4.5.Aksolotl  $\alpha$ -Smooth Muscle Aktin( $\alpha$ SMA) boyama.  $\alpha$ SMA ifadesi atardamar duvarı ve toplardamar duvarında(a') ve çizgili kas hücrelerinde(a'') görülmektedir. Dapi boyaması mavi renkte, antikor boyaması yeşil renkte görülmektedir.



Resim 6.4.5.1.Akslotl  $\alpha$ -Smooth Muscle( $\alpha$ SMA) boyama.  $\alpha$ SMA ifadesi atardamar duvarı(kırmızı ok) ve toplardamar duvarında(beyaz ok) görülmektedir.



Resim 6.4.5. Akslotl  $\alpha$ -Smooth Muscle( $\alpha$ SMA) boyama.  $\alpha$ SMA ifadesi çizgili kas hücrelerinde görülmektedir.

## 7.TARTIŞMA

Analizlerden elde edilen verilere göre sinirsel görevler ile ilgili proteinlerden 16 kat ve üzeri bir artış değeri ile en yüksek ifadeye sahip olan Slit-3 proteinidir. Slit protein ailesi daha önce yapılan çalışmalarda gelişimsel süreçte akson yöneliminde(156) serebellar lezyonlar ve omurilik lezyonları sonrasında(157)rol aldıkları tespit edilmiştir. Yapılan psikiyatrik ve davranışsal bozukluk deneylerinde de Slit-3 duplikasyonunun majör depresif bozukluklara yatkınlığa neden olduğu gösterilmiştir.(158) Ancak yakın zamanda yapılan bir çalışmada aksonal yönelimde ana role sahip olduğu düşünülen Slit-3'ün kan damarlarının oluşumunda görevli yeni bir faktör olarak embriyonik gelişim sırasında organogenez'i yönettiği ve sinirsel gelişim açısından çok da önemli bir role sahip olmadığı vurgulanmıştır.(159) Çalışmamızın genel anlamda kuyruk yenilenmesinde rol alan proteinlerin tespiti olması sebebiyle Slit-3'ün organogenez sürecinde rol alması ve bu derece yüksek bir ifade ile elde edilmesi normal karşılanabilir. Lakin kuyruk yenilenmesini sadece damarlaşmanın ve doku oluşumunun olduğu bir süreç olarak değerlendirmek yanlış olacaktır. Çünkü içerdiği omurilik ve periferik sinirler yenilenmenin kusursuz bir şekilde gerçekleşmesi için gereklidir.(160) Bu sebeple de Slit-3 ifadesinin 16 kat artmış olması hem organogenezde hem de daha önce rol aldığı tespit edilen sinirsel gelişim ve yenilenmede görevli olması ile açıklanabilir. Sinirsel süreçlerde görevli olan ikinci en yüksek ifadeye sahip protein ise 7 kat artış gösteren NR4A2 diğer bir adı ile NURR1'dir NR4A2 geninin düşük düzeyde ifade edilmesi sonrası sinir sistemi gelişimi ve devamlılığında ve sinaptik süreçlerde rol alan genlerin ifadesinde azalma meydana geldiği gösterilmiştir.(111) Diğer bir in-vitro çalışmada da NR4A2'nin BMP2 aracılığı ile sinir kök hücrelerinin dopaminerjik sinir hücrelerine farklılaşma sürecinde yer aldığı bulgusu elde edilmiştir.(161) Ampütasyon sonrası gerçekleşen yenilenme süreci açısından NR4A2 ifadesi değerlendirildiğinde; sinirsel organizasyonun sağlanması, daha fazla sayıda sinaps yapılmasının gerekliliği ve kök hücrelerin sinir hücrelerine farklılaşmasının yoğun olması nedeniyle tutarlı bir sonuçtur. Sinirsel görev ile ilişkili olduğu tespit edilen proteinlerin üçüncüsü de 5 kat ifade artışına sahip olan KDM2B'dir. Bu protein lizin amino asidini özellikle demetile etmektedir. Histon metilasyonlarının transkripsiyonal düzenlenmede önemli olması sebebiyle KDM2B'nin ifade artışı canlılığın gelişimsel sürecinde, hücre

döngüsünün ayarlanmasında ve hücrelerinin farklılaşmasında söz sahibi olacaktır. Bu gen üzerinde yapılan araştırmalarda gen ifadesinde görülen azalmanın nöronal öncül hücrelerin ölümünün hızlandığı ve genden yoksun transgenik canlıların nöral tüp katlanması sürecini organize edemediği ve bu süreçte problem yaşadığı görülmüştür.(114) KDM2B'nin aksolotl kuyruk rejenerasyonunda gösterdiği ifade artışı canlının yenilenme sürecinde embriyonik profil göstermesi ve hücre döngüsü ile hücre farklılaşması için gerekli olan regülasyonların gerçekleşmesinde muhtemel bir durumdur. HOOK3 nöron öncülü hücrelerde yüksek miktarda ifadeye sahip olduğu bilinen diğer bir proteindir. Bu proteini ifade eden genin ifadesinin RNAi aracılığı ile azaltılması sonucu nöron öncülü hücrelerin hücre döngülerinden çıktığı ve nörogenez sürecinin zamanlamasının bozulduğu elde edilmiştir.(118) Çalışmamızda da bu proteine ait elde edilen ifade artışı nöron öncülü hücrelerin de bol miktarda rol alması ile anlamlı olarak açıklanabilir. DPSYL2 sinirsel polarite ve akson uzamasında rol alan Semaphorin3a(Sema3a) sinyalizasyonuna katılan protein ailesindedir. Bu proteinin ifadesindeki azalma omurilik motor nöronlarının anormal bir şekilde organize olmasına neden olurken fosforlanması ise bu nöronların doğru bir şekilde organize olmalarını sağlar.(124) Diğer bir çalışmada ise bu molekülün büyüyen aksonların distal kısımlarında yüksek miktarda olduğu gösterilmiştir.(123) Omurilik yenilenmesi süreci ile bu bulgular değerlendirildiğinde aksonal uzamanın ve aksonların organizasyonunun doğruluğu için hasar sonrası DPSYL2 proteininin ifadesinde artışın olması gerekmektedir. Analizlerimizde elde edilen 2 kat ve üzeri DPSYL2 ifade artışı çalışmamızın doğruluğunu desteklemektedir. Nükleer distribüsyon faktör E ortoloğu olan NDEL1 ifadesinin nöronal kök hücre hatlarındaki artışı sinir hücrelerine farklılaşmayı artırırken, astroglial farklılaşmayı azaltmaktadır.(138) NDEL1 ifadesinin de anlamlı düzeyde artış göstermesi omurilik yenilenmesi sürecinde astroglial hücrelerden daha çok sinir hücrelerinin gerekli olmasının sonucudur. EPHA7 sinir hücrelerinde sıklıkla dentridik kısımlarda bulunarak dentridik gelişimde rol almaktadır. Ayrıca sinaptik fonksiyonun olgunlaşması ve koordinasyonunu sağlamaktadır. Özel olarak kortikal sinir gelişimi sürecinde ifade edilmektedir.(141) HücreSEL enerjinin üretildiği NAD+ metabolik yolağının en önemli bileşenlerinden olan NAMPT proteini enerji üretimine bağlı olarak biyolojik saatin düzenlenmesi gibi süreçlerde rol almaktadır.(145) NAMPT

protein ifadesinin anlamlı düzeyde artışı biyolojik yakıt olarak görev aldığı şeklinde açıklanabilir. Yakın zamanda glioblastoma hücreleri kullanılarak yapılan bir çalışmada NAMPT ifadesinin artışı bu kanser hücrelerinin yaşamasına, çoğalmasına ve tümör miktarının artmasına neden olurken; ifadesini düşürülmesi sonucu kanser hücrelerinin çoğalma olmaksızın kendilerini yenileme aşamasında dahi güçlük çektiği gösterilmiştir.(162) Bu sonuçlar ele alındığında kök hücre faaliyetlerinin gerçekleştiği ortamda enerji ihtiyacının oluşu NAMPT ifadesinin normal değerinin biraz üzerinde olmasını açıklamaktadır. Bu süreçte aksolotl hücrelerinin memeli hücrelerine göre kanser oluşumuna yatkınlığının düşük olması sebebi ile kök hücrelerde kanserleşme görülmesi beklenmemektedir.

Glikoliz reaksiyonunun 6. basamağını katalizleyerek glikozun enerji ve karbon moleküllerine ayrışmasında rol oynayan GAPDH her hücrede aktif olarak bulunması gereken referans bir proteindir. Bu önemli görevinin dışında apoptotik süreçlerde, vesiküler taşınımında ve aksonal taşınımında da görevlidir.(163) Yakın zamandaki çalışmaya göre GAPDH aktivitesinin düşürülmesinin akson ve dendrit gelişimini etkileyerek kortikal nörogelişimde kritik bir role sahip olduğu gösterilmiştir.(155) GAPDH molekülünün proteomiks çalışmalarında gösterilebilmesi en muhtemel proteinler arasında olması sebebiyle çalışmanın doğruluğunu kanıtlamaktadır. Bağ dokuların temel bileşeni olan kollajenler hücreler arası matriks bölgesinin düzenlenmesi, sinir hücrelerin birbirileri ile sinirsel ağ ve bağlantı kurması, aksonal uzama ve sinaptik düzenlemede önemlidir.(132) Kollajen tiplerinden olan COL3A1, COL4A2, COL6A1, COL6A2 ve COL6A3 anlamlı düzeyde ifade artışına sahip proteinler olarak analiz edilmiştir. Analizlerimiz sonucu anlamlı düzeyde ifade artışına sahip olmasına rağmen henüz memeli canlılardaki fonksiyonu bilinmeyen bir protein elde edilmiştir. Meyve sinekleri ile yapılan bir çalışmada SYAP1 proteinin mutasyonunun kısa süreli sinaptik plastisitenin azalmasına ve davranışsal plastisite ile ilişkili bozukluklara neden olduğu gösterilmiştir.(144) Hem merkezi sinir sistemini hem de periferal sinir sistemini yenileyebilen aksolotl gibi bir canlıda SYAP1'in görevinin araştırılması omurgalı canlılardaki omurilik rejenerasyonun moleküler basamaklarının anlaşılması için gerekli görünmektedir.



Aksolotların sahip olduğu omurilik rejenerasyonu yeteneğinin uzun zamandır biliniyor olmasına rağmen memeli canlılardaki omurilik hasarlarına deva olacak çalışmalar nispeten az düzeyde kalmıştır. Yapmış olduğumuz çalışmada proteomik ve biyoinformatik kaynaklar kullanılarak doğal omurilik rejenerasyonunda rol alan proteinlerin moleküler ve hücresel yönleri küçük bir pencereden incelenmiştir. İleride yapılacak olan sadece omurilik odaklı proteom, genom ve metabolom çalışmaları pencereyi büyütecek, karmaşıklığın daha da anlaşılır bir hale gelmesini sağlayacaktır.



## 8.SONUÇ

Sinir kök hücreleri tüm omurgalıların omuriliğinde bulunur, ancak sadece semenderler bu hücreleri omurilik hasarlarını onarmak, tekrardan inşa etmek için etkili bir şekilde kullanabilmektedirler.(164) Su semenderlerinden olan aksolotlarda, kuyruk ampütasyonundan sonra, ampütasyon ucunda bulunan hücreler yeniden büyüyerek tamamen işlevsel bir omurilik oluşturur. Aksolotların sahip olduğu ekstremiteler yenilenmesi diğer deneysel canlı modellerinde de çalışılabilmesine rağmen, omurilik rejenerasyonu yapabilme açısından kendini omurgalı canlılar arasında eşsiz kılar.(105) Nadir rastlanan bu özelliğin altında yatan moleküler mekanizmalar, geçmiş yıllara göre ileri düzeyde gelişmiş teknolojik imkanların varlığına rağmen halen iyi anlaşılmamıştır. Daha önceki çalışmalarda, aksolotl omurilik yenilenmesinde yenilenen kök hücrelerin, embriyonik nöroepitelyal hücrelere benzer bir moleküler hale döndüğü ve fonksiyonel olarak hızlı bölünmelerin daha da arttığı gösterilmiştir.(165) Hücre çoğalmasının uzaysal ve zamansal analizini incelenmiş ve yenilenen omurilikteki yüksek hücre çoğalmasının gerçekleştiği bölge işaretlenerek rejenerasyonun posterior yönde ilerleyişi zaman içerisinde izlenmiştir. Bütün bu çalışmaların ortak sonucu olarak aksolotlarda rejeneratif omurilik yenilenmesindeki baş aktörler; hücre döngüsünün hız kazanması, kök hücrelerin aktivasyonu ve hücre akışı olarak göze çarpmaktadır.(160) Ancak hücresel sinyaller ve moleküler yolaklar hala aydınlatılmayı beklemektedir. Bu tez çalışmasında, aksolotl kuyruk yenilenmesinde görev alan proteinlerin proteomiks analizleri ile tespit edilmesi ve kuyruk yenilenmesi sürecinde omurilik yenilenmesinde de rol oynayan proteinlerin geniş bir pencereden ele alınarak detaylı bir şekilde incelenmesine olanak sağlayıp farklı hücresel mekanizmaların aksolotl omurilik yenilenmesine olan katkısı araştırılmıştır.

Çalışmada elde edilen sonuçlar ışığında sinir sisteminin gelişimsel süreçlerinde, aksonal yenilenmelerde, aksonal yönelimde, sinaptik geçişlerde, sirkadiyen ritimde, sinir hücrelerinin dallanmasında, aksonal taşınımında, sinirsel hücre göçünde, omurilik gelişiminde vb. görevlerde rol alan proteinler tespit edilmiştir. Yapılan çalışma neticesinde aksolotl proteom veritabanı artırılmış, canlıların blastema evresinin oluşumu ve sonrasını içeren günlere ait farklı ifade gösteren proteinler tanımlanmıştır. Çalışmanın geniş kapsamlı olup sadece omurilik yenilenmesine odaklanmayışı omurilik rejenerasyonu ile alakalı protein havuzuna ait bilgiyi tam olarak ifade edemese de yapılan gen ontoloji analizleri ile bu süreçte görev aldığı tanımlanan 36 tane proteinin varlığı bu çalışma öncesinde aksolotl proteom veritabanınının 309 tane(108) ile sınırlı olmasına kıyasla iyi bir neticedir. İleride sadece omurilik hasarına bağlı olarak yapılacak çalışmalar bu süreçte görevli bilinmeyen proteinlerin aydınlatılmasına olanak sağlayacak, gizeminin koruyan yenilenme sürecinin anlaşılması daha kolay bir hâl alacaktır.

## 9.KAYNAKLAR

1. Goss RJ (2013) Principles of regeneration (Elsevier).
2. Carlson BM (2007) Chapter 1 - An Introduction to Regeneration. Principles of Regenerative Biology, (Academic Press, Burlington), pp 1-29.
3. Sanchez Alvarado A (2000) Regeneration in the metazoans: why does it happen? *Bioessays* 22(6):578-590.
4. McCusker C & Gardiner DM (2011) The axolotl model for regeneration and aging research: a mini-review. *Gerontology* 57(6):565-571.
5. Zhao M & Li L (2015) Regulation of hematopoietic stem cells in the niche. *Sci China Life Sci* 58(12):1209-1215.
6. Franco C, et al. (2013) Understanding regeneration through proteomics. *Proteomics* 13(3-4):686-709.
7. Li C, Zhao H, Liu Z, & McMahon C (2014) Deer antler – A novel model for studying organ regeneration in mammals. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 56:111-122.
8. Michalopoulos GK (2013) Principles of liver regeneration and growth homeostasis. *Compr Physiol* 3(1):485-513.
9. Giangrande A & Licciano M (2014) Regeneration and clonality in Metazoa. The price to pay for evolving complexity. *Invertebrate Reproduction & Development* 58(1):1-8.
10. Morgan TH (1901) Regeneration and Liability to Injury. *Science* 14(346):235-248.
11. Gurtner GC, Werner S, Barrandon Y, & Longaker MT (2008) Wound repair and regeneration. *Nature* 453(7193):314-321.
12. McCusker C, Bryant SV, & Gardiner DM (2015) The axolotl limb blastema: cellular and molecular mechanisms driving blastema formation and limb regeneration in tetrapods. *Regeneration (Oxf)* 2(2):54-71.
13. Endo T, Bryant SV, & Gardiner DM (2004) A stepwise model system for limb regeneration. *Dev Biol* 270(1):135-145.
14. Dinsmore CE (2004) Urodele limb and tail regeneration in early biological thought: an essay on scientific controversy and social change. *International Journal of Developmental Biology* 40(4):621-627.
15. Yannas IV (2015) Tissue and organ regeneration in adults (Springer).

16. Torres M (2016) Regeneration: Limb regrowth takes two. *Nature* 533(7603):328-330.
17. Onishi K, Hollis E, & Zou Y (2014) Axon guidance and injury — lessons from Wnts and Wnt signaling. *Current Opinion in Neurobiology* 27:232-240.
18. Lambert C, Cisternas P, & Inestrosa NC (2016) Role of Wnt Signaling in Central Nervous System Injury. *Molecular Neurobiology* 53(4):2297-2311.
19. Salazar VS, Gamer LW, & Rosen V (2016) BMP signalling in skeletal development, disease and repair. *Nat Rev Endocrinol* 12(4):203-221.
20. Muneoka K & Sassoon D (1992) Molecular aspects of regeneration in developing vertebrate limbs. *Developmental Biology* 152(1):37-49.
21. Seifert A, Werheid DF, Knapp SM, & Tobiasch E (2015) Role of Hox genes in stem cell differentiation. *World journal of stem cells* 7(3):583.
22. Blum N & Begemann G (2013) The roles of endogenous retinoid signaling in organ and appendage regeneration. *Cellular and Molecular Life Sciences* 70(20):3907-3927.
23. Kato T, et al. (2003) Unique expression patterns of matrix metalloproteinases in regenerating newt limbs. *Developmental dynamics* 226(2):366-376.
24. Brockes JP & Kumar A (2002) Plasticity and reprogramming of differentiated cells in amphibian regeneration. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 3(8):566-574.
25. Kragl M, et al. (2009) Cells keep a memory of their tissue origin during axolotl limb regeneration. *Nature* 460(7251):60-65.
26. Wu C-H, Huang T-Y, Chen B-S, Chiou L-L, & Lee H-S (2015) Long-Duration Muscle Dedifferentiation during Limb Regeneration in Axolotls. *PLOS ONE* 10(2):e0116068.
27. Stocum DL (2011) The role of peripheral nerves in urodele limb regeneration. *European Journal of Neuroscience* 34(6):908-916.
28. Roy S & Gatién S (2008) Regeneration in axolotls: a model to aim for! *Exp Gerontol* 43(11):968-973.
29. Yokoyama H (2008) Initiation of limb regeneration: the critical steps for regenerative capacity. *Development, growth & differentiation* 50(1):13-22.
30. Tweedell KS (2010) The urodele limb regeneration blastema: the cell potential. *The Scientific World Journal* 10:954-971.

31. Rageh MA, et al. (2002) Vasculature in pre-blastema and nerve-dependent blastema stages of regenerating forelimbs of the adult newt, *Notophthalmus viridescens*. *Journal of Experimental Zoology* 292(3):255-266.
32. Ferris DR, et al. (2010) Ex vivo generation of a functional and regenerative wound epithelium from axolotl (*Ambystoma mexicanum*) skin. *Dev Growth Differ* 52(8):715-724.
33. Tanner K, et al. (2009) Coherent movement of cell layers during wound healing by image correlation spectroscopy. *Biophys J* 97(7):2098-2106.
34. Satoh A, Bryant SV, & Gardiner DM (2008) Regulation of dermal fibroblast dedifferentiation and redifferentiation during wound healing and limb regeneration in the Axolotl. *Dev Growth Differ* 50(9):743-754.
35. Satoh A, Makanae A, Hirata A, & Satou Y (2011) Blastema induction in aneurogenic state and Prrx-1 regulation by MMPs and FGFs in *Ambystoma mexicanum* limb regeneration. *Dev Biol* 355(2):263-274.
36. Brockes JP & Kumar A (2008) Comparative aspects of animal regeneration. *Annual review of cell and developmental biology* 24:525-549.
37. Lévesque M, et al. (2007) Transforming growth factor:  $\beta$  signaling is essential for limb regeneration in axolotls. *PloS one* 2(11):e1227.
38. Sun G & Irvine KD (2014) Control of growth during regeneration. *Curr Top Dev Biol* 108:95-120.
39. Yokoyama H, Ogino H, Stoick-Cooper CL, Grainger RM, & Moon RT (2007) Wnt/ $\beta$ -catenin signaling has an essential role in the initiation of limb regeneration. *Developmental Biology* 306(1):170-178.
40. Kawakami Y, et al. (2006) Wnt/ $\beta$ -catenin signaling regulates vertebrate limb regeneration. *Genes & development* 20(23):3232-3237.
41. Yokoyama H, Ide H, & Tamura K (2001) FGF-10 Stimulates Limb Regeneration Ability in *Xenopus laevis*. *Developmental Biology* 233(1):72-79.
42. Han MJ, An JY, & Kim WS (2001) Expression patterns of Fgf-8 during development and limb regeneration of the axolotl. *Developmental Dynamics* 220(1):40-48.
43. Christensen RN, Weinstein M, & Tassava RA (2002) Expression of fibroblast growth factors 4, 8, and 10 in limbs, flanks, and blastemas of *Ambystoma*. *Developmental dynamics* 223(2):193-203.

44. Voss SR, Epperlein HH, & Tanaka EM (2009) *Ambystoma mexicanum*, the axolotl: a versatile amphibian model for regeneration, development, and evolution studies. *Cold Spring Harb Protoc* 2009(8):pdb emo128.
45. Monaghan JR, et al. (2014) Experimentally induced metamorphosis in axolotls reduces regenerative rate and fidelity. *Regeneration* 1(1):2-14.
46. Newth DR (1960) BLACK AXOLOTL, AND WHITE. *American Scientist* 48(3):300-310.
47. Smith HM (1969) The Mexican Axolotl: Some Misconceptions and Problems. *BioScience* 19(7):593-615.
48. Cuvier G (1807) Recherches anatomiques sur les reptiles regardés encore comme douteux par les naturalistes, faites à l'occasion de l'Axolotl, rapporté par M. de Humboldt du Mexique; par FG Cuvier.
49. Duméril A (1854) Notice historique sur la ménagerie des reptiles du Muséum d'histoire naturelle et observations qui y ont été recueillies (imprimerie de J. Claye et Ce).
50. Reiß C, Olsson L, & HOBFELD U (2015) The history of the oldest self-sustaining laboratory animal: 150 years of axolotl research. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution* 324(5):393-404.
51. Duméril A (1865) Reproduction dans la ménagerie des reptiles au Muséum d'histoire naturelle, des axolotls, batraciens urodèles à branchies persistantes, de Mexico (*Siredon mexicanus* vel *Humboldtii*), qui n'avaient encore jamais été vus vivants en Europe (Gauthier-Villars).
52. Duméril A (1866) Observations sur la reproductions dans la ménagerie des reptiles du Muséum d'Histoire naturelle, des axolotls, batraciens urodelesa branchies extérieures du Mexique, sur leur développement et sur leur métamorphoses. *Nouvelles archives du Muséum d'Histoire naturelle* 2:265-292.
53. Duméril A (1865) Nouvelles observations sur les axolotls, batraciens urodèles de Mexico (*Siredon mexicanus* vel *Humboldtii*), nés dans la ménagerie des reptiles au Muséum d'histoire naturelle, et qui y subissent des métamorphoses, par M. Aug. Duméril (Gauthier-Villars).
54. von Chauvin M (1876) Ueber die Verwandlung der mexicanischen Axolotl in *Amblystoma* (Akad. Verlag-Ges.).
55. Laufberger V (1913) O vzbuzeni metamorfosy axolotlu kremin zlazou stitou. *Biol Listy* 2:228-241.

56. Duméril A (1866) On the development of the Axolotl (*Siredon mexicanus* vel *Humboldtii*). *Journal of Natural History* 17(98):156-157.
57. Gresens J (2004) An introduction to the Mexican Axolotl (*Ambystoma mexicanum*). *Lab Animal* 33(9):41-47.
58. Page RB & Voss SR (2009) Induction of metamorphosis in axolotls (*Ambystoma mexicanum*). *Cold Spring Harb Protoc* 2009(8):pdb prot5268.
59. Farkas JE & Monaghan JR (2015) Housing and Maintenance of *Ambystoma mexicanum*, the Mexican Axolotl. *Salamanders in Regeneration Research: Methods and Protocols*:27-46.
60. Wakimoto BT (1979) DNA synthesis after polyspermic fertilization in the axolotl. *J Embryol Exp Morphol* 52:39-48.
61. Armstrong JB & Malacinski GM (1989) *Developmental biology of the axolotl* (Oxford University Press).
62. Erginel-Unaltuna N, Dube DK, Robertson DR, & Lemanski LF (1995) In vivo protein synthesis in developing hearts of normal and cardiac mutant axolotls (*Ambystoma mexicanum*). *Cell Mol Biol Res* 41(3):181-187.
63. Lopez D, et al. (2014) Mapping hematopoiesis in a fully regenerative vertebrate: the axolotl. *Blood* 124(8):1232-1241.
64. Whitford WG & Sherman RE (1968) Aerial and aquatic respiration in axolotl and transformed *Ambystoma tigrinum*. *Herpetologica* 24(3):233-237.
65. Ching Y-C & Wedgwood RJ (1967) Immunologic responses in the axolotl, *Siredon mexicanum*. *The Journal of Immunology* 99(1):191-200.
66. Charlemagne J (1979) Thymus independent anti-horse erythrocyte antibody response and suppressor T cells in the Mexican axolotl (*Amphibia, Urodela, ambystoma mexicanum*). *Immunology* 36(4):643.
67. Sessions SK, Gardiner DM, & Bryant SV (1989) Compatible limb patterning mechanisms in urodeles and anurans. *Developmental biology* 131(2):294-301.
68. Sobkow L, Epperlein HH, Herklotz S, Straube WL, & Tanaka EM (2006) A germline GFP transgenic axolotl and its use to track cell fate: dual origin of the fin mesenchyme during development and the fate of blood cells during regeneration. *Dev Biol* 290(2):386-397.
69. Froese JM, Smits JE, & Wickstrom ML (2005) Evaluation of two methods for measuring nonspecific immunity in tiger salamanders (*Ambystoma tigrinum*). *J Wildl Dis* 41(1):209-217.

70. Cotter JD, Storfer A, Page RB, Beachy CK, & Voss SR (2008) Transcriptional response of Mexican axolotls to *Ambystoma tigrinum* virus (ATV) infection. *BMC Genomics* 9:493.
71. Godwin JW, Pinto AR, & Rosenthal NA (2013) Macrophages are required for adult salamander limb regeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110(23):9415-9420.
72. Tsonis PA & Eguchi G (1981) Carcinogens on regeneration. Effects of N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine and 4-nitroquinoline-1-oxide on limb regeneration in adult newts. *Differentiation* 20(1):52-60.
73. Shioda C, Uchida K, & Nakayama H (2011) Pathological features of olfactory neuroblastoma in an axolotl (*Ambystoma mexicanum*). *J Vet Med Sci* 73(8):1109-1111.
74. Jarial MS (1989) Fine structure of the epidermal Leydig cells in the axolotl *Ambystoma mexicanum* in relation to their function. *J Anat* 167:95-102.
75. Seifert AW, Monaghan JR, Voss SR, & Maden M (2012) Skin regeneration in adult axolotls: a blueprint for scar-free healing in vertebrates. *PLoS One* 7(4):e32875.
76. Stirling RV & Brandle K (1982) Expansion of the visual projection to the tectum of axolotls during metamorphosis. *Brain Res* 281(3):343-345.
77. Roy S & Levesque M (2006) Limb regeneration in axolotl: is it superhealing? *ScientificWorldJournal* 6 Suppl 1:12-25.
78. Richter W (1968) [Regenerative processes following removal of the caudal sector of the telencephalon including the telencephalo-diencephalic border region in *Ambystoma mexicanum*]. *J Hirnforsch* 10(6):515-534.
79. Maden M, Manwell LA, & Ormerod BK (2013) Proliferation zones in the axolotl brain and regeneration of the telencephalon. *Neural Dev* 8:1.
80. Parish CL, Beljajeva A, Arenas E, & Simon A (2007) Midbrain dopaminergic neurogenesis and behavioural recovery in a salamander lesion-induced regeneration model. *Development* 134(15):2881-2887.
81. Spallanzani L (1768) *Prodromo di un'opera da imprimersi sopra le riproduzioni animali* (Nella Stamperia di Giovanni Montanari).
82. Kragl M & Tanaka EM (2009) Axolotl (*Ambystoma mexicanum*) limb and tail amputation. *Cold Spring Harb Protoc* 2009(8):pdb prot5267.



83. Monaghan JR, et al. (2007) Early gene expression during natural spinal cord regeneration in the salamander *Ambystoma mexicanum*. *J Neurochem* 101(1):27-40.
84. Mchedlishvili L, Epperlein HH, Telzerow A, & Tanaka EM (2007) A clonal analysis of neural progenitors during axolotl spinal cord regeneration reveals evidence for both spatially restricted and multipotent progenitors. *Development* 134(11):2083-2093.
85. O'Hara CM, Egar MW, & Chernoff EA (1992) Reorganization of the ependyma during axolotl spinal cord regeneration: changes in intermediate filament and fibronectin expression. *Developmental dynamics* 193(2):103-115.
86. Arsanto JP, et al. (1992) Formation of the peripheral nervous system during tail regeneration in urodele amphibians: ultrastructural and immunohistochemical studies of the origin of the cells. *Journal of Experimental Zoology* 264(3):273-292.
87. Pevsner J (2015) *Bioinformatics and functional genomics* (John Wiley & Sons).
88. Hardison RC (2003) Comparative genomics. *PLoS Biol* 1(2):e58.
89. Marco D (2011) *Metagenomics: current innovations and future trends* (Horizon Scientific Press).
90. Johannes F, Colot V, & Jansen RC (2008) Epigenome dynamics: a quantitative genetics perspective. *Nature Reviews Genetics* 9(11):883-890.
91. Johnson JA (2013) Pharmacogenetics in clinical practice: how far have we come and where are we going? *Pharmacogenomics* 14(7):835-843.
92. Jordan KW, et al. (2009) Metabolomic characterization of human rectal adenocarcinoma with intact tissue magnetic resonance spectroscopy. *Diseases of the colon and rectum* 52(3):520.
93. Twyman R (2004) *Principles of Proteomics*. Abingdon and New York: Garland Science. (BIOS Scientific Publishers).
94. Buckingham S (2003) The major world of microRNAs. *Nature* 4.
95. Dhingra V, Gupta M, Andacht T, & Fu ZF (2005) New frontiers in proteomics research: a perspective. *International journal of pharmaceuticals* 299(1):1-18.
96. Weston AD & Hood L (2004) Systems biology, proteomics, and the future of health care: toward predictive, preventative, and personalized medicine. *Journal of proteome research* 3(2):179-196.

97. Steen H & Mann M (2004) The ABC's (and XYZ's) of peptide sequencing. *Nature reviews Molecular cell biology* 5(9):699-711.
98. Blackstock WP & Weir MP (1999) Proteomics: quantitative and physical mapping of cellular proteins. *Trends in biotechnology* 17(3):121-127.
99. Ouzounis CA, Coulson RM, Enright AJ, Kunin V, & Pereira-Leal JB (2003) Classification schemes for protein structure and function. *Nature Reviews Genetics* 4(7):508-519.
100. Ashburner M, et al. (2000) Gene Ontology: tool for the unification of biology. *Nature genetics* 25(1):25-29.
101. Thomas PD, et al. (2003) PANTHER: a library of protein families and subfamilies indexed by function. *Genome research* 13(9):2129-2141.
102. Tang Z, et al. (2014) mTor is a signaling hub in cell survival: a mass-spectrometry-based proteomics investigation. *J Proteome Res* 13(5):2433-2444.
103. Wisniewski JR, Zougman A, Nagaraj N, & Mann M (2009) Universal sample preparation method for proteome analysis. *Nature methods* 6(5):359.
104. Echeverri K & Tanaka EM (2002) Ectoderm to mesoderm lineage switching during axolotl tail regeneration. *Science* 298(5600):1993-1996.
105. Mchedlishvili L, et al. (2012) Reconstitution of the central and peripheral nervous system during salamander tail regeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109(34):E2258-E2266.
106. Simon A & Tanaka EM (2013) Limb regeneration. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology* 2(2):291-300.
107. Jhamb D, et al. (2011) Network based transcription factor analysis of regenerating axolotl limbs. *BMC bioinformatics* 12(1):1.
108. Rao N, et al. (2009) Proteomic analysis of blastema formation in regenerating axolotl limbs. *BMC biology* 7(1):1.
109. Haçarız O, et al. (2014) Generating a detailed protein profile of *Fasciola hepatica* during the chronic stage of infection in cattle. *Proteomics* 14(12):1519-1530.
110. Lin L & Isacson O (2006) Axonal growth regulation of fetal and embryonic stem cell-derived dopaminergic neurons by Netrin-1 and Slits. *Stem Cells* 24(11):2504-2513.

111. Sleiman P, et al. (2009) Characterisation of a novel NR4A2 mutation in Parkinson's disease brain. *Neuroscience letters* 457(2):75-79.
112. Arenas E (2014) Wnt signaling in midbrain dopaminergic neuron development and regenerative medicine for Parkinson's disease. *Journal of molecular cell biology* 6(1):42-53.
113. Andricovich J, Kai Y, Peng W, Foudi A, & Tzatsos A (2016) Histone demethylase KDM2B regulates lineage commitment in normal and malignant hematopoiesis. *The Journal of clinical investigation* 126(3):905.
114. Fukuda T, Tokunaga A, Sakamoto R, & Yoshida N (2011) Fbxl10/Kdm2b deficiency accelerates neural progenitor cell death and leads to exencephaly. *Molecular and Cellular Neuroscience* 46(3):614-624.
115. Anholt R (2014) Olfactomedin proteins: central players in development and disease. *Frontiers in cell and developmental biology* 2:6.
116. Nakaya N, Lee H-S, Takada Y, Tzchori I, & Tomarev SI (2008) Zebrafish olfactomedin 1 regulates retinal axon elongation in vivo and is a modulator of Wnt signaling pathway. *The Journal of Neuroscience* 28(31):7900-7910.
117. Kyrkanides S, et al. (2012) Conditional expression of human  $\beta$ -hexosaminidase in the neurons of Sandhoff disease rescues mice from neurodegeneration but not neuroinflammation. *Journal of neuroinflammation* 9(1):1.
118. Ge X, Frank CL, de Anda FC, & Tsai L-H (2010) Hook3 interacts with PCM1 to regulate pericentriolar material assembly and the timing of neurogenesis. *Neuron* 65(2):191-203.
119. Goh KL, Cai L, Cepko CL, & Gertler FB (2002) Ena/VASP proteins regulate cortical neuronal positioning. *Current biology* 12(7):565-569.
120. West RJ, Lu Y, Marie B, Gao F-B, & Sweeney ST (2015) Rab8, POSH, and TAK1 regulate synaptic growth in a *Drosophila* model of frontotemporal dementia. *The Journal of cell biology* 208(7):931-947.
121. Bucci C, Alifano P, & Cogli L (2014) The role of rab proteins in neuronal cells and in the trafficking of neurotrophin receptors. *Membranes* 4(4):642-677.
122. Lee HJ, Lee K, & Im H (2012)  $\alpha$ -Synuclein modulates neurite outgrowth by interacting with SPTBN1. *Biochemical and biophysical research communications* 424(3):497-502.

123. Christie TL, Starovic-Subota O, & Childs S (2006) Zebrafish collapsin response mediator protein (CRMP)-2 is expressed in developing neurons. *Gene expression patterns* 6(2):193-200.
124. Morimura R, Nozawa K, Tanaka H, & Ohshima T (2013) Phosphorylation of Dpsyl2 (CRMP2) and Dpsyl3 (CRMP4) is required for positioning of caudal primary motor neurons in the zebrafish spinal cord. *Developmental neurobiology* 73(12):911-920.
125. Caubit X, et al. (2004) Tenascin expression in developing, adult and regenerating caudal spinal cord in the urodele amphibians. *International Journal of Developmental Biology* 38(4):661-672.
126. Lewis KE, et al. (2014) Microglia and motor neurons during disease progression in the SOD1 G93A mouse model of amyotrophic lateral sclerosis: changes in arginase1 and inducible nitric oxide synthase. *Journal of neuroinflammation* 11(1):1.
127. Park BS, Jo HW, & Jung J (2015) Expression profile of aminoacyl-tRNA synthetases in dorsal root ganglion neurons after peripheral nerve injury. *Journal of molecular histology* 46(1):115-122.
128. McLaughlin HM, et al. (2012) A recurrent loss-of-function alanyl-tRNA synthetase (AARS) mutation in patients with Charcot-Marie-Tooth disease type 2N (CMT2N). *Human mutation* 33(1):244-253.
129. Kim J-M, et al. (2011) SNPs in axon guidance pathway genes and susceptibility for Parkinson's disease in the Korean population. *Journal of human genetics* 56(2):125-129.
130. Trifilo MJ, et al. (2008) Scrapie-induced defects in learning and memory of transgenic mice expressing anchorless prion protein are associated with alterations in the gamma aminobutyric acid-ergic pathway. *Journal of virology* 82(20):9890-9899.
131. Hancock ML, Preitner N, Quan J, & Flanagan JG (2014) MicroRNA-132 is enriched in developing axons, locally regulates *Rasa1* mRNA, and promotes axon extension. *The Journal of Neuroscience* 34(1):66-78.
132. Fox MA (2008) Novel roles for collagens in wiring the vertebrate nervous system. *Current opinion in cell biology* 20(5):508-513.
133. Agthong S, Kaewsema A, Tanomsridejchai N, & Chentanez V (2006) Activation of MAPK ERK in peripheral nerve after injury. *BMC neuroscience* 7(1):1.
134. Segal RA (2003) Selectivity in neurotrophin signaling: theme and variations. *Annual review of neuroscience* 26(1):299-330.

135. Hu J, et al. (2016) The role of RhoA in retrograde neuronal death and axon regeneration after spinal cord injury. *Neurobiology of Disease*.
136. Zhang Y, Zhao J, Wang J, & Jiao X (2010) Brain-derived neurotrophic factor inhibits phenylalanine-induced neuronal apoptosis by preventing RhoA pathway activation. *Neurochemical research* 35(3):480-486.
137. Sonego M, et al. (2015) Drebrin regulates neuroblast migration in the postnatal mammalian brain. *PloS one* 10(5):e0126478.
138. Pei Z, et al. (2014) The expression and roles of Nde1 and Ndel1 in the adult mammalian central nervous system. *Neuroscience* 271:119-136.
139. Rivera J, Chu PJ, Lewis TL, & Arnold DB (2007) The role of Kif5B in axonal localization of Kv1 K<sup>+</sup> channels. *European Journal of Neuroscience* 25(1):136-146.
140. Su Y-Y, et al. (2013) KIF5B promotes the forward transport and axonal function of the voltage-gated sodium channel Nav1.8. *The Journal of Neuroscience* 33(45):17884-17896.
141. Clifford MA, et al. (2014) EphA7 signaling guides cortical dendritic development and spine maturation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111(13):4994-4999.
142. Park E, et al. (2013) EphA/ephrin-A signaling is critically involved in region-specific apoptosis during early brain development. *Cell Death & Differentiation* 20(1):169-180.
143. Depaepe V, et al. (2005) Ephrin signalling controls brain size by regulating apoptosis of neural progenitors. *Nature* 435(7046):1244-1250.
144. Schmitt D, et al. (2016) Initial characterization of a Syap1 knock-out mouse and distribution of Syap1 in mouse brain and cultured motoneurons. *Histochemistry and Cell Biology* 146(4):489-512.
145. Ramsey KM, et al. (2009) Circadian clock feedback cycle through NAMPT-mediated NAD<sup>+</sup> biosynthesis. *Science* 324(5927):651-654.
146. Sarkar C, et al. (2014) Impaired autophagy flux is associated with neuronal cell death after traumatic brain injury. *Autophagy* 10(12):2208-2222.
147. Hsu C-Y, et al. (2008) LUZP deficiency affects neural tube closure during brain development. *Biochemical and biophysical research communications* 376(3):466-471.

148. Matsumoto Y, et al. (2014) Ezrin mediates neuritogenesis via down-regulation of RhoA activity in cultured cortical neurons. *PloS one* 9(8):e105435.
149. Heintz TG, et al. (2014) Kinesin KIF4A transports integrin  $\beta$ 1 in developing axons of cortical neurons. *Molecular and Cellular Neuroscience* 63:60-71.
150. Willemsen MH, et al. (2014) Involvement of the kinesin family members KIF4A and KIF5C in intellectual disability and synaptic function. *Journal of medical genetics* 51(7):487-494.
151. García-Nogales P, Almeida A, & Bolaños JP (2003) Peroxynitrite Protects Neurons against Nitric Oxide-mediated Apoptosis A KEY ROLE FOR GLUCOSE-6-PHOSPHATE DEHYDROGENASE ACTIVITY IN NEUROPROTECTION. *Journal of Biological Chemistry* 278(2):864-874.
152. Romero-Ruiz A, Mejías R, Díaz-Martín J, López-Barneo J, & Gao L (2010) Mesencephalic and striatal protein profiles in mice over-expressing glucose-6-phosphate dehydrogenase in dopaminergic neurons. *Journal of proteomics* 73(9):1747-1757.
153. Chiò A & Lauria G (2016) Degenerative neuromuscular diseases: crucial gene and cell machinery discoveries. *The Lancet. Neurology* 15(1):12.
154. El Kadmiri N, et al. (2014) Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) and Alzheimer's disease. *Pathologie Biologie* 62(6):333-336.
155. Lee FHF, et al. (2016) Disrupting GluA2-GAPDH Interaction Affects Axon and Dendrite Development. *Scientific Reports* 6.
156. Ma L & Tessier-Lavigne M (2007) Dual branch-promoting and branch-repelling actions of Slit/Robo signaling on peripheral and central branches of developing sensory axons. *J Neurosci* 27(25):6843-6851.
157. Wehrle R, Camand E, Chedotal A, Sotelo C, & Dusart I (2005) Expression of netrin-1, slit-1 and slit-3 but not of slit-2 after cerebellar and spinal cord lesions. *European Journal of Neuroscience* 22(9):2134-2144.
158. Glessner JT, et al. (2010) Duplication of the SLIT3 locus on 5q35. 1 predisposes to major depressive disorder. *PLoS One* 5(12):e15463.
159. Zhang B, et al. (2009) Repulsive axon guidance molecule Slit3 is a novel angiogenic factor. *Blood* 114(19):4300-4309.
160. Rost F, et al. (2016) Accelerated cell divisions drive the outgrowth of the regenerating spinal cord in axolotls. *eLife* 5:e20357.

161. Yan W, Chen Z-Y, Chen J-Q, & Chen H-M (2016) BMP2 promotes the differentiation of neural stem cells into dopaminergic neurons in vitro via miR-145-mediated upregulation of Nurr1 expression. *American journal of translational research* 8(9):3689.
162. Gujar AD, et al. (2016) An NAD<sup>+</sup>-dependent transcriptional program governs self-renewal and radiation resistance in glioblastoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences*:201610921.
163. Tristan C, Shahani N, Sedlak TW, & Sawa A (2011) The diverse functions of GAPDH: views from different subcellular compartments. *Cell Signal* 23(2):317-323.
164. Tanaka EM & Ferretti P (2009) Considering the evolution of regeneration in the central nervous system. *Nature Reviews Neuroscience* 10(10):713-723.
165. Rodrigo Albors A & Tanaka EM (2015) High-efficiency electroporation of the spinal cord in larval axolotl. *Methods Mol Biol* 1290:115-125.

## 10. ETİK KURUL ONAYI



T.C.  
İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ  
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU BAŞKANLIĞI  
E-İmzalıdır

Sayı : 38828770-604.01.01-E.2303  
Konu : Etik Kurulu Kararı

12/02/2016

**Sayın Yrd. Doç. Dr. Turan Demircan**

Üniversitemizin Hayvan Deneyleeri Yerel Etik Kuruluna yapmış olduğunuz "Axolotl' da Kuyruk Rejenerasyonu Sağlayan Moleküler Mekanizmaların Yeni Nesil RNA Dizileme ve Proteomiks Yöntemleri ile Tanımlanması" isimli başvurunuz incelenmiş olup, etik kurulu kararı ekte sunulmuştur.

Bilgilerinize rica ederim.

Doç. Dr. Hanefi ÖZBEK  
Hayvan Deneyleeri Yerel Etik Kurulu  
(İMÜ-HADYEK) Başkanı

EK:  
-Karar Formu (1 sayfa)

Bu belge 5070 sayılı e-İmza Kanununa göre Doc. Dr. Hanefi ÖZBEK tarafından 12.02.2016 tarihinde e-imzalanmıştır.

~~Evrakımızı <http://ebys.medipol.edu.tr/e-imza/confirmationCodeDocumentViewer.aspx> linkinden 5B83F34CX0 kodu ile doğrulayabilirsiniz.~~



## ETİK KURUL ONAYI (DEVAM)



T.C.

**İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ,  
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU (İMÜ-HADYEK)  
ETİK KURULU KARARI**

Toplantı Tarihi	Karar No	İlgi	Proje Yürütücüsü
10/02/2016	18		Yrd. Doç. Dr. Turan Demircan

“Axolotl’ da Kuyruk Rejenerasyonu Sağlayan Moleküler Mekanizmaların Yeni Nesil RNA Dizileme ve Protomoiks Yöntemleri ile Tanımlanması” başlıklı bilimsel araştırma Etik Kurulumuzda görüşülmüş olup, çalışmanın etik kurallara uygun olduğuna “oybirliği” ile karar verilmiştir.

**Etik Onay Geçerlilik Süresi: 12 ay**

GÖREVİ	ADI SOYADI	İMZA
Başkan	Doç. Dr. Hanefi ÖZBEK	
Üye	Prof. Dr. Ülkan KILIÇ	
Üye	Prof. Dr. Mustafa ÖZTÜRK	
Üye	Yrd. Doç. Dr. H. Emir YÜZBAŞIOĞLU	
Üye	Yrd. Doç. Dr. Sine Özmen TOĞAY	
Üye	Yrd. Doç. Dr. Mehmet Yalçın GÜNAL	
Üye	Taha KELEŞTEMUR	
Üye	Özge Şeyda DURGUT	
Üye	Fahriye ŞENBAHÇE	

## ETİK KURUL ONAYI (DEVAM)



T.C.  
İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ  
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU  
TAAHHÜTNAME

09 / 02 / 2016

**Çalışmanın Tam Adı:** Axolotl'da Kuyruk Rejenerasyonu Sağlayan Moleküler Mekanizmaların Yeni-nesil RNA Dizileme ve Proteomiks Yöntemleri ile Tanımlanması

**Çalışma Ekibi (Adı - Soyadı, Unvanı):**

**Çalışmada Sorumlu Yürütücü:** Turan Demircan, Yrd. Doc. Dr.

**Diğer Görevliler:**

1 İlknur Keskin, Yrd. Doç. Dr.

2 Nilüfer (Ulaş) Aytürk

3

4

5

6

7

8

9

10-

- İstanbul Medipol Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesini okudum. Yönergeye uygun olarak çalışacağımı,
- Onay alınmış çalışmada; Deneysel Hayvanları Kullanım Sertifikası bulunmayan kişilere deney hayvanlarında herhangi bir işlem yaptırmayacağımı,
- Çalışma sürecinde işlemlerde ve çalışma ekibinde yapılacak değişiklikler için Yerel Etik Kurulu'nun iznini alacağımı,
- Çalışmanın bitimini müteakip 3 ay içerisinde Yerel Etik Kurul'a bildireceğimi,
- Bu Çalışma süresince, İstanbul Medipol Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesi'nde yer alan etik ilkelere uyacağımı, beklenmeyen ters bir etki veya olay olduğunda derhal Yerel Etik Kurulu'na bildireceğimi taahhüt ederim / ederiz.

(Adı, Soyadı, İmzası)

**Çalışma Yürütücüsü**

Adres: İstanbul Medipol Üniversitesi  
Uluslararası Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji  
REMER, Kavacık Yerleşkesi, Kavacık Mah.  
Ekinciler Cad. No.19, Kavacık/Beykoz/İST

Tel İş:-----

Tel Cep:532-547 83 74

E-posta:tdemircan@medipol.edu.tr

## ETİK KURUL ONAYI (DEVAM)



### İ.M.Ü. HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU (İMÜ-HADYEK)

#### BAŞVURU FORMU

Protokol no:
Onay tarihi:

#### KARAR:

- Uygun  Koşullu Olarak Uygun  
 Düzeltilmesi Gerekir  Uygun Değil

(Bu bölüm İMÜ-HADYEK tarafından doldurulacaktır)

1. Araştırmanın Adı : Axolotl'da Kuyruk Rejenerasyonu Sağlayan Moleküler Mekanizmaların Yeni-nesil RNA Dizileme ve Proteomiks Yöntemleri ile Tanımlanması

#### 2. Araştırmacıların\* Adı, Ünvanı, Çalıştığı Birimler ve İmzaları :

Proje Yürütücüsü Adı-Soyadı: Yrd. Doc. Dr. Turan Demircan İmza:	Adresi: İstanbul Medipol Üniversitesi Uluslararası Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji REMER, Kavacık Yerleşkesi, Kavacık Mah. Ekinciler Cad. No.19, Kavacık/Beykoz/İST. Tel:0532-547-8374 e-posta: tdemircan@medipol.edu.tr
Araştırmacı Adı-Soyadı: Yrd. Doc. Dr. İlknur Keskin İmza:	Adresi: İstanbul Medipol Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embryoloji ABD., REMER, Kavacık Yerleşkesi, Kavacık Mah. Ekinciler Cad. No.19, Kavacık/Beykoz/İST. Tel: 0532-501-5469 e-posta: ilknurkeskin@medipol.edu.tr
Araştırmacı Adı-Soyadı: Arş. Gör. Nilüfer (Ulaş) Aytürk İmza:	Adresi: İstanbul Medipol Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embryoloji ABD., REMER, Kavacık Yerleşkesi, Kavacık Mah. Ekinciler Cad. No.19, Kavacık/Beykoz/İST. Tel: 0555-495-9053 e-posta: nulas@medipol.edu.tr

\* Araştırmacılar, tüm yurtiçi ve yurtdışı bilimsel makalelerde, bildiri ve posterlerde "İMÜ-HADYEK onayı alınmıştır" ifadesinin yer almasını kabul etmişlerdir.

#### 3. Araştırmacıların Sertifikasyon Belgelerinin Alındığı Kurumlar ve Tarihleri

**DİKKAT:** Çalışmanın canlı hayvan üzerinde yapılacak uygulamalarında görev alacak tüm araştırmacıların sertifikalarının fotokopileri eklenmelidir.

## ETİK KURUL ONAYI (DEVAM)

İstanbul Medipol Üniversitesi-REMER  
hayvan deneylerinde çalışacak diğer araştırmacıların sertifikaları ekte bilginize sunulmuştur

#### 4. Çalışmayı Destekleyen Kuruluş(lar):

#### 5. Çalışmanın türü

- X Münferit proje  Uzmanlık tezi  
 Doktora tezi  Yüksek lisans tezi

#### 6. Projenin Başlama Tarihi ve Süresi: 01/02/2016- 12 Ay

#### 7. Projenin Yapılacağı Yer / Yerler:

İstanbul Medipol Üniversitesi, Uluslararası Tıp Fakültesi  
Rejeneratif ve Restoratif Tıp Araştırmaları Merkezi (REMER), Kavacık Yerleşkesi, Kavacık Mah.  
Ekinciler Cad. No.19, Kavacık/Beykoz/İSTANBUL

#### 8. Araştırmanın Literatürdeki Yeri:

Bir çok insan iş kazaları, savaşlar, doğa olayları veya hastalıklar yüzünden uzuvlarını ya da iç organlarını kaybedebilmekte, bu durum yüzünden de sakatlık yaşamak da yaşamını kaybetmektedir. Öldürücü olmayan uzuv kayıplarında ve/veya organ hasarlarında yenilenmenin kazanılması için çalışmalar sürmekle beraber henü istenilen gelişme seviyesine ulaşamamıştır. Bunun en büyük sebebi memelilerde kısmi tamirinin olmasına rağmen sınırlı rejenerasyon kapasitesi nedeni ile, akut ya da kronik yaralanmaların çoğu tamamen tamir edilemez. Toplum sağlığına ve ülkelerin ekonomisine olan etkisi göz önün alındığında rejeneratif tıp alanındaki çalışmaların önemi daha iyi anlaşılmaktadır.

Böylesi tedavi seçeneklerinin bulunması açısından, memelilerde sınırlı yenilenme kapasitesi göz önüne alındığında, yenilenme yeteneği yüksek canlılarda araştırmalar yapmak önem arz etmektedir. Bu canlıların rejenerasyonu ve doku tamiri nasıl gerçekleştirdiklerinin anlaşılması, sınırlı yenilenme potansiyeline sahip memelilerde kimi tıbbi uygulamaların yapılabilmesinin önünü açacaktır. Çoğu omurgasız hayvan modelinde rejenerasyon çalışmalara sürmek ile beraber bu canlıların memelilere olan uzaklığı, öğrenilen bilginin memeli sistemine taşınmasını sınırlamaktadır (Alvarado ve Tsonis, 2006; Muneoko vd., 2008).

Diğer canlılar ile kıyaslandığında, diğer türlere göre daha yüksek rejenerasyon kapasitesine sahip kimi omurgalı canlılar vardır, örneğin amfibi sınıftan olan Axolotl (*Amystoma Mexicanum*) gibi. Yenilenme ve doku tamiri mekanizmalarının nasıl olduğu hala tam olarak anlaşılammış bu canlı, ekstremitelerini (ön ayakları ve arka ayaklarını), kuyruğunu, kalp dahil iç organlarını, beyin ve omurilik gibi CNS elemanlarını yenileme kapasitesine sahiptir. Böylesine olağanüstü yenilenme kapasitesine sahip olması, Axolotl'ı kök hücre ve rejenerasyon araştırmaları için uygun bir model organizma yapmaktadır.

Bu çalışmada, Axolotl'un rejeneratif potansiyelini kullanarak kuyruk rejenerasyonu için 'omiks' bilgisi üretmeyi planlamaktayız. Bu hedefe varmak için, neotenik Axolotl'ların kuyruk bölgeleri kesilecektir. Kuyruk kesilmesinin ardından yenilenme ve doku tamirinin farklı zaman aralıklarında (0., 1.,4, ve 7. gün aralıklarına), blastema ve blastemanın 0.5 mm proximal bölgesinden doku örnekleri alınacak ve bu örnekler için transkriptomik ve proteomik çalışmalar yapılacaktır. Neotenik Axolotl'ların kuyruk tamiri sırasında farklı şekilde ifade edilmiş gen ve protein profilinin bulunması

ile bu genlerin fonksiyonel çalışmalarının yapılmasını önü açılmış olacaktır. Bu çalışma ile ayrıca Axolotl'un yaygın bir model olarak kullanılmasının önünde engel olan limitli veri tabanları da geliştirilmiş olacaktır. Bu çalışmanın sonuçları ile uzuv ve organlardaki hasarların tamirine dair bilginin üretilmesine ve memeli sisteminde rejenerasyonu mümkün kılacak bilimsel çabalara katkı sunulması hedeflenmektedir.

### 9. Araştırmanın Amacı (varsa ön çalışma sonuçlarını belirtiniz):

Organ yetmezlikleri, omurilik yaralanması, ekstremitte kayıpları her yıl yüzbinlerce insanı trajik olarak etkilemektedir. Vakalarının çoğunda, memeli onarım sistemi fonksiyonel restorasyonu gerçekleştirme yeteneğine sahip değildir. Memelilerde rejenerasyonun gerçekleşmesini engelleyen kimi faktörlerin varlığı ya da rejenerasyonun olmasını sağlayacak kimi faktörlerin eksikliği yüzünden memelilerin organ ve uzuv hasarlarında fonksiyonel bir tamir/yenilenme gerçekleşmemektedir. Bu faktörlerin ne olduğunun tanımlanması yaralanmalar sonrası kalıcı hasar oluşmaması açısından hayati önem taşımaktadır. Böylesi bir tanımlama işlemi için de yenilenme potansiyeli yüksek canlılarda rejenerasyon mekanizmalarının çalışması gerekmektedir. Bu canlılara örnek olarak, amfibiler sınıfı üyesi bazı omurgalılar verilebilir.

Axolotl iç organları, merkezi sinir sistemi ve uzuvlarında oluşan hasarları tamamen onarabilme özelliğine sahiptir. Biz de bu çalışma ile kuyruk bölgesi kesilen Axolotl'un bu hasarı nasıl tamir ettiğini hangi moleküler mekanizmaları bu iyileşme sürecinde kullandığını araştırmayı amaçlamaktayız. Bu çalışma ile Axolotl proteomik ve transkriptomik veri tabanlarının oluşturulmasına katkı sunmayı da hedeflemekteyiz. Axolotl'ların rejenerasyonun farklı evrelerinde hangi moleküler mekanizmalar aracılığı ile yenilenmenin kapısını araladığını ve bu mekanizmaların memeli sisteminde karşılıklarının olup olmadığını araştırılması da bu projenin amaçlarından bir diğerini oluşturmaktadır.

### 10. Önerilen Prosedürlere Alternatifler:

*Deney hayvanı kullanmadan bilimsel hedeflerinize ulaşamayacağımızı nasıl tespit ettiniz?*

Önerilen proje kuyruk rejenerasyonunda görev alan moleküler mekanizmaların transkriptomik ve proteomik analizler sonucu bulunması hedefi ile oluşturulmuştur. Kuyruksuz yenilenme sırasında miktarı değişen RNA ve proteinlerin belirlenmesi için hasar oluşturulması ve hasar sonrası izlenmesi için canlı bir sistem gerekmektedir. Bu yenilenme sürecini etkileyen ve tetikleyen mekanizmaların anlaşılması da ancak canlı bir organizmada çalışma yapmak ile mümkündür. Bu sebeplerden ötürü genel olarak rejenerasyonun bu proje özelinde ise kuyruk iyileşmesini araştırmak ve ilgili moleküler mekanizmaları bulmak ancak deney hayvanı kullanarak mümkündür.

### 11. Gereç ve Yöntem:

*(Bu bölümde, araştırmada kullanılacak deney hayvanları, deney grupları, her gruptaki hayvan sayısı, uygulanacak kimyasal maddeler, cerrahi girişimler, uygulama süresi, alınacak örnekler ile analiz yöntemlerini açık bir şekilde yazınız).*

## ETİK KURUL ONAYI (DEVAM)

### a) Denev Hayvanları:

Kullanılması Planlanan Denev Hayvanıyla İlgili Bilgiler				
Türü	Soyu	Cinsiyeti	Yaşı	Sayısı
Axolotl	<i>Ambysoma Mexicanum</i>	Dişi-erkek	4-6 aylık	36

Denev boyunca 36 hayvan araştırmalar için kullanılacaktır. Hayvanlarda kuyruk amputasyonu kuyruk ucu ve bitiminin tam orta yerinden kesilmesi ile oluşturulacaktır.

Kesilen kuyruk bölgesinden farklı günlerde örnekler alınacaktır.

9 canlıdan 0. gün örneği alınacaktır. Örnekler kesim yerinin yaklaşık 1mm proximal bölgesinden alınacaktır. Bu örnekler her biri 3 hayvandan gelen olmak üzere 3'e ayrılacaktır. Böylece 3 farklı biyoloji tekrar (her bir tekrar 3 hayvan örneği içerecektir) yapılma şansı olacaktır. Bu grup kontrol grubu olarak kullanılacaktır.

9 canlıdan 1. gün blastema örneği alınacaktır. Bu örnekler her biri 3 hayvandan gelen olmak üzere 3'e ayrılacaktır. Böylece 3 farklı biyoloji tekrar (her bir tekrar 3 hayvan örneği içerecektir) yapılma şansı olacaktır.

9 canlıdan 4. gün blastema örneği alınacaktır. Bu örnekler her biri 3 hayvandan gelen olmak üzere 3'e ayrılacaktır. Böylece 3 farklı biyoloji tekrar (her bir tekrar 3 hayvan örneği içerecektir) yapılma şansı olacaktır.

9 canlıdan 7. gün blastema örneği alınacaktır. Bu örnekler her biri 3 hayvandan gelen olmak üzere 3'e ayrılacaktır. Böylece 3 farklı biyoloji tekrar (her bir tekrar 3 hayvan örneği içerecektir) yapılma şansı olacaktır.

### b) Yöntemler:

Yukarıda bahsi geçen örnekler dondurulup bu örneklerden RNA ve protein izolasyonları yapılacaktır. RNA izolasyonu sonucu örnekler yeni nesil dizileme için uygun hale getirilecek ve kütüphaneler oluşturulacaktır. Miseq cihazına yüklenecek farklı zamanlardan alınan örneklerden değişen RNA profili çıkarılacak ve bu profil CLC workbench programı ile analiz edilecektir.

Protein izolasyonları sonucu elde edilen proteinler de LC-MS/MS yöntemi ile proteomiks analizine hazırlanacaktır. Rejenerasyonun farklı zamanlarında değişen protein profilinin bulunmasını amaçlayan bu çalışma ile aynı zamanda Axolotl protein veri bankası oluşturulması da hedeflenmektedir.

## ETİK KURUL ONAYI (DEVAM)

### 12. Preanestezik, Analjezik ve Anestezik Ajanlar:

Ajan	Doz	Ek dozlar	Veriliş yolu	Yapılacak işlem	Anestezi altında geçecek süre
Amino benzocaine	0.01% (w/V)		Bulunduğu yere		30 dk

### Anestezi derinliğinin izlenmesi (uygun seçeneklerin tümünü işaretleyiniz)

- Protokole uygulanması uygun değildir
- X Cilt veya parmak kısırtma yanıtları
- Palpebra veya kornea refleksi (rodentler için uygun değildir)
- Çene veya iskelet kası tonusu izlenmesi
- X Fیزیyolojik yanıtın izlenmesi
- Diğer, açıklayınız: .....

### 13. Araştırmada Kullanılacak Ötenazi Yöntemleri

X Ötenazi uygulanmayacaktır. (Bu durumda bu hayvanlara yapılması planlanan başka bir uygulama var mı?)

Hayır yoktur

- Yüksek doz anestezik
- Anestezi/trankilizan altında dekapitasyon
- Anestezi/trankilizan altında servikal dislokasyon
- Cerrahi sırasında ekssanguinasyon
- Karbondioksit solutma
- Diğer, tanımlayınız:

## ETİK KURUL ONAYI (DEVAM)

---

### 14. Hayvanların Deney Protokolünden Çıkarılma Ölçütleri (uygun seçeneklerin tümü işaretlenmelidir)

- Vücut ağırlığının %15'inden fazla kilo kaybı
- Davranış bozukluğu
- Düzgün gıda ve su alamama
- Uyarılara belirgin derecede azalmış yanıt verme
- Veteriner hekimin uygun görmesi (insani nedenler). Tanımlayınız:
- Diğer, tanımlayınız.

### 15. Kaynaklar:

1. A. Sánchez Alvarado, P.A. Tsonis (2006), Bridging the regeneration gap : Genetic 1 insights from diverse animal models Nat. Rev., 7 pp. 873-884
2. Muneoka K., Allan C. H., Yang X., Lee J., Han M. (2008). Mammalian regeneration and regenerative medicine. *Birth Defects Res. C Embryo Today* 84, 265-280



## 11.ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

<b>Adı</b>	Mahmut Erhan	<b>Soyadı</b>	AVŞAROĞLU
<b>Doğum Yeri</b>	Anamur	<b>Doğum Tarihi</b>	20.01.1991
<b>Uyruğu</b>	TÜRK	<b>TC Kimlik No</b>	34762683492

### Eğitim Düzeyi

	<b>Mezun Olduğu Kurumun Adı</b>	<b>Mezuniyet Yılı</b>
<b>Doktora/Uzmanlık</b>		
<b>Yüksek Lisans</b>		
<b>Lisans</b>	Gebze Teknik Üniversitesi / Fen Fakültesi / Moleküler Biyoloji ve Genetik	2015
<b>Lise</b>	Antalya Lisesi	2009

### İş Deneyimi

<b>Görevi</b>	<b>Kurum</b>	<b>Süre (Yıl – Yıl )</b>

<b>Yabancı Dilleri</b>	<b>Okuduğunu Anlama</b>	<b>Konuşma</b>	<b>Yazma</b>

	Sayısal	Eşit ağırlık	Sözel
<b>ALES Puanı</b>			

### **Bilgisayar Bilgisi**

<b>Program</b>	<b>Kullanma Becerisi</b>

### **Sertifikalar**
