

T.C.

İZMİR KÂTİP ÇELEBİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

BÖBREK NAKLİ ÖNCESİ VE SONRASINDA WNT SİNYAL
İLETİMİNDEKİ BETA-KATENİN'İN EKSPRESYON
DEĞİŞİMLERİNİN İNCELENMESİ

Onur YÜKSEL

0000-0002-9601-7805

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Dr. Öğr. Üyesi Melek PEHLİVAN

2020- İZMİR

Onur YÜKSEL

İZMİR KÂTİP ÇELEBİ ÜNİVERSİTESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

2020

T.C.

İZMİR KÂTİP ÇELEBİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

BÖBREK NAKLİ ÖNCESİ VE SONRASINDA WNT SİNYAL
İLETİMİNDEKİ BETA-KATENİN'İN EKSPRESYON
DEĞİŞİMLERİNİN İNCELENMESİ

Onur YÜKSEL

0000-0002-9601-7805

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Dr. Öğr. Üyesi Melek PEHLİVAN

Bu tez İzmir Kâtip Çelebi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi tarafından 2018-TYL-SABE-0068 Proje numarası ile Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından desteklenmiştir.

2020- İZMİR

KABUL VE ONAY SAYFASI

Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürlüğü'ne;

İzmir Kâtip Çelebi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı** çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarih: 17.11.2020

Tez Danışmanı:

Dr. Öğr. Üyesi Melek PEHLİVAN, İzmir Kâtip Çelebi Üniversitesi

Üye:

Doç. Dr. Mustafa SOYÖZ, İzmir Kâtip Çelebi Üniversitesi

Üye:

Prof. Dr. Hakkı Ogün Sercan, Dokuz Eylül Üniversitesi

Enstitü Müdürü

Prof. Dr. Ahmet KOYU

YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini İzmir Katip Çelebi Üniversitesi'ne verdiğimi bildiririm. Bu izinle üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanılması zorunlu metinlerin yazılı izin alınarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

- **Tezimin/Raporumun tamamı dünya çapında erişime açılabilir ve bir kısmı veya tamamının fotokopisi alınabilir.**
(Bu seçenekte teziniz arama motorlarında indekslenebilecek, daha sonra tezinizin erişim statüsünün değiştirilmesini talep etmeniz ve kütüphaneye bu talebinizi yerine getirirse bile, teziniz arama motorlarının önbelleklerinde kalmaya devam edebilecektir.)
- **Tezimin/Raporumun Ekim 2022 tarihine kadar erişime açılmasını ve fotokopi alınmasını istemiyorum. (İç kapak, Özet, İçindekiler ve Kaynakça hariç)**
(Bu sürenin sonunda uzatma için başvuruda bulunmadığım takdirde tezimin/raporumun tamamı her yerden erişime açılabilir, kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı veya tamamının fotokopisi alınabilir.)
- **Tezimin/Raporumun tarihine kadar erişime açılmasını istemiyorum ancak kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı veya tamamının fotokopisinin alınmasını onaylıyorum.**
- **Serbest Seçenek/Yazarın Seçimi**

Onur YÜKSEL

ETİK BEYAN

Bu çalışmadaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında özgün olduğunu, Tez Danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Melek PEHLİVAN danışmanlığında tarafımdan üretildiğini ve İzmir Katip Çelebi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kılavuzuna göre yazıldığını beyan ederim.

Onur YÜKSEL

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans boyunca yanında çalışmaktan onur duyduğum ve tecrübelerinden her an faydalandığım tez danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Melek PEHLİVAN'a teşekkür ederim. Bu çalışmanın ortaya çıkmasında büyük emekleri olan H. İlayhan KARAHAN ÇÖVEN ve Burcu ÇERÇİ'ye teşekkürlerimi sunuyorum.

Tez çalışmam İzmir Kâtip Çelebi Üniversitesi Bilimsel Araştırma ve Proje Koordinatörlüğü'nün (İKÇÜ BAP) 2018-TYL-SABE-0068 numaralı proje kapsamında desteklenmiş ve yüksek lisans tez desteği sağlanmıştır. Çalışmamı destekleyen İKÇÜ BAP'a teşekkür ederim.



ÖZET

BÖBREK NAKLİ ÖNCESİ VE SONRASINDA WNT SİNYAL İLETİMİNDEKİ BETA-KATENİN'İN EKSPRESYON DEĞİŞİMLERİNİN İNCELENMESİ

Yüksel, Onur

Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi

İzmir, 2020

Giriş ve Amaç: 1990 yıllarında keşfedilen Wnt sinyal iletiminin birçok biyolojik mekanizmada etkili olduğu bilinmektedir. Sinyal yolağındaki temel mekanizma β -katenin seviyesi ile ilişkilidir. β -katenin Wnt sinyal yolağının kaderini belirlemektedir. Böbrek gelişim ve transplantasyon süreçlerinde de rol alan Wnt sinyal iletiminin, böbrek hasarının onarımındaki ya da akut hasardan kronik hasara geçişteki rolü yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir. Çalışmamızda ise, hastaların nakil öncesi ve sonrası β -katenin ekspresyon seviyelerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Yöntemler: Kronik Böbrek Yetmezliği tanısı konulmuş 25 hastanın böbrek nakli öncesi ve sonrası periferik kan örneklerinden lenfosit izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu örneklerde $CD4^+$ T hücreleri MACS yöntemi kullanılarak ayrılmıştır. Ayrımlanan $CD4^+$ T hücrelerinden total RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Elde ettiğimiz RNA örnekleri cDNA'ya çevrildikten sonra kalıp olarak kullanılarak gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu ile β -katenin ekspresyon seviyeleri belirlenmiştir.

Bulgular: Çalışmamızda nakil olan 23 hastanın 5'inde rejeksiyon vardır. Tüm hastaların $CD4^+$ T hücrelerinde β -katenin ekspresyon düzeyleri incelendiğinde hastaların %60,8'inde β -katenin ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir. Ekspresyonu artan hastaların %85,7'sinde rejeksiyon ve %78,57'sinde akut böbrek hasarı gözlenmemiştir.

Sonuç: Veriler analiz edildiğinde Wnt sinyal iletiminin nakil sonrası böbrek sağkalımı ve fonksiyonu açısından etkili olabileceği izlenmiştir. Akut böbrek hasarı gelişen hastalarda β -katenin ifadesinin azaldığı aynı şekilde β -katenin ifadesi artan hastaların çoğunda akut böbrek hasarının bulunmadığı gözlenmiştir. Bununla birlikte β -katenin ekspresyon düzeyi artan

hastalarda nakil sonrasında böbrek fonksiyonlarının korunduğu ve rejeksiyon riskinin azalmış olabileceği dşnlmektedir.

Anahtar Kelimeler: Wnt sinyal iletimi, böbrek nakli, rejeksiyon, β -katenin



ABSTRACT

INVESTIGATION OF BETA-CATENIN EXPRESSION CHANGES IN WNT SIGNALING PATHWAY BEFORE AND AFTER KIDNEY TRANSPLANTATION

Yuksel, Onur

MSc in Medical Biology and Genetic

Izmir, 2020

Introduction and purpose: Wnt signaling pathway was discovered in 1990, is known to be effective in many biological mechanisms. The basic mechanism in the signaling pathway is related to the level of β -catenin. β -catenin determines the fate of the pathway. The role of Wnt signaling pathway, which is also involved in kidney development and transplantation processes, in the repair of kidney damage or in the transition from acute damage to chronic damage, has been shown by studies. In our study, it was aimed to examine the relationship of β -catenin expression levels on transplantation in patients after transplantation compared to before transplantation.

Methods: Lymphocyte isolation was performed from peripheral blood samples before and after kidney transplantation in 25 patients diagnosed with chronic kidney failure. In these samples, CD4⁺ T cells were distinguished using the MACS method. Total RNA isolation was performed from the differentiated CD4⁺ T cells. The expression levels of β -catenin were determined by real-time polymerase chain reaction from the RNA samples.

Results: In our study, 5 of the 23 patients who received a transplant had rejection. When β -catenin expression levels were examined in CD4⁺ T cells of all patients, β -catenin expression was shown to increase in 60,8% of patients. Rejection was observed in 85,7% of patients with increased expression, and acute kidney damage was not observed in 78,57%.

Conclusion: When the data were analyzed, it was observed that Wnt signal transmission could be effective in terms of kidney survival and function after transplantation. It has been observed that there may be a relationship between acute kidney damage and Wnt signal and that Wnt signal decreases in patients who develop acute kidney damage after transplantation. However,

in patients with increased β -catenin expression levels, it is believed that kidney function is maintained after transplantation and the risk of rejection may be reduced.

Keywords: Wnt signaling pathway, kidney transplant, rejection, β -catenin



İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay Sayfası	i
Yayımlama ve Fikri Mülkiyet Hakları Beyanı	ii
Etik Beyan	iii
Teşekkürler	iv
Özet	v
Abstract	vii
İçindekiler	ix
Simgeler ve Kısaltmalar	xi
Şekiller Dizini	xiii
Tablolar Dizini	xiv
1.GİRİŞ	1
2.GENEL BİLGİLER	2
2.1. Wnt Sinyal İletimi	2
2.1.1. Kanonikal Sinyal Yolağı	2
2.1.2 Non-Kanonikal Sinyal Yolağı	4
2.1.2.1. Hücre Polaritesinin Sağlanması Görev Alan Wnt/PCP Sinyal Yolağı	4
2.1.2.2. Wnt/Ca ²⁺ Sinyal Yolağı	4
2.2. Böbrek ve Böbrek Yetmezliği	5
2.3. Embriyonik Böbrek Gelişiminde Wnt Sinyal İletimi	7
2.4. Akut ve Kronik Böbrek Hasarında Wnt Sinyal İletimi'nin Rolü	8
2.5. Böbrek Transplantasyonunda Wnt Sinyali	11
2.6. Böbrek Transplantasyonundaki İmmünolojik Hücreler	12
2.6.1. B Hücreleri	12
2.6.2. T Hücreleri	12
3. GEREÇ VE YÖNTEM	16
3.1. Araştırmanın Tipi	16
3.2. Araştırmanın Örneklemi	16
3.3. Deney Kurgusu	16
3.4. Veri Toplama Araçları	18
3.4.1. Kullanılan Cihazlar	18
3.4.2. Kullanılan Sarf Malzemeler	18

3.5. Veri Toplama Yöntemleri	20
3.5.1. Periferik Kandan Lenfosit İzolasyonu	20
3.5.2. CD4 ⁺ T Hücrelerinin Manyetik Hücre Ayrılama Metodu (MACS) ile Ayrılanması	20
3.5.3. Akım Sitometri Analizi	21
3.5.4. RNA İzolasyonu	22
3.5.5. RNA Miktarının Belirlenmesi	23
3.5.6. Komplementer DNA (cDNA) Sentezi	23
3.5.7. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR)	23
3.6. Verilerin Analizi	25
3.7. Etik İzinler	25
4. BULGULAR	26
4.1. Araştırmada Kullanılan Hastaların ve Donörlerin Demografik Bilgileri	26
4.2. Araştırmamızda Kullanılan Hastaların β -katenin Ekspresyon Düzeylerinin Belirlenmesi	27
4.2.1. Kullanılan Hastalardan CD4 ⁺ T Hücrelerinin Eldesi ve Saflığı	27
4.2.2. Hastaların β -katenin Gen Ekspresyon Değişimleri	28
5. TARTIŞMA	34
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	40
KAYNAKLAR	41
EKLER	47
Ek1	47
ÖZGEÇMİŞ	49

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

°C	Santigrat derece
µl	Mikrolitre
>	Büyüktür
ABH	Akut böbrek hasarı
AMR	Antikor aracılı rejeksiyon
APC	Adenomatöz polipozis coli
Ca	Kalsiyum
CaN	Fosfataz kalsinorini
cDNA	Komplementer deoksiribonükleik asit
CK1	Kazein kinaz 1
CMV	Sitomegalovirüs
Ct	Döngü eşiği
dH ₂ O	Distile su
DKK1	Dickkopf ile ilişkili protein 1
Dvl	Dishevelled
Fbf23	Fibroblast Büyüme Faktörü 23
Fzd	Frizzled
gDNA	Genomik DNA
GSK3B	Glikojen sentaz kinaz 3B
HKH	Hematopoitik kök hücre
HLA	İnsan lökosit antijeni
IL	İnterlökin
IM	Orta mezoderm
İPH	İskemi reperfüzyon hasarı
JNK	C-Jun N-Terminal kinaz
KBH	Kronik böbrek hasarı
KBY	Kronik böbrek yetmezliği
LEF	Lenfoid arttırıcı bağlama faktörü
LRP5/6	Low-density lipoprotein receptor related protein 5/6
mRNA	Mesajcı ribo nükleik asit
NCBI	National Center for Biotechnology Information

NFAT	Aktif T hücre nükleer faktörü
NLK	Nemo-like kinaz
NÖ	Nakil öncesi
NS	Nakil sonrası
PBS	Fosfat tuz tamponu
PKC	Protein kinaz C
PLC	Fosfolipaz C
sFRP4	Secreted frizzled-related protein 4
siRNA	Susturucu RNA
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
TCF	T hücre faktörü
TG	Transplant glomerülopati
Th	Yardımcı T hücre
Treg	Regülatör T hücresi
TÜT	Tek taraflı üreter tıkanıklık

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1: Wnt sinyal iletim mekanizması. İnaktif ve aktif durum	3
Şekil 2: Wnt/PCP ve Wnt/Ca ²⁺ sinyal yolağı	5
Şekil 3: İş akış düzeni	17
Şekil 4: CD4 ⁺ T hücrelerinin akım sitometrisi'nde analizi	27
Şekil 5: β -katenin geninin nakil öncesine oranla nakil sonrası ekspresyon kat artışı	30



TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1: Araştırmada kullanılan cihazlar	18
Tablo 2: Araştırmada kullanılan sarf malzemeler	18
Tablo 3: Kit içeriği ve reaksiyon miktarları	23
Tablo 4: β -aktin primerleri	24
Tablo 5: β -katenin primerleri	24
Tablo 6: RT-PCR reaksiyon içerikleri	24
Tablo 7: RT-PCR ısı döngüleri	25
Tablo 8: Kullanılan hasta ve donörlerin demografik bilgileri	26
Tablo 9: β -katenin RT-PCR sonuçları	28
Tablo 10: Nakil tipi ile ekspresyon ilişkisi	30
Tablo 11: Rejeksiyon ile ekspresyon ilişkisi	31
Tablo 12: Hastaların doku uyumu, rejeksiyon, akut böbrek hasarı ve ekspresyon kat artışı ilişkisi	32
Tablo 13: Akut böbrek hasarı ve ekspresyon ilişkisi	33

1.GİRİŞ

Wnt sinyali; hücre kaderi, proliferasyon, hücre polarizasyonu, morfojeniz ve bazal membran sentezi dahil olmak üzere birçok farklı organda embriyonik ve fetal gelişimin hücresel etkileşimlerini düzenleyen, yüksek oranda korunmuş bir sinyal yolağıdır (1).

Wnt sinyal iletimi, hücrelerin, dokuların oluşumu ve rejenerasyonu sırasında aktif hale gelen temel sinyal yollarından birisidir. Ayrıca Wnt sinyali, nakilden sonra organların T hücre aracılı akut ve kronik red aşamasında da rol oynamaktadır (2).

Böbrek nakillerinde doku fonksiyonlarının rejenerasyonu çok önemlidir. Doku onarımı ile bağışıklık yanıtları iyi koordine edilirse, konakçı doku ve organ homeostazi başarılı bir şekilde oluşur. Bu iki süreç düzensiz hale geldiğinde kronik enfeksiyonlar, kanser, otoimmün hastalıklar ve organ fibrozu gibi çoklu kronik inflamatuvar hastalıklar gelişebilir. Bu nedenle Wnt ligandlarının rolleri ve sinyal iletim yolları birçok immünolojik hastalıkta immünoterapinin önemli hedefidir (3).

CD4⁺ T hücreleri, T hücre aracılı kazanılmış immün yanıtlarda önemli görevleri olan bir lenfosit türüdür. Wnt/ β -katenin sinyal yolağının T hücre sağkalımı, soy kaderinin belirlenmesi ve farklılaşması dahil olmak üzere CD4⁺ T hücre biyolojisinin kontrolünde de kritik rol oynadığı bilinmektedir. Fakat CD4⁺ T hücre alt kümelerinin fonksiyonu üzerindeki etkisi araştırılmaya devam edilmektedir (4).

Bu çalışmada Wnt sinyali ile böbrek nakli arasındaki temel mekanizmayı anlayabilmek için Wnt sinyal iletiminin majör proteini olan β -katenin ile bir çalışma planı gerçekleştirildi. Bu çalışma ile böbrek nakli gerçekleşmiş olan hasta grubunda, nakil öncesi ve sonrası β -katenin ekspresyon düzeyi analiz edilerek nakil sonrası oluşan immün yanıt ile Wnt sinyalinin ilişkilendirilmesi amaçlandı. Analiz öncesi hasta periferik kanlarından lenfosit izolasyonu gerçekleştirilerek, lenfositlerden CD4⁺ T hücreleri ayrıldı. Ayrımlanan hücrelerden total RNA izolasyonları ve cDNA sentezi gerçekleştirildi. Sonrasında β -katenin'in mRNA düzeyinde ekspresyonu gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu ile belirlendi.

2.GENEL BİLGİLER

2.1. Wnt Sinyal İletimi

Wnt sinyal iletimi, evrim boyunca en çok korunan sinyal ileti yollarından biridir. Wnt genleri memeli gelişimindeki sayısız işlevi düzenlemekte, doku homeostazı, embriyonik gelişim, metabolizma, tümörögenез ve kök hücre yenilenmesi gibi çeşitli biyolojik süreçlerde rol oynamaktadır (5). Wnt'ler hücre çoğalması ve farklılaşmasının düzenleyicilerindendir ve hem gen transkripsiyonuna hem de hücre adezyonuna doğrudan katılan proteinleri içermektedirler (6). Son zamanlarda Wnt sinyallerinin fizyolojik fonksiyonlardaki rollerinin yanında, deregölasyonunun da hastalık ve kanser süreçlerindeki önemi ortaya konmaktadır (7).

Wnt terimi 1980'lerin başında *Drosophila*'da Wingless (Wg) ve farelerde Int (Int-1) olarak bilinen homolog proteinlerin birleşmesi ile ortaya çıkmıştır. Benzersiz yapısal özelliklere ve farklı ifade modellerine sahip olan memeli genomlarında toplam 19 Wnt ligandı tanımlanmaktadır (5). Wnt genleri tarafından kodlanan Wnt proteinleri yaklaşık olarak 350-380 amino asit uzunluğundadır. Ayrıca bu proteinler 23-24 korunmuş sistein rezidüleri içermektedir. Bu rezidüler proteinlerin hedeflerine bağlanmaları için gereklidir (8). Wnt molekülleri palmitoillenmiş olmalarından dolayı aminoasit sekansının yüksek düzeyde hidrofobik olduğu belirlenmiştir (9).

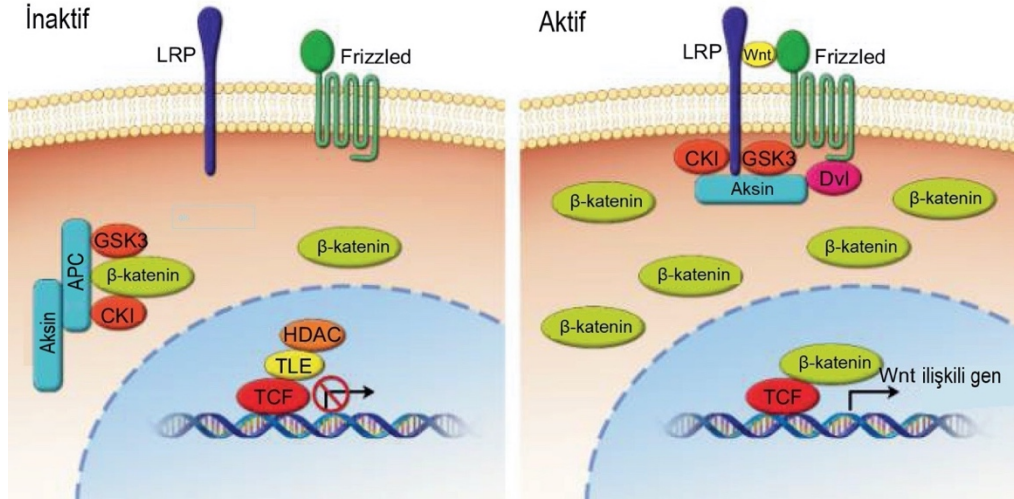
Wnt proteinleri diğer sinyal yollarına kıyasla, karmaşık bir şekilde ve kapsamlı bir kontrol mekanizması ile hedef hücrelere etki etmektedir. Wnt sinyal yolağı ilk keşfedildiğinde β -katenin üzerinden tanımlanmıştır. Bu yüzden temel olarak β -katenin bağımlı kanonikal yolak ve β -katenin'den bağımsız olan non-kanonikal yolak olarak ikiye ayrılmıştır (7).

2.1.1. Kanonikal Sinyal Yolağı

Kanonikal sinyal yolağının embriyonik gelişim sırasındaki işlevi, kurbağa *Xenopus laevis* ve sinek *Drosophila melanogaster*'deki segment kutuplarının ve kanat gelişiminin deneysel analizi sırasında açıklanmıştır. Kanonikal olarak da adlandırılan klasik Wnt sinyal yolağı, çekirdekteki β -katenin stabilizasyonu yolu ile hedef genleri aktive etmektedir (10).

Wnt sinyal iletimi, başka bir hücre tarafından sentezlenen Wnt ligantlarının hücre zarına gelmesi ile başlamaktadır. Hücre zarına gelen Wnt proteini, bir bölgesi ile

Frizzled (Fzd) proteinine bir bölgesi ile de LRP5/6 (low-density lipoprotein receptor-related protein) proteinine bağlanır. Böylece sinyalin oluşması için temel yapı kurulmuş olur. Wnt sinyalinin aktif ve inaktif durumları mevcuttur. Aktif durumunda; Wnt'ler hücre zarındaki Fzd ve LRP5/6 moleküllerine bağlanmaktadır. Sonrasında LRP5/6'nın sitozol içerisindeki kısmı glikojen sentaz kinaz (GSK3 β) ve kazein kinaz 1 (CK1) ile fosforillenir. Bu aşamada normalde β -katenin'i yıkım için hedefleyen sitozol içerisindeki yıkım kompleksi, bütünlüğünü kaybeder. Kompleksi oluşturan moleküllerden Axin ve GSK3 β , LRP5/6'nın sitozol içerisindeki fosforillenmiş bölgesine hareket ederler. Bu aşamada sitozol içerisindeki Disheveled (Dvl) proteininde fosforillenme meydana gelmektedir. Dvl, Fzd ve Axin moleküllerine bağlanır. Böylece GSK3 β , Axin molekülünden ayrılmış olur. Scaffold proteinleri olan Axin, adenomatöz polipozis coli (APC), GSK3 β serin/treonin kinazları ve CK1'i içeren β -katenin yıkım kompleksi inhibe edilir. Fosforillenmemiş olan β -katenin sitoplazmada birikir ve Wnt hedef genlerini düzenlemek için T hücre faktörü (TCF)/Lenfoid arttırıcı bağlama faktörü (LEF) ailesiyle etkileşime girerek nükleusa girer. Böylece Wnt sinyallerinin hedeflediği genlerin transkripsiyonu başlamış olur (5). (Şekil 1)



Şekil 1: Wnt Sinyal İletimi Mekanizması. İnaktif ve aktif durum (11)

2.1.2. Non-Kanonikal Sinyal Yolağı

2.1.2.1. Hücre Polaritesinin Sağlanması Görev Alan Wnt/PCP Sinyal Yolağı

Wnt/PCP (planar cell polarity) sinyal yolağının temel yapısı β -katenin'den bağımsız Fzd ve Wnt proteinleri ile ilişkilidir. Bu sinyal yolağı altı proteinden oluşmaktadır. Altı proteinin üçü transmembran Frizzled (Fzd), Vangl ve Flamingo, diğer üçü ise sitoplazmik Dishevelled, Prickle ve Diego proteinleridir. Tüm bu moleküller sitoplazmik efektör moleküllerini aktive ederler. Bunlar ise, küçük Rho GTPases (RhoA), c-jun N-terminal kinase (jNK) ve nemo-like kinase (NLK)'dir (12).

Wnt/PCP sinyal yolağı hücre polarizasyon, adezyon, embriyonik gelişim ve hücre migrasyonunun düzenlenmesinde rol oynamaktadır. Wnt/PCP sinyal yolağında sinyaller Rho ve Rac aracılığı ile aktin hücre iskelet hareketlerine etki etmekte ve aynı zamanda Rho ile ilişkili JNK bağımlı transkripsiyonu aktive edebilmektedir (13). (Şekil 2)

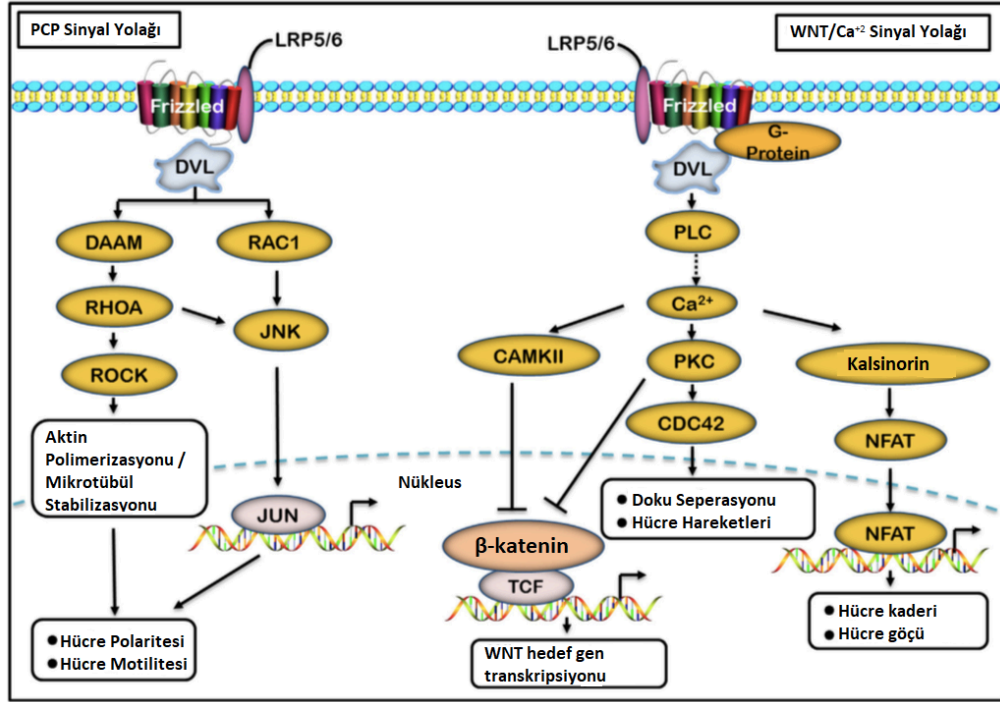
2.1.2.2. Wnt/Ca²⁺ Sinyal Yolağı

Bir başka non-kanonikal Wnt sinyal yolağı Wnt/Ca²⁺ yolağıdır. Bu yolak, G proteinleri yoluyla hücre içi Ca²⁺un salınımına yol açmaktadır. G proteini aracılığı ile aktive olan Dvl, fosfolipaz C (PLC) ve protein kinaz C'nin (PKC) aktivasyonunu sağlar. Artan Ca²⁺ düzeyi, fosfataz kalsinorini (CaN) aktive ederek, aktif T hücre nükleer faktörü (NFAT)'nın defosforilasyonuna ve onun çekirdeğe geçişine neden olur. Böylece hücre kaderinin ve migrasyonunun belirlenmesinde etkili olan hedef genlerin transkripsiyonu gerçekleşir (14).

Ca²⁺ aracılı yolak, dorsal/ventral patern, gastrulasyon ve kalp gelişiminde kritik rollere sahiptir. Wnt/ β -katenin ve Wnt/PCP sinyalinin böbrek gelişimini ve hasarını düzenlemede önemli rolleri olduğu bilinmesine rağmen, Wnt/Ca²⁺ yolağının bu süreçlerdeki rolü hakkında henüz çok az veri bulunmaktadır (5).

Wnt/Ca²⁺ yolağında Wnt ve Fz proteinlerinin alternatif bir yolu aktive edebilme kabiliyetleri gösterilmiştir. Wnt/Ca²⁺ sinyalinin hücre ve organizma düzeyindeki mekanizmalarına ilişkin belirsizliklere rağmen tüm Wnt sinyallerinin aynı mekanizma ve yolu kullanmadıkları açıktır. Örneğin farklı Wnt'lerin aşırı ekspresyonu hem *X. Laevis* hem de Zebrafish embriyolarında farklı fenotipler ortaya çıkarır. Wnt5a'nın Wnt/Ca²⁺ yolağı ile ilişkili olduğu bilinmesine rağmen, mekanizması tam olarak anlaşılamamış olsa da β -katenin bağımlı yolağı antagonize edebileceğine dair birçok

rapor bildirilmiştir (14). Bu antagonist için en etkileyici kanıtlar, Zebrafish ve knock-out farelerde yapılan Wnt5 mutasyonunun analizinden gelmektedir. β -katenin sinyalinin bir inhibitörü olan Wnt5a'nın susturulmasının, hem Zebrafish hem de fare mutantlarında β -katenin ekspresyonunu arttırdığı gözlenmiştir. Özetle, omurgalı Wnt'ler işlevsel olarak Fzd ile etkileşime girerek en az iki sinyal yolağını aktive edebilmektedir (14). (Şekil 2)



Şekil 2: Wnt/PCP ve Wnt/Ca²⁺ Sinyal Yolağı (15)

2.2. Böbrek ve Böbrek Yetmezliği

İnsan böbreği, fazla sıvıyı ve metabolik atıkları gideren, asit-baz dengesini sağlayan, elektrolitleri, kan basıncını ve kırmızı kan hücresi üretimini düzenleyen, renin ve eritropoietin gibi hormonlar üreten oldukça vasküler bir organdır. Her insan böbreğinde, temel fonksiyonel birim olan 500000-2000000 arası nefron bulunmaktadır. Nefron, kanı filtreleyen glomerulustan ve su ile elektrolitleri modüle eden glomerulusa bağlı tübüler epitelden oluşmaktadır. Renal tübül, doğrudan böbreğin korteksindeki veya dış kısmındaki glomerulusa bağlanan ve proksimal tübül ile başlayan farklı bölümlere sahiptir. Proksimal tübül Henle kulpuna, distal kıvrımlı tübüle ve medulla, renal papillaya ve sonunda üretere beslenen toplama kanalına bağlanmaktadır. Yüksek enerji gereksinimi nedeniyle, renal tübüller ve özellikle proksimal tübüller yaralanmalara karşı aşırı derecede hassastır. Tübüller, uzun süre kan basıncı, sepsis, toksinler veya

ilaçlardan kaynaklanan akut böbrek hasarının (ABH) hedefi olarak kabul edilmiştir. Ek olarak, böbrek tübüllerinin diyabet gibi kronik böbrek yaralanmalarında hedef alınabileceği konusunda artan bir farkındalık vardır. Yaralanmanın şiddeti, süresi ve böbrek tübüllerinin yaralanmaya nasıl tepki gösterdiği, böbreğin onarımdan geçip geçmediğini veya tübülointerstisyel fibrozise ilerleyip kronik böbrek hastalığının (KBH) gelişip gelişmeyeceğini belirler. Kalıcı tübüler yaralanma ve epitel onarımının başarısızlığı, ABH'dan KBH'ye geçiş ve böbrek fonksiyon kaybı ile daha fazla bağlantılıdır. Bu nedenle, fibrozise karşı renal tübüler onarımı destekleyen yolakları anlamak, dünya popülasyonunun %13'ünü etkileyen KBH'nin ilerlemesini durdurmak için önemli terapötik etkilere sahiptir (16).

Böbrek transplantasyonunun başarısı nakil organının alıcı tarafından kabul edilip edilmeme seviyesine göre belirlenir. Bu aşamada üç tip rejeksiyon görülmektedir. Bunların birincisi, hiperakut rejeksiyondur. Alıcıda daha önceden oluşmuş olan antikolar nedeniyle transplantasyondan saatler hatta dakikalar sonrasında meydana gelen rejeksiyon tipidir. İkincisi ise akut rejeksiyondur. Akut rejeksiyon T hücre aracılı bağışıklık sisteminin tepkileri nedeniyle transplantasyondan sonraki altı ay içerisinde meydana gelen rejeksiyon tipidir. Son olarak ise kronik rejeksiyon meydana gelebilir. Kronik rejeksiyonda ise, immünolojik ve diğer faktörlerin kombinasyonu ile altı ay sonrasında meydana gelen rejeksiyon tipidir (17).

Böbrek naklinde, makrofajlar, lenfositler, kompleman sistemi, antikolar gibi birçok immün mekanizma görev almaktadır. Banff kriterine göre, bu hücreler veya antikolar akut ve kronik rejeksiyona neden olabilmektedir. Antikor aracılı rejeksiyon (AMR)'un böbrek yetmezliğinin temel sebebi olduğu kabul edilmektedir. AMR, böbrek nakli sonrasında rejeksiyona sebep olabileceği için nakiller açısından önemlidir. Kompleman sisteminde klasik ve lektin yollarında C4 proteini görev almaktadır. C4d ise bu proteinin yan ürünüdür. C4d AMR için bir gösterge olarak kabul edilmiştir ve klinik uygulamalarda C4d boyanması nakil reddinde bir kriter olarak gösterilmektedir. Akut AMR'de veriler kabul edilip değerlendirilebilirken, kronik AMR'de boyama verileri değişkenlik gösterebilmektedir. Kronik AMR olarak belirlenen proteinüri ve zamanla böbrek fonksiyon kaybı olarak karakterize edilen ve greft kaybı ile sonuçlanan transplant glomerülopati (TG)'de AMR'siz C4d birikimi gerçekleşmektedir (18).

2.3. Embriyonik Böbrek Gelişiminde Wnt Sinyal İletimi

Böbrek gelişiminde moleküler olayların anlaşılması ile önemli ilerlemeler kaydedilmiştir. Bu durum embriyonik böbreğin ve onun progenitörlerinin nasıl geliştiğini anlamamızı sağlamıştır. Memeli böbreği gastrulasyondan sonra orta mezodermden (IM) türevlenir, sonra paraksial mezoderm ve orta mezoderm arasındaki anteroposterior eksen boyunca uzanır. Böbrek gelişiminin üç aşaması vardır. Bunlar: pronefroz (birincil böbrek), mezonefroz (ikincil böbrek) ve metanefroz'dur. Birincil böbrek memelilerde geçici yapılar olarak kabul edilir ve tamamen ortadan kaybolur ancak ikincil böbrek de dahil olmak üzere yeni oluşacak hücreler ve dokular için gereklidir. Orta böbrek olarak da adlandırılan ikincil böbrekler, orta mezoderm'den mezonefrik tübüllerin oluşumuyla gelişir. Fare embriyosunda E10'da mezonefrik tübüller ve kanalların yapısı erken embriyonik evrelerde fizyolojik olarak fonksiyoneldir (5).

Wnt sinyali, böbrek gelişiminde üreter tomurcuğun gelişimi ve nefrogenez'de önemli rollere sahiptir. Böbrek gelişiminin farklı dönemlerinde Wnt/ β -katenin sinyali aktiftir. E10.5 (embriyonik gün) ve E12.5'de Wnt/ β -katenin sinyali nefrik tüplerde, Wolffian kanallarında ve metanefrik mezenşimde aktiftir. Olgun nefronlarda bu sinyal azalırken, postnatal böbrekte hiç gözlenmez (15).

Böbrekte Wnt sinyal iletimi doku homeostazının oluşmasında aktiftir. Wnt proteinleri özellikle proksimal ve distal tübüllerde, makula densa ve toplama kanallarındaki hücrelerin polaritesini, proliferasyonunu ve diğer süreçlerini kontrol etmektedir (2).

Farelerde yapılan genetik çalışmalar Wnt sinyal yolağının böbrek gelişiminde çeşitli roller aldığını göstermektedir. Uygun nefron gelişimi için kanonikal Wnt sinyalinin dinamik regülasyonu gereklidir. Nefron oluşumunun ilk aşamalarında kanonikal Wnt sinyalinde bulunan Wnt9b ve Wnt4'ün ekspresyonunun arttığı bilinmektedir. Wnt9b aracılığı ile gerçekleşen non-kanonikal Wnt sinyalinde ise, tübüler morfogenezde farklı gelişim süreçleri gözlenmektedir (19). Zebra balığı ile yapılan çalışmalarda, yeni oluşan nefronlarda Wnt reseptörü Fzd9b ve kanonikal Wnt hedef geni LEF1 (Lymphoid enhancer-binding factor 1)'in eksprese olduğu bilinirken, distal tübül ve böbrek toplar damarı bölgelerinin, Wnt ligandları Wnt9a ve Wnt9b'yi ifade eden yeni nefron oluşum bölgeleri olduğu gösterilmiştir (19).

Wnt4'ün fare embriyonik böbreği ile ilişkili olduğu ve renal tübül gelişiminin başlangıç aşamalarında rol aldığı bilinmektedir. Wnt11 dallanma morfogenezinde ve Wnt7b ise medüller gelişimde görev almaktadır. Wnt11, gelişen üreterin uçlarında eksprese edilir. Wnt11, Wnt/PCP yolağında Rok2, Rho, GTPaz ve JNK sinyallerini kullanarak aktin hücre iskeletini düzenler ayrıca üreter epitelinde sitoiskeletin yeniden organizasyonunu sağlayarak gelişim morfojenезini düzenleyebilir. Yeni doğan farelerde Wnt11 genindeki mutasyon sonucu, üreter dallanma morfojenезi ve böbrek hipoplazisinin geliştiği saptanmıştır. Son yapılan çalışmalar, Wnt5a/Ror2 sinyalinin, metanefrik mezenşim ve üreter tomurcuk oluşumundan sorumlu olduğunu göstermiştir (15). Wnt5a, Wnt7b, Wnt9b ve Wnt11'de meydana gelen mutasyonların üreter tomurcukların gelişiminde anormalliklere sebebiyet verdiği de bildirilmiştir (5).

2.4.Akut ve Kronik Böbrek Hasarında Wnt Sinyal İletimi'nin Rolü

Memelilerde böbrek hasarı ve rejenerasyonu tübüler epitelin farklılaşması ve proliferasyonu ile gerçekleşmektedir. Son yıllarda, böbrek hasarı ile Wnt/ β -katenin sinyalinin ilişkisini anlamak için yapılan çalışmalar hızla artmaktadır. Ancak yetişkin böbrek patolojisinde Wnt sinyalinin rolü şu anda tartışılmaktadır. Bazı raporlar herhangi bir Wnt sinyalinin rolü olmadığını gösterirken, bazıları kanonikal Wnt sinyalinin yetişkin böbrek fibrozuna katkıda bulunduğunu ileri sürmektedir. Bununla birlikte, kanonikal Wnt sinyalinin podosit disfonksiyonunu tetikleyerek son dönem böbrek hastalığına etki ettiği düşünülmektedir (7).

Akut böbrek hasarı (ABH), hemodinamik değişiklikler, enflamasyon, endotelial ve epitelyal hücre hasarı gibi böbrek fonksiyonlarında hızlı bir azalma görülmesi şeklinde tanımlanmaktadır. ABH'nin ilerlemesi durumunda, yeterli renal iyileşme olmayacağından sıklıkla hasar kronik hale (KBH) dönüşmektedir (5).

KBH çoğunlukla, diyabet, hipertansiyon ve diğer kronik hastalıklar nedeniyle zaman içinde böbrek fonksiyonlarının kaybı olarak tanımlanır. KBH, 2013 yılında 956000 ölümle sonuçlanan, toplumsal müdahaleler ve tıbbi uygulamalarda tedavi zorlukları sunan büyük bir küresel halk sağlığı sorunudur.

Wnt/ β -katenin yolağının hem ABH hem de KBH'de aktive olması, bazı durumlarda böbreği koruyucu bazı durumlarda da zarar verici bir mekanizma olarak karşımıza çıkmaktadır. Yapılan çalışmalarda ABH'den sonra, Wnt4 aracılı β -katenin'in aktive edildiği ve renal hasarın iyileştiği belirlenmiştir (5, 20).

Böbrek hasarında tübüle özgü model farelerde yapılan çalışmalarda ABH'den sonra β -katenin'in Wnt4 aracılı aktivasyonu hücre döngüsünü teşvik edip böbrek hasarı sonrası iyileşmeyi tetiklemektedir. Ayrıca Wnt7b'nin farelerde iskemi reperfüzyon hasarından sonra böbreğin korunmasını ve onarımını sağladığı belirtilmiştir. β -katenin sinyalinin Bax aracılı apoptozu azalttığı ve tübüler epitel hücrelerinde metabolik stresin indüklenmesinden sonra hücre sağkalımını arttırdığı belirlenmiştir. Wnt agonistlerinin iskemi reperfüzyon hasarından sonra inflamasyonu ve oksidatif stresi azalttığı ve böbrek iskemi reperfüzyon hasarının aşılmasında Wnt sinyalinin düzenlenerek potansiyel farmakolojik uygulamalarda kullanılabileceği öne sürülmüştür (21).

Farklı bir çalışmada ise, 20 dakika iskemi reperfüzyon hasarına maruz bırakılan farelerin, geçici olarak Wnt/ β -katenin aktivasyonu sergilediği, böbrek fonksiyonunun tamamen iyileşmesi ile orta derece ABH'ye dönüştüğü gözlenmiştir. Ancak 30 dakika iskemi reperfüzyon hasarı bu sinyalin sürekli aktivasyonuna ve şiddetli ABH'ye neden olur ve nihayetinde renal fibroz ile karakterize KBH'ye ilerler. Wnt/ β -katenin sinyal yolağının sürekli aktivasyonu, interstisyel miyofibroblast aktivasyonunu ve ekstraselüler matris birikimi ile karakterize edilen ABH'nin KBH'ye ilerlemesini hızlandırırken, Wnt/ β -katenin'in bloklanması ABH'nin KBH'ye ilerlemesini önler. Bu nedenle, Wnt/ β -katenin sinyal aktivasyon süresi, ABH sonrası sürecin belirlenmesinde rol oynamaktadır (5).

Wnt sinyalinin sürekli olarak aktive olması, interstisyel miyofibroblast aktivasyonu ve hücre dışı matris birikimi gözlenen akut böbrek hasarının kronik böbrek hasarına ilerlemesine sebep olmaktadır. Yapılan çalışmalarda, ileri KBH olan hastalarda inflamatuvar ve oksidatif sinyal yollarının aktivasyonu ve Wnt1, 2, 2b, 3, 4, 5a, 6, 7a, 7b, 8a, 8b, 9a, 9b, 10a ve 16 olmak üzere 15 Wnt geninin de belirgin şekilde yukarı regülasyonu gözlenmiştir. Bununla birlikte Wnt10b'nin anlamlı derecede aşağı regüle edildiği ve ileri KBH'li hastalarda Wnt3a'nın ifadesinin saptanmadığı belirtilmiştir. Western Blot çalışmaları sonrasında nükleer ve sitoplazmik β -katenin ve nükleer aktif β -katenin protein ifadelerinin, KBH olan hastalarda yukarı regüle olduğu gösterilmiştir. Tüm bunlar birlikte ele alındığında, bu bulgular aktive edilmiş Wnt/ β -katenin sinyal yolağının eşlik ettiği nuclear factor-erythroid-2-related factor 2 (Nrf2) aracılı antioksidan Faz 2 detoksifiye edici enzimlerin ve ilgili proteinlerin, pro-inflamatuvar, pro-oksidan ve aşağı regülasyonunun aktivasyonuna işaret etmektedir (22). Wnt

sinyalinin aktivasyonu durumunda, β -katenin renal epitelyal hücrelerde c-Myc, Twist, TCF1 ve fibronektin gibi hedef genlerin yukarı regülasyonuna neden olmaktadır (5, 23).

Kanonikal Wnt sinyal yolağı inhibe edildiğinde renal fibrozun ve matriks birikiminin azaldığı, enflamasyonun inhibe edildiği ve fare böbreklerinde makrofaj infiltrasyonunun önlendiği bildirilmiştir. Ayrıca bir endojen ekstraselüler Wnt antagonisti olan Secreted frizzled-related protein 4 (sFRP4), β -katenin aktivasyonunu inhibe eder ve reseptörlerine bağlanmasını önler. sFRP4'ün ekzojen olarak uygulanması sonrasında, farelerin böbrekteki fibrotik değişikliklerden kurtarıldığı gösterilmiştir. Bu nedenle aktif kanonikal Wnt sinyali böbrek fibrozuna neden olurken, kanonikal Wnt sinyalinin terapötik inhibisyonunun KBH ile savaşmak için etkili bir yol olabileceği düşünülmektedir (7).

Klotho, yaşlılarda ve KBH olan hastalarda böbreğin renal tübüler epitelyumunda yüksek oranda eksprese olan antiaging proteindir. Klotho'nun hem transmembran hem de çözümlenür formları, çoklu Wnt ligandları ile bağlanabilir ve hedef gen transkripsiyonunu baskılar. KBH sırasında renal Klotho azalır ve bunun arkasındaki mekanizmalar belirsizdir. Yapılan son çalışmalar Wnt/ β -katenin aktivasyonunun, Klotho'nun ifadesini engelleyerek azalmasına böbrek fonksiyonunun bozulmasına neden olabileceğini ileri sürmüşlerdir. Aşırı fosfat yüklenmesi Wnt/ β -katenin sinyal yolağının aktivasyonu yoluyla renal Klotho ekspresyonunu aşağı regüle eder, böylece vasküler kalsifikasyonun gelişmesine ve mineral metabolizmasının düzenlenmesine neden olur. Bununla birlikte doku fibrozunun ana düzenleyicisi olan TGF- β 1'in, Klotho ekspresyonunu baskılayabileceği ve eş zamanlı olarak miyofibroblast aktivasyonunu ve böbrek fibrozisini desteklemek için β -katenin'i aktive edebileceği de bildirilmiştir (5, 24).

Tedavi stratejilerini amaçlayan çalışmalarda ise Klotho'nun aşırı ekspresyonunun G2/M kontrol noktasını atlayıp fibrotik sitokin üretimini azaltarak, hücre dışı matris birikmesini azalttığı gösterilmiştir. Klotho tek taraflı üreter tıkanıklık (TÜT) ile farelerde Wnt sinyalinin aktivasyonunu engeller. Aynı zamanda böbrek epitel hücrelerinde doza bağımlı bir şekilde RAS'ın Wnt1 ile tetiklenen aktivasyonunu zayıflatır. Böylece Klotho'nun, Wnt/ β -katenin sinyalini antagonize ederek renal fibroze karşı koruduğu sonucuna varılmıştır (5, 25).

KBH'de non-kanonikal sinyal yolağının rolü, kanonikal sinyale göre iyi anlaşılammıştır. Bu yolakların eş zamanlı ilişkilerinin anlaşılması gelecekteki

araştırmalar ve terapötik gelişim için önemlidir. Ackers ve arkadaşları yaptıkları çalışmada kanonikal sinyalinin spesifik olarak, fibrozis ve KBH'de böbrek fonksiyonunda azalmaya neden olduğunu ve kanonikal sinyali engellemek için non-kanonikal sinyali arttırmanın koruyucu etki oluşturabileceğini ifade etmişlerdir (7).

Sentetik bir pirimidin olarak Wnt agonisti kullanılan farklı bir çalışmada da iskemi reperfüzyon hasarından sonra Wnt sinyalinin, enflamasyonu ve oksidatif stresi hafifleterek sıçanlarda böbrek koruyucu etkiler gösterdiği, bu nedenle böbrek hasarının önlenmesi için Wnt aktivitesinin manipülasyonunun potansiyel farmakolojik uygulamalarda kullanılabileceği gösterilmiştir (5). Bu nedenle çeşitli böbrek hastalıklarında, böbrek hasarını ve fibrotik lezyonları iyileştirmek için Wnt sinyalini manipüle etmek kabul edilebilir bir yaklaşım olabilir (21). Bu nedenlerden dolayı, Wnt/ β -katenin yolağı, KBH ile ilişkili komorbiditelerin prevelansını azaltmayı amaçlayan potansiyel bir terapötik hedef olarak araştırılmayı ve üzerinde çalışmayı gerektirmektedir (26).

2.5. Böbrek Transplantasyonunda Wnt Sinyali

Çok sayıda virüs, mantar, bakteri, alerjenler, kanserojenler ve kalıtsal genetik mutasyonlar vücuttaki çeşitli organ ve dokularda yaralanmalara neden olmaktadır. Yaralanmaların sonucunda Wnt sinyal yolağı aktive olarak doku ve organ onarımı başlatmaktadır (3).

Böbrek transplantasyonunda doku fonksiyonlarının rejenerasyonu çok önemlidir. Wnt sinyal iletimi hücrelerin ve dokuların rejenerasyonu sırasında aktif hale gelen ana yolaklardan biridir. Wnt sinyal iletiminin T lenfosit yanıtlarını ve bununla beraber nakilden sonra organların T hücresi aracılı akut ve kronik reddini önemli ölçüde etkileyebileceği bilinmektedir (2).

Kanonikal ve non-kanonikal yolakların doku onarımı aşamasında hücrel ve humoral immün yanıtlar için önemli olduğu bilinmektedir. Ayrıca bağışıklık hücrelerinde Wnt sinyali, organ transplantasyonunu takiben sıklıkla meydana gelen sitomegalovirüs enfeksiyonunun yeniden aktivasyonu ile doğrudan ilişkilidir. Doku onarımı ve bağışıklık yanıtları iyi koordine edilirse konakçı doku ve organ homeostazını başarabilir. Bu iki süreç düzensiz hale geldiğinde kronik enfeksiyonlar, kanser, otoimmün hastalıklar ve organ fibrozu gibi çoklu kronik enflamatuar hastalıklar

gelişebilir. Bu nedenle Wnt ligandlarının rolleri ve sinyal iletim yolları birçok immünolojik hastalıkta immünoterapinin önemli hedefidir (3).

2.6. Böbrek Transplantasyonundaki İmmünolojik Hücreler

2.6.1. B Hücreleri

B hücresi beyaz kan hücresi olarak tanımlanmaktadır. Birçok B hücresi, enfeksiyonlarla savaşmak için gerekli olan antikörleri üreten ve plazma hücreleri olarak adlandırılan hücrelere olgunlaşırlar. B hücreleri memelilerde büyük ölçüde kemik iliğinde olgunlaşırlar, ömürleri kısadır ve immünooglobulinlerin üretiminden sorumludurlar (27).

Wnt sinyal iletiminin B hücrelerindeki rolü henüz tam olarak anlaşılamamıştır. B hücre gelişiminin erken aşamalarında kanonikal ve non-kanonikal Wnt sinyalinin etkin olduğu ve sinyalin anormal aktivasyonu durumunda ise onkojenik komplikasyonlara neden olduğu ifade edilmektedir (13, 28).

B hücre proliferasyonunda, Wnt sinyalinin LEF1 yolu ile düzenlendiği bilinmektedir. LEF1 eksikliği olan farelerin pro-B hücre proliferasyonlarında ve bu hücrelerin sağkalımında sorunlar meydana geldiği gözlenmiştir. Artan c-Myc ve Fas transkripsiyonu nedeniyle apoptoza duyarlılık artmaktadır. Benzer şekilde, timusta non-kanonikal Wnt sinyali ve Wnt5a arasında bir antagonizma vardır. Nedeni ise, Wnt5a non-kanonikal sinyal yolağında aktiftir, böylece B hücrelerinin çoğalması engellenmektedir. Diğer yandan, wild-type Wnt5a allelinin olmaması fare çalışmalarında B hücre lenfomaları ve klonal miyeloid lösemiye indüklemiştir. (13, 29).

2.6.2. T Hücreleri

T hücreleri CD4⁺ ve CD8⁺ T hücre aracılı kazanılmış immün yanıtlarda önemli görevleri olan bir lenfosit türüdür. Enfeksiyon durumunda naif T hücreleri sitotoksiste yoluyla patojenlere zarar veren ve ayrıca gelecekte meydana gelebilecek herhangi bir enfeksiyona daha etkin ve güçlü yanıt vermek için bellek T hücrelerini oluşturan T efektör hücrelerinin gelişimini tetiklemektedir. Bellek T hücreleri IL-7 ve IL-15 salgılanarak efektör T hücrelerinin aktivitesini antijenden bağımsız olarak regüle ederler (13).

T hücresinin gelişimi ve düzenlenmesinde katkıda bulunan yolaklar arasında Wnt sinyali de bulunmaktadır. Bu verinin ilk kanıtları, timustaki T hücre gelişimi üzerine

yapılan çalışmalarda ortaya konmuş ve timosit gelişiminde bu sinyal yolağının gerekli olduğu gösterilmiştir (13).

Wnt/ β -katenin sinyal iletimi T hücre farklılaşması, efektör fonksiyonları ve hücre göçü için gereklidir. TCF-1/ β -katenin sinyal aktivasyonu, CD8⁺ T hücrelerinin oluşumuna neden olabilmektedir. Naif CD8⁺ T hücreleri, efektör T hücrelerine farklılaşır ve tümör-immünite döngüsünde tümör hücrelerini öldürebilmektedir. Ayrıca bellek T hücrelerinin aktivasyonu anti-tümör bağışıklığını korumak açısından son derece önemlidir. Farklılaşmamış CD8⁺ T ve bellek CD8⁺ T hücrelerinde Wnt/ β -katenin sinyal iletiminin aşırı aktivasyonunun olduğu ve TCF-1'in yüksek derecede eksprese edildiği gözlenirken, naif CD8⁺ T hücreleri efektör CD8⁺ T hücrelerine farklılaştığında TCF-1'in aşağı regüle olduğu belirtilmiştir (30). Wnt3a'nın β -katenin ve AT'ce zengin dizi bağlayıcı protein 1 (SATB1) ile Th2 hücre farklılaşmasını aktive ettiği bilinmektedir. Aksine, Th17 hücrelerinin tümörleri elimine ettiği ve erken bellek CD8⁺ T hücrelerine benzer özellikler gösterirken çok sayıda TCF7 ve β -katenin eksprese ettiği gösterilmiştir (13, 31).

CD4⁺ T hücreleri, Tfh ve Treg hücreleri dahil olmak üzere (Th1, Th2, Th17) beş yardımcı T hücre tipine ayrılmaktadır. Foliküler yardımcı T hücreleri, humoral bağışıklık için önemlidir. Wnt sinyal iletiminin bu hücreler üzerindeki etkinliği incelendiğinde; insan kordon kanından elde edilen saf CD4⁺ T hücrelerinde Wnt3a'nın β -katenin'e ek olarak kromatin organizatörü SATB1 (Özel AT açısından zengin dizi bağlayıcı protein 1) aracılığı ile Th2 hücre farklılaşmasını desteklediği bildirilmiştir. Spesifik olarak hem TCF-1 hem de LEF-1, naif CD4⁺ T hücrelerinin IL-6Ra ve gp130'un ekspresyonu ile hücre farklılaşmasının erken safhasında Tfh hücrelerine dönüşmesinde rol aldığı bilinmektedir (3). Kemokin ligandı CXCL'nin mikrodizi analizi sayesinde, insan CD4⁺ T hücrelerinde Wnt5a ekspresyonunun T hücre göçü için gerekli olduğu ispatlanmıştır (13).

Bununla birlikte, CD4⁺ T hücrelerinde Wnt sinyalinin rolü Th1 ve Th2 hücrelerinin oluşumu ve işlevinde biraz tartışmalıdır. Fakat bu durum Th17 ve Treg hücrelerinde ise tam tersidir. Biyokimya, moleküler biyoloji, genetik, fonksiyon kaybı ve kazancı çalışmalarını birleştiren en güvenilir derlemeler proinflamatuvar Th17 hücrelerinin Wnt sinyali ile ilişkili olduğunu ve Treg hücrelerinin inhibe edildiğini ortaya koymuştur (2). Treg hücreleri lenf düğümlerinde T hücrelerine müdahale edip nakil reddinde önemli rollere sahiptir. Ek olarak Treg hücreleri efektör T hücrelerinin antijen sunan hücreler

ile stabil temas oluşturma kabiliyetini sınırlandırarak T hücre aktivasyonunu kısıtlayabilir (2). Antijen aktivasyonundan sonra naif CD4⁺ T hücreleri farklı sitokin tipleri salgılayan yardımcı T hücre (Th) popülasyonlarına polarize olurlar. Klasik olarak, CD4⁺ T hücre polarizasyonu, T hücrelerin antijen ile karşılaşması sırasında sitokinler tarafından tetiklenen çeşitli bir takım transkripsiyonel faktörlerin bir sonucu olarak ortaya çıkmaktadır. Bununla birlikte, Wnt proteinlerinin naif CD4⁺ T hücrelerinin soy ağacında farklı seçimleri etkileyebileceği gösterilmiştir (4).

Ana transkripsiyon faktörü GATA bağlayıcı protein 3'ün kontrolü altında IL-4 ve IL-13 eksprese eden Th2 hücrelerinin farklılaşmasında Wnt/ β -katenin sinyal yolağının aktif bir rolü vardır. Yapılan çalışmalarda Th2 polarizasyonu uygulanan CD4⁺ T hücrelerinde Wnt'e bağlı β -katenin birikimi gözlenmiştir. Wnt antagonisti Dkk1 ve siRNA aracılığı ile Wnt sinyalinin bloke edilmesi Gata3'ün ekspresyonunun azalmasına ve düşük seviyelerdeki Th2 sitokin sekresyonuna yol açmaktadır. Tam tersine stabilize edilmiş β -katenin'in aşırı ekspresyonunun Gata3 transkripsiyonunu ve IL-4 üretimini arttırdığı bulunmuştur. Tüm bu sonuçlar Wnt sinyalinin Gata3 ekspresyonunu teşvik ederek Th2 polarizasyonunu kritik bir şekilde düzenlediğini göstermektedir (4, 32).

Yeni çalışmalar Wnt/ β -katenin sinyal yolağının T hücre sağ kalımı ve soy kaderinin belirlenmesi dahil olmak üzere CD4⁺ T hücre biyolojisinin kontrolünde kritik rolü olduğunu göstermektedir. Wnt sinyalinin Th1'in polarizasyonu ile Th2'yi destekleyeceği ve nTreg'in kalıcılığını arttırabileceği açıktır. Fakat diğer CD4⁺ T hücre alt kümelerinin fonksiyonu ve farklılaşması üzerindeki etkisi daha araştırılmaya devam edilmektedir (4).

Wnt/ β -katenin sinyali ayrıca CD4⁺ T hücre farklılaşmasını düzenlemektedir. TCF-1 ve β -katenin, Th2 ana transkripsiyon faktörü GATA bağlayıcı protein 3'ün (GATA3) ekspresyonunun AT zengin dizi bağlayıcı protein (SATB1) ile aktivasyonu sonucunda Th2 polarizasyonunu arttırmaktadır. Bunlar T hücre gelişiminde çok önemli roller alan kromatin düzenleyici proteinlerdir. Yapılan bir çalışmada, fare timosit CD4⁺ T hücrelerinde β -katenin'in sürekli aktivasyonunun Th17 polarizasyonunu yukarı regüle ettiği ve sonuç olarak tümör oluşumunu destekleyen proenflamatuar sitokinlerin üretimiyle sonuçlandığı bildirilmiştir. Genel olarak, naif CD4⁺ T hücrelerinde Th1 ve Th17 hücrelerine farklılaşma inhibe edilirken, Th2 ve Tfh alt gruplarına farklılaşma TCF-1 tarafından teşvik edilir. Ayrıca, TCF-1'in etkilerinin aksine her T hücre farklılaşması ve fonksiyonu β -katenin ekspresyonu ile arttırılmaktadır (30).

Son yıllarda, Wnt sinyal yolağının hematopoietik kök hücre (HKH) fonksiyonunun düzenlenmesinde ve timusta olgunlaşmamış timositlere proliferasyon sinyali sağlayarak gelişiminde önemli rol oynadığı bildirilmiştir. Deneysel çalışmalarda, pro-enflamatuar Th17 hücrelerinin işlevlerinin Wnt sinyali ile desteklendiğini, Treg'lerin ise kanonikal Wnt sinyali ile engellendiğini ortaya koymuşlardır. Bu anlamda, bazı Th17 hücrelerinin uzun ömürlü oldukları ve kendi kendini yenilemeleri için yüksek seviyelerde TCF-1 ve β -katenin eksprese ettikleri bildirilmiştir (2, 33). Yapılan bir çalışmada, Wnt sinyalinin doğrudan Foxp3 aktivitesini ve dolayısıyla Treg fonksiyonunu modüle ettiği gösterilmiştir (33, 34). TCF1, Foxp3'e doğrudan bağlanmaktadır ve β -katenin-TCF, Foxp3 transkripsiyonel aktivitesini inhibe etmektedir. Böylece Treg aracılı baskıyı in vitro ve in vivo azaltmaktadır. Tüm bu veriler kanonikal Wnt sinyalinin Th17 ile Treg arasındaki dengeyi yönetmede muhtemelen ana düzenleyici bir etkiye sahip olduğunu göstermektedir ve böylece immün yanıtların sonucunu etkilemektedir. Bu nedenle hem kanonikal hem de non-kanonikal Wnt sinyali, toleransa karşı bağışıklığa aracılık etmede çok önemli rol oynamaktadır. Wnt sinyalinin bloke edilmesi, tümör aracılı immün supresyonunun üstesinden gelmek ve immünoterapiyi iyileştirmek için çekici bir terapötik hedef olarak görülmektedir (33).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Araştırmanın Tipi

Araştırmamız deneysel ve tanımlayıcı bir çalışmadır.

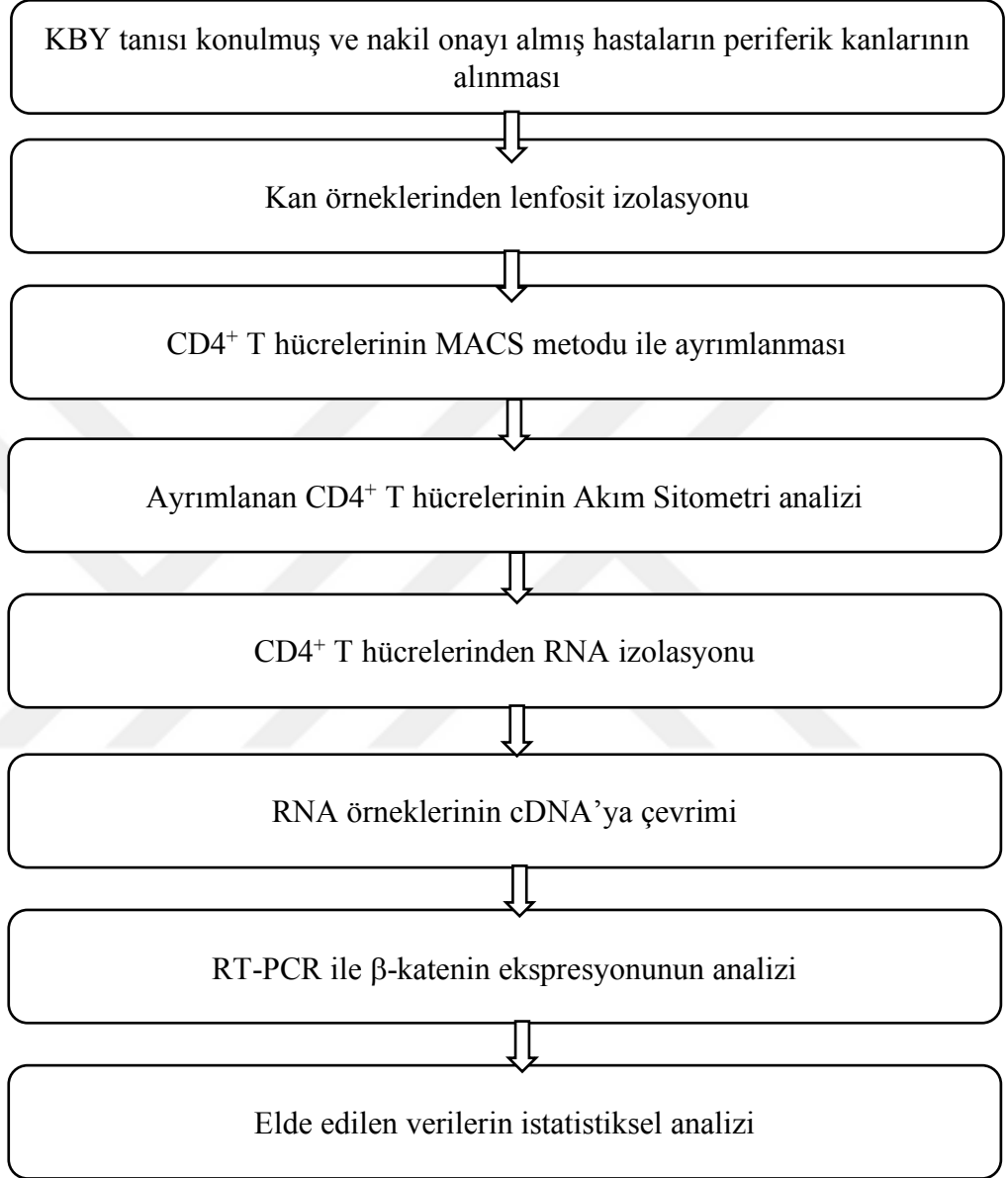
3.2. Araştırmanın Örneklemi

Araştırmamızın örneklemi; İzmir Bozyaka Eğitim ve Araştırma Hastanesi Organ nakli birimine başvuran, Uluslararası Çalışma Tanı Kriterlerine göre Kronik Böbrek Yetmezliği (KBY) tanısı konulan ve bu birimce böbrek nakline karar verilen 25 (>18 yaş) hastadan oluşmaktadır.

3.3. Deney Kurgusu

Araştırmamızda 25 hastanın böbrek nakli öncesi ve nakil sonrasındaki 6. ayında alınan periferik kanları kullanıldı ve çalışmalar Aralık 2018-Ağustos 2020 tarihleri arasında İzmir Kâtip Çelebi Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarında gerçekleştirildi. KBY hastalarında nakil öncesi ve sonrasında Wnt sinyal iletiminde majör rol alan β -katenin'in ekspresyon değişimlerinin incelenmesi amacı ile yapılan araştırmamızda iş akış şeması Şekil 3'te gösterilmiştir.

Şekil 3: İş akış düzeni



3.4. Veri Toplama Araçları

3.4.1. Kullanılan Cihazlar

Tablo 1: Araştırmada kullanılan cihazlar.

Cihaz İsmi	Marka/Model	Kullanım Amacı
MACS Quadro Cihazı	Miltenyi Biotec	CD4 ⁺ T Hücre ayırlama
Vorteks	FinePCR & Wisemix	CD4 ⁺ T Hücre ayırlama
Santrifüj	HETTICH	CD4 ⁺ T Hücre ayırlama
Santrifüj	Hermle	Lenfosit izolasyonu
Akım sitometri	FACS Calibur	Akım Sitometri Analizi
Nanodrop	Thermo-Scientific Nanodrop 2000	RNA miktar tayini
Termal Cyclus	Boeco Thermal Cyclus	cDNA sentezi
RT-PCR Cihazı	ABI Applied Biosystem Step One Plus RT-PCR	Ekspresyon analizi

3.4.2. Kullanılan Sarf Malzemeler

Tablo 2: Araştırmada kullanılan sarf malzemeler

Malzeme İsmi	Kullanım Amacı
Fosfat tuz tamponu (PBS)	Lenfosit izolasyonu
Fikol	Lenfosit izolasyonu
50 ml'lik polipropilen tüp	Lenfosit izolasyonu
15 ml'lik polipropilen tüp	Lenfosit izolasyonu

Pastör pipet	Lenfosit izolasyonu
BSA Stok solüsyonu	CD4 ⁺ T Hücre ayırlama
Durulama solüsyonu	CD4 ⁺ T Hücre ayırlama
LS ayırlama kolunu	CD4 ⁺ T Hücre ayırlama
CD4 ⁺ mikro boncuk	CD4 ⁺ T Hücre ayırlama
5 ml polistren tüp	Akım Sitometri Analizi
CD4 ⁺ FITC antikor	Akım Sitometri Analizi
CD45 ⁺ PerCP	Akım Sitometri Analizi
İzolasyon kiti Kit içeriği(Tampon RLT, Yıkama tamponu RPE, RNaz içermeyen su, RNeasy mini spin kolon, Yıkama tamponu RW1, Toplama tüpleri, gDNA eliminasyon mini spin kolon)	RNA izolasyonu RNeasy Plus Mini Kit Lot no: 154048034
Etil alkol (%70)	RNA izolasyonu
PCR tüpü	cDNA sentezi
Sentez kiti Kit içeriği (Nuclease-free water, M-MuLV Enzyme Mix, M-MuLV Reaction Mix, Oligo d(T) ₂₃ VN, Random Primer Mix)	cDNA sentezi ProtoScript First Strand cDNA Synthesis Kit Lot no: 0041505
RT-PCR kiti Kit içeriği (Luna Universal qPCR Master Mix)	RT-PCR Luna® Universal qPCR Master Mix Lot no: 10031950

3.5. Veri Toplama Yöntemleri

3.5.1. Periferik Kandan Lenfosit İzolasyonu

Lenfosit izolasyonu için 25 hastanın böbrek nakli öncesi ve nakil sonrasındaki 6. ayında alınan 40 ml periferik kanları kullanıldı. Aşağıda sıralanan yöntem basamakları ile periferik kandan lenfosit izolasyonu yapıldı.

1. Hastalardan alınan 40 ml periferik kan 1/1 oranında PBS ile seyreltildi.
2. Faz ayrımı sağlayan fikol en az 5 ml olmak üzere 8 adet 15 ml'lik falkon tüplere konuldu ve üzerlerine seyreltmiş olduğumuz PBS-periferik kan karışımından 10 ml, faz ayrımını bozmayacak şekilde yavaş yavaş eklendi.
3. 20 dakika 2500 rpm'de santrifüj edildi.
4. Santrifüj sonunda orta kısımda bir faz ayrımı gerçekleşti. Bulut (buffy coat) diye tabir edilen kısım diğer fazlar ile etkileşime girmeden ve ayırım tabakasını bozmadan titiz bir şekilde yine 15 ml'lik falkon tüplere toplandı.
5. Elde ettiğimiz bulut kısmında beyaz kan hücrelerini diğer kan hücreleri ve hücre kalıntılarından ayırmak için yıkama işlemi gerçekleştirildi. Yıkama işlemi PBS ile yapıldı. 1800 rpm'de 5 dakikada santrifüj edildi.
6. Santrifüj sonrasında sıvı kısım atıldı ve pellet üzerine 5 ml PBS eklendi, böylece büyük bölümü lenfosit olan beyaz kan hücreleri elde edilmiş oldu.
7. Beyaz kan hücreleri elde edildikten sonra yoğunluklarını belirlemek için Thoma lamında lenfosit sayımı gerçekleştirildi.
8. Beyaz kan hücre süspansiyonundan 5-10 µl alındı ve Thoma lamına aktarılarak sayım gerçekleştirildi.
9. Hücre sayısını belirlemek için kullanılan formül:
Hücre sayısı/ml= Hücre sayısı x 4 (lam üzerindeki 4 büyük kare) x 10⁴ şeklindedir.
10. Araştırmamızda ortalama 10⁷ hücre/ml bulunan hücre solüsyonu kullanıldı.

3.5.2. CD4⁺ T Hücrelerinin Manyetik Hücre Ayrımlama Metodu (MACS) İle Ayrılması

Elde ettiğimiz lenfositlerden manyetik hücre ayrılama metodu (MACS) ile hücrelerin antijenik özelliklerine göre CD4⁺ T hücreleri ayrımlandı. Bu metodu uygularken aşağıda sıralanan yöntem basamakları takip edildi.

1. Lenfosit solüsyonu 1500 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatant kısmı atıldı ve pellet ile devam edildi. Kontrol amacı ile tekrar hücre sayımı gerçekleştirildi. Ortalama 10^7 hücre/ml olarak teyit edildi.
2. BSA stok solüsyonu (1/20) ve durulama solüsyonları birleştirilerek yıkama solüsyonu elde edildi ve 80 µl hücre süspansiyonundan bu yıkama solüsyonuna eklendi.
3. 30 µl $CD4^+$ mikro boncukları bu süspansiyona eklendi ve homojenizasyon için pipetleme yapıldı. 15 dakika $+4^{\circ}C$ 'de inkübasyona bırakıldı.
4. İnkübasyon sonrasında 2 ml yıkama solüsyonu hücrelerimizin ve $CD4^+$ mikro boncuklarımızın bulunduğu karşıma eklenerek 1500 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi.
5. Daha önceki basamaklarda olduğu gibi süpernatant kısmı atıldı ve pellet üstüne 500 µl yıkama solüsyonu eklendi, karıştırıldı ve homojenize edildi.
6. LS kolonunu kullanmadan önce 3 ml yıkama solüsyonu kolona uygulandı ve sonrasında 500 µl'lik hücrelerimizin bulunduğu solüsyon kolondan geçirildi. Akış için kolona 3 kere 3 ml yıkama solüsyonu beslemesi yapıldı.
7. Son olarak kolona 5 ml yıkama solüsyonu eklenerek $CD4^+$ hücrelerimiz steril falkon tüplere alındı.
8. Süspansiyonumuz 1800 rpm'de 5 dakika ve 1200 rpm'de 5 dakika olmak üzere santrifüj edildi. Süpernatant atıldı. Elde ettiğimiz pelletin üzerine 650 µl PBS eklendi. 200 µl RNA izolasyonu için 50 µl de MACS ile ayrımlanan $CD4^+$ T hücrelerinin akım sitometri analizi ile karakterizasyonunu yapmak için ayrıldı.

3.5.3. Akım Sitometri Analizi

$CD4^+$ T hücrelerinin karakterlerini ve saflığını kontrol etmek için akım sitometri analizleri aşağıda sıralanan basamaklara göre gerçekleştirildi.

1. MACS yöntemi ile ayrımlanarak elde edilen hücre süspansiyonu 5 ml'lik tüpe aktarıldı.
2. Süspansiyon üzerine 5 µl $CD4^+$ FITC ve 5 µl $CD45^+$ PerCP antijenlere spesifik antikör boyaları eklendi. Homojenizasyon için vortekslendi ve 30 dakika karanlıkta inkübasyona alındı.

3. İstenmeyen hücre artıklarını uzaklaştırmak adına tüpe 1000 µl PBS eklenerek 1900 rpm'de 5 dakika santrifüjlenerek yıkama yapıldı.
4. Üzerindeki yıkama sıvısı atılarak 500 µl PBS eklenip akım sitometri cihazında okutularak analizi gerçekleştirildi.

3.5.4. RNA İzolasyonu

Ayrımlanan CD4⁺ T hücrelerinden RNA izolasyonu yapıldı. Bu aşamada Qiagen RNA izolasyon kiti (RNeasy Plus Mini Kit Lot: 154048034) kullanıldı. Qiagen firmasının önerdiği şekilde aşağıda verilen işlem basamakları uygulandı.

1. RNA izolasyonu için ayırdığımız 200 µl CD4⁺ T hücre süspansiyonu 1800 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant kısmı atıldı. Kalan pellet üzerine 350 µl RTL tamponu eklendi ve 30 saniye süreyle vorteks uygulandı.
2. Elde edilen lizat gDNA eliminasyon spin kolona alındı ve 30 saniye 8500 rpm'de santrifüj edildi. Sonrasında dipte kalan sıvıya 350 µl %70'lik etanol eklenerek homojenizasyon sağlandı.
3. Oluşan 700 µl solüsyon RNeasy mini spin kolona eklendi. 15 saniye 8500 rpm'de santrifüj uygulandı ve sıvı kısım uzaklaştırıldı.
4. 700 µl RW1 tamponu eklenerek 15 saniye 8500 rpm'de santrifüj edildi ve sıvı kısım uzaklaştırıldı.
5. 500 µl RPE tamponu eklenerek 15 saniye 8500 rpm'de santrifüj edildi ve sıvı kısım uzaklaştırıldı.
6. 500 µl PRE tamponu eklenerek 2 dakika 8500 rpm'de santrifüj edildi ve sıvı kısım uzaklaştırıldı.
7. Tampon eklenmeden tekrar 11000 rpm'de 1 dakika santrifüj uygulandı.
8. Filtreli kısım yeni 1.5 ml ependorf tüp içerisine alınarak 50 µl RNaz içermeyen su eklendi. 1 dakika 8500 rpm'de santrifüj edildi.
9. Alt tabakada bulunan sıvı, RNA'nın bulunduğu sıvıdır. Nanodropta konsantrasyon ve saflığı ölçüldü. İhtiyaç dahilinde kullanılmak için -80 °C'ye kaldırıldı.

3.5.5. RNA Miktarının Belirlenmesi

RNA miktar tayini için nanodrop cihazı kullanıldı. İzolasyonu yapılan RNA'dan 1.5 µl alınıp 260-280 nanometrede absorban ölçüldü. RNA konsantrasyonu ve saflığı tayin edildi. RNA için saflık derecesi 1.8-2 arasında olması gerektiğinden çıkan değerler bu aralıkta değerlendirildi.

3.5.6. Komplementer DNA (cDNA) Sentezi

Uygun saflıkta izole edilen RNA'lar komplementer DNA (complementer DNA=cDNA) eldesi reaksiyonları için kalıp olarak kullanıldı. Bu aşamada BioLabs cDNA sentez kiti (ProtoScript First Strand cDNA Synthesis Kit Lot: 0041505) kullanıldı. Kit protokolüne uygun olarak aşağıdaki basamaklar uygulandı.

Tablo 3: Kit içeriği ve reaksiyon miktarları

İçerik	Miktar
Total RNA	6 µl
Oligo d(T) ₂₃ VN	2 µl
M-MuLV Reaction Mix	10 µl
M-MuLV Enzyme Mix	2 µl

1. Elde edilen RNA'lar 6 µl olmak üzere kit içeriğindeki Oligo d(T)₂₃ VN ile 70°C'de 5 dakika inkübe edildi.
2. İnkübasyon sonrasında örnekler buz üzerinde minimum 2-3 dakika bekletildi.
3. Bu karışımın üzerine 10 µl "M-MuLV Reaction Mix" ve 2 µl "M-MuLV Enzyme Mix" ilave edildi ve pipetaj yapıldı.
4. Elde ettiğimiz 20 µl karışım, 42°C'de 1 saat ve 80°C'de 5 dakika olmak üzere Termal Cycler cihazına koyuldu.
5. Reaksiyon sonunda elde ettiğimiz cDNA'lar etiketlenip Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu'nda (RT-PCR) kullanılmak üzere -20°C'de saklandı.

3.5.7. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR)

Elde edilen cDNA'lar ilgilenilen mRNA'ların göreceli kantitasyonunu belirlemek için kalıp olarak kullanıldı. mRNA ekspresyon primerleri aracılığı ile Gerçek

Zamanlı Polimeraz Zincir cihazında 3 tekrarlı reaksiyon kuruldu. Bu aşamada muamelelerden bağımsız ve bütün hücrelerde eşit eksprese olduğu kabul edilen β -aktin kontrol referans gen olarak kullanıldı. İşlemler Gerçek Zamanlı PCR, ABI Applied Biosystems Step One Plus RT-PCR cihazı ve Luna® Universal qPCR Master Mix SYBR Green kiti kullanılarak yapıldı. β -Aktin ve β -Katenin ekspresyon primerleri kullanıldı.

Tablo 4: β -Aktin primerleri

β -Aktin F:	5'-CTTCCTGGGCATGGAGTCCTG-3'
β -Aktin R:	5'-GGAGCAATGATCTTGATCTTC-3'

Tablo 5: β -Katenin primerleri

β -Katenin F:	5'-TCTGAGGACAAGCCACAAGATTACA-3'
β -Katenin R:	5'-TGGGCACCAATATCAAGTCCAA-3'

Reaksiyon için kit protokolüne uygun olarak aşağıdaki basamaklar uygulandı.

1. Kit içeriğinden çıkan Luna Universal qPCR Master Mix, dH₂O ve primerler ile Tablo 4’te gösterilen oranlarda karışım oluşturuldu.
2. Elde edilen karışım çoklu pipet yardımıyla 96 kuyucuklu plate’e dağıtıldı.
3. Sırasıyla nakil öncesi ve nakil sonrası örnekleri β -Aktin bulunan ve β -Katenin bulunun kuyulara eklendi.
4. Plate’in üzeri seal ile kapatılarak Tablo 5’te belirtilen ısı profilleri ile reaksiyon gerçekleştirildi.

Tablo 6: RT-PCR Reaksiyon İçerikleri

cDNA	2 μ l
Primerler (F/R)	0.5/0.5 μ l
Luna Universal qPCR Master Mix	10 μ l
dH ₂ O	7 μ l

Tablo 7: RT-PCR Isı Döngüleri

	Sıcaklık	Süre	Döngü
İlk Denatürasyon	95 °C	60 s	1
Denatürasyon	95 °C	15 s	40
Uzama	60 °C	30 s	
Erime Eğrisi	60 °C	60 s	1

Floresan ölçümleri Light Cycler Software 4.0.0.23 (Roche Diagnostic) tarafından yapıldı.

3.6. Verilerin Analizi

Hastaların klinik verileri IBM SPSS Statistics 22.0.0.0 programı kullanılarak analiz edildi. Hasta örneklerinde nakil öncesi ve nakil sonrası 6. ay β -katenin ekspresyon düzeyleri <https://www.qiagen.com/tr/shop/genes-and-pathways/data-analysis-center-overview-page/rt2-primer-assay-data-analysis-center/?instrument=R> web sayfasında bulunan “Geneglobe Data Analysis Center- RT2 Primer Assay” software programı kullanılarak analiz edildi.

3.7. Etik İzinler

Araştırmamızda çalışılan 25 hastanın böbrek nakli öncesi ve nakil sonrası 6. ay kan örnekleri İzmir Kâtip Çelebi Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu 08.06.2016 tarihli ve 55 karar numaralı iznine ek olarak İzmir Kâtip Çelebi Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu 10.10.2018 tarihli ve 335 karar numaralı izni ile etik ve bilimsel açıdan sakınca bulunmadığına karar verilmiştir (EK1).

4. BULGULAR

4.1. Araştırmada Kullanılan Hastaların ve Donörlerin Demografik Bilgileri

Araştırmamızda kullanılan 25 tane hasta ve donörün demografik bilgileri Tablo 8’de verildi.

Tablo 8: Kullanılan hasta ve donörlerin demografik bilgileri

	Hasta Cinsiyeti	Donör Cinsiyeti	Hasta Yaşı	Donör Yaşı	Kan Grubu	Donör Tipi
1	Erkek	Erkek	30	58	0 Rh-	Canlı
2	Kadın	Erkek	51	57	A Rh+	Kadavra
3	Kadın	Erkek	41	48	-	Canlı
4	Kadın	Erkek	37	57	A Rh+	Kadavra
5	Erkek	Kadın	55	54	-	Canlı
6	Erkek	Kadın	49	29	-	Canlı
7	Erkek	Erkek	65	37	-	Canlı
8	Erkek	Erkek	42	27	0 Rh+	Kadavra
9	Erkek	Erkek	51	58	0 Rh+	Kadavra
10	Kadın	Kadın	40	58	A Rh+	Kadavra
11	Erkek	Kadın	61	33	-	Canlı
12	Erkek	Erkek	47	21	B Rh+	Kadavra
13	Erkek	Erkek	49	18	A Rh+	Kadavra
14	Erkek	Erkek	50	58	A Rh+	Kadavra
15	Kadın	Erkek	52	25	A Rh+	Kadavra
16	Kadın	Erkek	52	64	0 Rh+	Kadavra
17	Kadın	Erkek	43	28	0 Rh+	Kadavra
18	Erkek	Kadın	35	60	-	Canlı
19	Erkek	Erkek	47	28	0 Rh+	Kadavra
20	Erkek	Erkek	25	29	0 Rh+	Canlı
21	Erkek	Kadın	21	48	-	Canlı
22	Erkek	Kadın	22	30	-	Canlı
23	Erkek	Kadın	50	46	-	Canlı
24	Erkek	Kadın	52	32	-	Canlı
25	Kadın	Kadın	34	25	-	Canlı

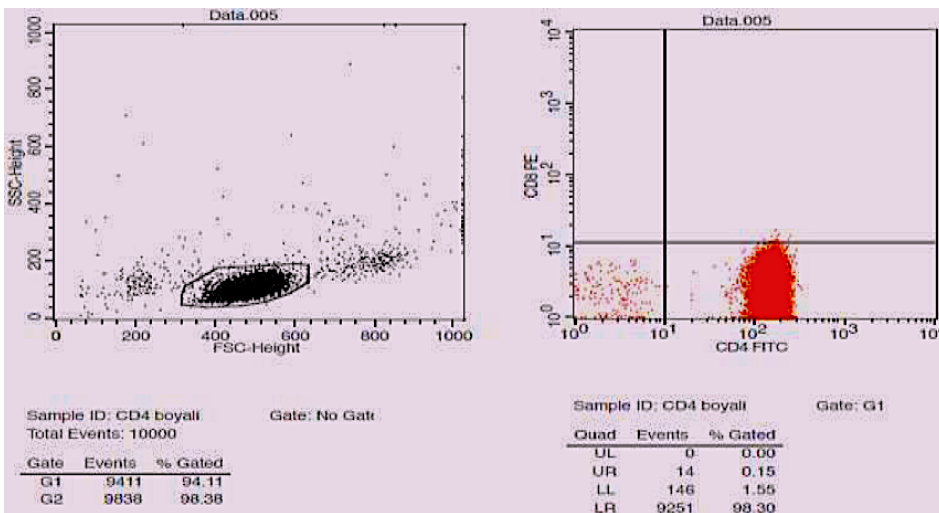
Araştırmamızda donör tiplerine göre canlı ve kadavra olmak üzere iki tip nakil işlemi uygulandı. Çalışmada kadavradan nakil olan 12 hasta, canlı nakil olan 13 hasta bulunmaktadır. Çalışmaya dahil edilen hastaların 8'i kadın, 17'si erkektir. Hastaların yaş ortalaması aralığı 21-65, yaş ortalaması 44.04'tür. Hasta erkeklerin yaş ortalaması 44.17, hasta kadınların yaş ortalaması 43.75'tir. Bunun yanında kadavradan nakil olan hastaların yaş ortalaması 46.75, canlı nakil hastalarının yaş ortalaması ise 41.53'tür. Donör verilerinde ise, donör yaş ortalaması 41.12'dir, donörlerin yaş ortalaması aralığı ise 18-64'tür.

4.2. Araştırmamızda Kullanılan Hastaların β -Katenin Ekspresyon Düzeylerinin Belirlenmesi

Araştırmamızda hastaların nakil öncesinde ve nakil sonrasında β -katenin geninin ekspresyon değerindeki değişimleri gözlemlemek için ekspresyon analizi yapıldı. Araştırmamıza konu olan β -katenin gen dizisinin verileri NCBI (National Center for Biotechnology Information)'dan alındı. β -katenin geninin başlıca bilgileri: Homo sapiens, CTNNB1, Chromosome 3-NC_000003.12'dir.

4.2.1. Kullanılan Hastalardan $CD4^+$ T Hücrelerinin Eldesi ve Saflığı

Kullanılan hastalardan nakil öncesi ve nakil sonrası olmak üzere kan alındı. Alınan bu kan örneklerinden lenfosit izolasyonu gerçekleştirildi. Bu aşamada kullanılan MACS yöntemi sayesinde $CD4^+$ T Hücreleri ayrımlandı. Elde edilen T hücrelerinin saflığını kontrol etmek amacı ile akım sitometri cihazında analiz edildi.



Şekil 4: $CD4^+$ T Hücrelerinin Akım Sitometrisi'nde analizi (35)

Burada ayrımlanan tüm hücrelerin %95-98 saflık aralığında bulunduğu gözlemlendi (Şekil 4). Hücreler ayrımlandıktan sonra RNA izolasyonu yapıldı. Tüm RNA'ların Thermo-Scientific Nanodrop 2000 cihazı ile spektrofotometrik analizleri yapıldı. Saflık değerlerinin 1.8-2.0 aralığında olduğu gösterildi.

4.2.2. Hastaların β -Katenin Gen Ekspresyon Değişimleri

Hasta örnekleri, ABI Applied Biosystem Step One Plus RT-PCR kullanılarak reaksiyonlar 3 tekrar olarak gerçekleştirildi. Reaksiyonlar sonucunda RT-PCR cihazı bize örneklerin Ct değerlerini verdi. Bu değerler kullanılarak hastaların nakil öncesi ve nakil sonrası β -Katenin ekspresyon değişimleri hesaplandı. Bu aşamada <https://geneglobe.qiagen.com/tr/analyze/> web sayfasındaki “RT² Profiler PCR Arrays & Assays” alt sekmesi kullanıldı. Kullanılan arayüzde verilerimiz aritmetik ortalamaya göre düzenlendi ve Ct cut-off değeri 35 alındı. Kontrol amacı ile veriler manuel olarak, nakil öncesi ve nakil sonrası Ct değerleri ile $2^{[-\text{delta delta Ct}]}$ metodu kullanılarak da hesaplandı. Normalize edilmiş değer 1 olarak kabul edildi. $2^{-\Delta\Delta Ct}$ sonucu 1’den büyük ise ekspresyonun arttığını göstermektedir. 1’den küçük olduğu durumda ekspresyonun azaldığı, 1’e eşit olduğu durumda ise ekspresyon değişiminin olmadığını göstermektedir. Tablo 9’da β -Katenin geninin nakil öncesi ve sonrasına kıyasla ekspresyon değerleri, ekspresyon kat artışları ve Ct değerleri verildi.

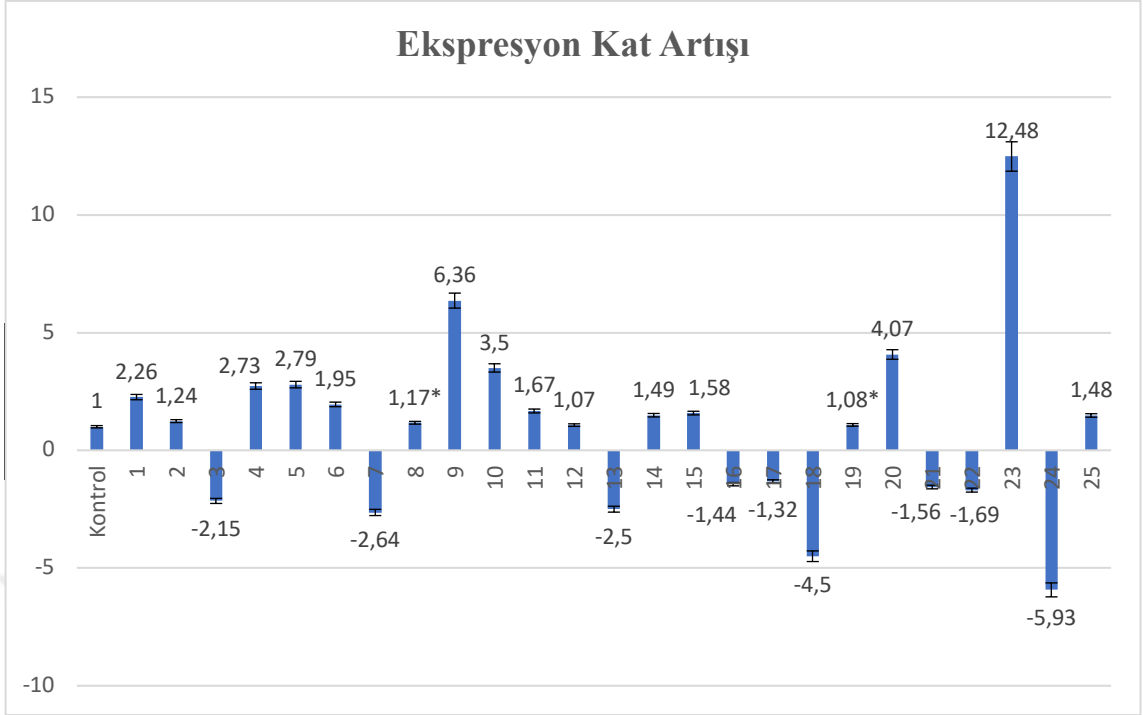
Tablo 9: β -Katenin RT-PCR Sonuçları

	NÖ β -Katenin Ct değeri	NS β -Katenin Ct değeri	NS hastaların NÖ’ne göre β -Katenin ekspresyon değişim değeri	NS hastaların NÖ’ye göre β -Katenin ekspresyon kat artışı
1	27,25	29,26	2,26	2,26
2	27,71	32,08	1,24	1,24
3	27,54	30,65	0,47	-2,15
4	28,03	31,61	2,73	2,73
5	26,99	28,85	2,79	2,79
6	26,61	31,38	1,95	1,95
7	27,81	26,26	0,38	-2,64

8	27,74	29,15	1,17	1,17
9	25,04	33,00	6,36	6,36
10	26,68	32,86	3,50	3,50
11	27,73	36,23	1,67	1,67
12	27,10	27,55	1,07	1,07
13	24,71	28,20	0,40	-2,5
14	25,92	28,92	1,49	1,49
15	29,20	34,55	1,58	1,58
16	29,87	30,07	0,69	-1,44
17	31,73	28,23	0,76	-1,32
18	27,61	28,51	0,22	-4,5
19	31,17	32,17	1,08	1,08
20	27,00	29,97	4,07	4,07
21	28,78	28,88	0,64	-1,56
22	27,29	28,23	0,59	-1,69
23	29,27	36,25	12,48	12,48
24	34,48	27,19	0,17	-5,93
25	33,62	34,18	1,48	1,48

NÖ: Nakil Öncesi NS: Nakil Sonrası

8 numaralı hastada 5. gün renal ven trombozuna bağlı greft nefrektomi meydana geldiği, 19 numaralı hastada ise 1. ay greft nefrektomi sonucu greft kaybı meydana geldiği için 6. ayda alınan verilerin sağlıklı olmayacağına, bu nedenle bu hastaların değerlendirme dışında tutulmasına karar verildi. 23 hasta üzerinden değerlendirildiğinde nakil sonrası hastalarımızın, nakil öncesine göre %60,8'inde β -katenin ekspresyon düzeyinin arttığı kalan hastalarda ise azaldığı görüldü. En yüksek ekspresyon artışı 23. örnekte iken (12,48), en düşük ekspresyon değeri 24. örnektedir (-5,93). Bu veriler Şekil 5'te gösterildi.



Şekil 5: β -Katenin geninin nakil öncesine oranla nakil sonrası ekspresyon kat artışı

*: Değerlendirme dışı bırakılan örnekler

Hastalarımızın 13'üne canlı nakil yapılırken, 10'una kadavradan nakil yapılmıştır. Nakil tipinin ekspresyon değişimleri ile olan ilişkisi incelendiğinde β -katenin ekspresyonu artan hastaların %50'si canlı nakil yapılırken, %50'si kadavradan nakil olmuştur. β -Katenin ekspresyonu azalan hastaların ise %67'si canlı nakil olurken %33'ünün kadavradan nakil olduğu gözlemlendi. Ekspresyon artışı ile nakil tipi arasında herhangi bir korelasyon saptanmadı. Bu veriler ışığında değerlere Ki-Kare Testi yapıldığında p değeri 0.270948 olarak bulundu (Tablo 10).

Tablo 10: Nakil tipi ile ekspresyon ilişkisi

	Ekspresyon Artan (%n)	Ekspresyon Azalan (%n)
Canlı	7 (50)	6 (67)
Kadavra	7 (50)	3 (33)

23 hasta içerisinde rejeksiyon görülen hasta sayısı 5'tir. Rejeksiyon ile ekspresyon düzeyleri arasındaki ilişki değerlendirilerek Tablo 11'de sunuldu. Tablo 11'de görüldüğü gibi rejeksiyon gerçekleşen hastaların %40'ında ekspresyon artışı

gözlendi. Rejeksiyon meydana gelmeyen hastaların ise yaklaşık olarak %66,66'ında ekspresyon artışı tespit edildi. Bu veriler ışığında değerlere Ki-Kare Testi yapıldığında p değeri 0.781867 olarak bulundu.

Tablo 11: Rejeksiyon ile ekspresyon ilişkisi

	Ekspresyon Artan (%n)	Ekspresyon Azalan (%n)
Rejeksiyon Var	2 (14,28)	3 (33,3)
Rejeksiyon Yok	12 (85,71)	6 (66,6)

Hastaların doku uyumu, rejeksiyon, akut böbrek hasarı ve ekspresyon kat artışı verileri Tablo 12'de verildi. Doku uyumu için Sınıf I ve Sınıf II allelleri kullanıldı. HLA-A, B, C ve HLA-DR, DQ, DP. Alleller ikişer adet olduğu için uyumlar altı lokus üzerinden gösterildi. Örnek vermek gerekirse, A03, A11'e sahip olan bir hasta ile A03, A30'a sahip olan bir donörün doku uyumu bu allel için 1A olarak gösterilir. Hasta ile donör arasındaki doku uyumu ile ekspresyon kat artışları incelendiğinde %100 uyumlu olan iki hastanın birinde ekspresyon artarken diğerinde azalmıştır.

Tablo 12: Hastaların doku uyumu, rejeksiyon, akut böbrek hasarı ve ekspresyon kat artışı ilişkisi

Hasta No	Ekspresyon	Rejeksiyon	Doku Uyumu	Kreatin (mg/dL) Ref. Ara.= 0,84-1,25		tGFH (mg/dL) Ref. Ara. =>= 0-		Akut Böbrek Hasarı	Ek Bilgi
				NÖ	NS	NÖ	NS		
	Ekspresyon Kat Artışı (Artan)								
1	2,26	Yok	1A, 1B, 1DR, 1DQB1, 1DQA1	6	1,73	11,4	51	Yok	Sorunsuz
2	1,24	Yok	1A, 1DR	3,8	1,25	13,02	42	Yok	Sorunsuz
4	2,73	Yok	1DR	2,3	1,28	26,36	52	Yok	Sorunsuz
5	2,79	Yok	1A, 1B, 1DR, 1DQB1, 1DQA1	5,98	1,66	5,9	45	Yok	Sorunsuz
6	1,95	Yok	1B, 1DQB1, 1DQA1	4,3	1,04	6,7	88	Yok	Sorunsuz
9	6,36	Yok	1B, 1DR	10,7	2,7	4,9	26	Var	ABH+Obstrüksiyon, Ürosepsis
10	3,50	Yok	1B, 1DR	6,1	1,22	7,94	56	Yok	Sorunsuz
11*	1,67	Var	1DQB1, 1DQA1	4,5	1,7	13,12	59	Var	Ex, erken dönem rejeksiyon, Pulse steroid
12	1,07	Yok	1A, 2B, 1DR	7,1	1,51	8,34	54	Yok	Sorunsuz
14	1,49	Yok	1B, 1DR	7.11	1,89	10.1	51	Yok	Sorunsuz
15	1,58	Yok	1DR	5,8	1,13	7,8	56	Yok	Sorunsuz
20	4,07	Yok	1A, 1B, 2DR	9,7	1,21	6,7	83	Yok	Sorunsuz
23*	12,48	Var	1DR, 1DQB1, 1DQA1	7.1	1,0	11,3	48	Var	Erken dönem akut antikor rejeksiyonu, Mükemmel greft
25	1,48	Yok	2A, 2B, 2C, 2DR, 2DQB1, 2DQA1	7.9	1,85	12,1	52	Yok	Sorunsuz full uyum
	Ekspresyon Kat Artışı (Azalan)								
3*	-2,15	Var	2A, 2B, 2C, 2DR, 2DQB1, 2DQA1	5,3	1,65	9,3	38	Var	Erken dönem greft disfonksiyonu
7	-2,64	Yok	1A, 1B, 1C, 1DR, 1DQA1, 1DQB1	6,16	1,32	77,3	56	Var	Erken dönem greft disfonksiyonu, Graft enfeksiyonu, Obstüksiyon
13*	-2,5	Var	1A, 1DR	8,3	2,29	6,8	32	Var	Ex, erken dönem greft disfonksiyonu, Sepsis enfeksiyonu
16	-1,44	Yok	1A, 1B, 2DR	10,9	1,14	3,6	55	Yok	Sorunsuz
17	-1,32	Yok	2DR	8,5	1,03	5,24	67	Yok	Sorunsuz
18*	-4,5	Var	1A, 1B, 1C, 1DR, 1DQA1, 1DQB1	8,8	1,94	7	43	Var	Erken dönem greft disfonksiyonu, kötü donör

21	-1,56	Yok	1A, 1B, 1C, 1DR,1D QA1, 1DQB1	8,4	1,71	8,1	55	Yok	Kötü greft, bazal kreatin yüksek
22	-1,69	Yok	1A, 1B, 1DR	7,09	1,82	9,81	49	Yok	Kötü greft, bazal kreatin yüksek, greft enfeksiyon
24	-5,93	Yok	1A, 1B, 1C, 1DR,1D QA1, 1DQB1	7,4	1,71	7,7	45	Var	Erken dönem greft disfonksiyonu, İlaç toksisitesi

*Rejeksiyon olan hastalar

Çalışmaya dahil edilen 23 hastanın nakil sonrasında 8'inde akut böbrek hasarı gelişirken, 15 hastada ise herhangi bir akut böbrek hasarı bildirilmemiştir. Hastaların %75'i immunsüpresif olarak Siklosporin A, diğerleri ise Tacrolimus kullanmışlardır.

Akut böbrek hasarı oluşan 8 hastamızın, 5'inin nakil sonrası β -katenin ekspresyonu azaldı (%62,5). Nakil sonrası β -katenin ifadesi artan hastalar, Akut böbrek hasarı açısından değerlendirildiğinde sadece %37,5'inde böbrek hasarının geliştiği gözlemlendi.

Tablo 13: Akut Böbrek Hasarı ve Ekspresyon İlişkisi

	Akut Böbrek Hasarı Var (%n)	Akut Böbrek Hasarı Yok (%n)
Ekspresyon Artmış	3 (37,5)	11 (74)
Ekspresyon Azalmış	5 (62,5)	4 (26)

5.TARTIŞMA

Wnt sinyal iletimi hücre farklılaşması, bölünmesi ve proliferasyonu olmak üzere embriyonik büyüme, kök hücre gelişimi, doku rejenerasyonu ve temel immün sistem mekanizmalarında önemli roller almaktadır. Bu sinyal iletiminin aşırı ekspresyonu immünolojik bozukluklara ve kanserlere neden olabilmektedir. Wnt sinyalinin immün sistem hücrelerinin hayatta kalması, rejenerasyonu ve gelişiminin dışında, immün sistemi düzenleyici görevler üstlenmesi aktif bir araştırma alanı haline gelmiştir (13).

Wnt sinyal iletimi birçok biyolojik işlevi düzenleyen oldukça karmaşık bir yolaktır. Bu sinyal iletiminde ligand reseptör etkileşimi çok farklı kombinasyonlara sahiptir. Bu kombinasyonların henüz çözülememiş olması, yapısal hastalıkların ve sistemsel bozuklukların mekanizmalarının anlaşılmasını zorlaştırmaktadır (21). Wnt sinyal iletimindeki bu kompleks durumu çözebilecek her yeni çalışma, Wnt sinyal iletimi ile böbrek transplantasyonu arasındaki ilişkiyi de anlamamıza yardımcı olabilecek bir parametredir. Wnt sinyal iletimindeki regülasyon ile bağışıklık yanıtlarının iyi koordine edilmesi, konakçı dokudaki organ homeostazı açısından son derece önemlidir.

Tez çalışmamızda hastaların nakil öncesi ve sonrası CD4⁺ T hücrelerinde Wnt sinyalinin temel proteini olan β -katenin'in ekspresyonu ile immünolojik durum, böbrek temel fonksiyonları, böbrek hasarı ve rejeksiyon durumu ilişkilendirildi. mRNA düzeyinde β -katenin geninin ekspresyon değişimleri gerçek zamanlı PCR reaksiyonu ile belirlendi. Çalışma grubunda 5 hastada rejeksiyon gözlenirken, kalan hastalarda herhangi bir rejeksiyon gelişmedi. Rejeksiyon görülen hastaların üçünde, nakil öncesine göre nakil sonrasındaki β -katenin ekspresyon düzeyinin azaldığı ve hastaların erken dönem greft disfonksiyonu ve ABH geçirdikleri gözlemlendi. β -katenin ekspresyonu artan 2 rejeksiyon hastasının cinsiyetlerinin erkek olduğu ve kendilerinden daha genç kadın donörlerden canlı nakil oldukları ve her ikisinde de ABH geliştiği bilinmektedir. 11 numaralı hasta, yüksek steroid verilmesine rağmen (Kreatinin 1.7) ex olurken, 23 numaralı hastanın β -katenin düzeyinin çok yüksek olduğu, erken dönem akut antikor rejeksiyonu geçirdikten sonra canlı nakil ile mükemmel bir grefte sahip olduğu ve serum kreatinin düzeyinin de 1 olduğu gözlemlendi. Ekspresyonu azalan ve rejeksiyon geçiren kişilerin ikisinin de canlı nakil ancak yüksek donör yaşına sahip olduğu, bir hastanın 18 yaşında kadavradan nakil olduğu gözlenmiştir. Bu verilerden rejeksiyon ve ekspresyon

artış ve azalışının hasta ve donör cinsiyetinden etkilenmediği gözlenmektedir. Böbrek nakli gerçekleştiğinde, endotel hücrelerinde antikor ve T hücre aracılı hasar yani glomerülit ve peritübüler kapillerinin mikrovasküler hasar lezyonları oluşmaktadır. Mikrovasküler hasar histolojik olarak tespit edildiğinde, immünosüpresif tedavilere dirençli ve böbrek transplantasyonunun başarısı ile ters bir ilişkisi mevcuttur (36). Seifert ve arkadaşları yaptıkları çalışmada Wnt'in böbrek gibi birçok dokuda yaralanmaya karşı lokal olarak yeniden aktifleştirilebilir olduğunu ve bu reaktivasyonun dokuyu yaralanma öncesi haline çevirebilen rejeneratif onarımı sağladığını göstermişlerdir (37). Rejeksiyon geçiren grupta vücutta meydana gelen immünojenik yanıt sonucunda nakil gerçekleştirilen organda lezyonlarının arttığı bilinmektedir. Seifert ve arkadaşlarının da öngördüğü yaklaşımlarından yola çıkarak, nakil sonrasında nakil öncesine oranla β -katenin ekspresyon düzeyinin artışının, vücudun rejeneratif onarıma yönelik aktivasyonundan kaynaklanıyor olabileceğini düşündürmektedir.

Donör tipleri incelendiğinde, çalışma grubunda 10 kadavra donör bulunmaktadır. Kadavradan nakil olmuş 10 hastanın 7'sinde β -katenin ekspresyon değerlerinde artış gözlenmiştir. Canlı nakil olmuş 13 hastanın 7'sinde β -katenin ekspresyon değerlerinde artış gözlenmiştir. Bu hastaların 6'sında nakil sonrasında herhangi bir sorun oluşmamış ve ABH gelişmemiştir. Sadece 1 hastada ürosepsis gelişmiş, obstrüksiyon oluşmuş ve ABH gözlenmiştir. Bu hastada β -katenin artışı gözlenmesine rağmen enfeksiyon geçirmiş olmasından dolayı ABH'nin engellenemediği düşünülmektedir. Kadaverik nakillerde iskemi süresi canlı donörden gerçekleştirilen nakillere göre fazla olduğu için dokularda oluşan iskemi hasarının daha fazla olduğu bilinmektedir (38). Farelerde yapılan bir çalışmada iskemi süresi ile Wnt sinyal aktivasyonunun ilişkili olduğu, iskemi süresi arttıkça Wnt sinyalinin arttığı belirtilmiştir (5). Çalışmamızda da kadaverik nakilli hasta grubunun %70'inde, β -katenin ekspresyon artışının görülmesi ve bu oranın canlı nakillere (%53,8) göre fazla olması, elimizde net iskemi süresi olmasa dahi kadavra naklinin canlı nakile oranla daha fazla iskemiye maruz kalacağı göz önüne alınarak iskemi süresi ile Wnt sinyali arasındaki ilişkiyi destekler niteliktedir. Fakat bu kategorideki hastaların immünojenik takibinin sürdürülmesi iskemi, Wnt sinyal iletimi ve bağışıklık yanıtı arasındaki ilişkiyi netleştirmek açısından önemlidir. β -katenin ekspresyonu azalan 3 kadaverik nakil hastasının 2'sinin de sorunsuz olduğu diğerinin ise enflamasyon sonrası ABH geliştiği bilinmektedir. Bu nedenle kadaverik nakillerde β -katenin ekspresyonu ve greft

sağkalımı arasındaki ilişkinin netleştirilmesi için daha fazla hasta grubunda çalışmak gerekmektedir.

Wnt sinyal yolağının Treg hücrelerinin fonksiyonlarını modüle ettiği bilinmektedir. Yapılan çalışmalar proinflamatuvar T hücrelerinin Wnt sinyali ile ilişkili olduklarını ve Treg hücrelerini inhibe ettiklerini göstermiştir. Ayrıca Treg hücreleri antijen sunumunda stabil temas oluşmasını kısmi olarak sınırlandırabileceği için T hücre aktivasyonunu kısıtlayabilmektedir (39). Mederacke ve arkadaşları canlı böbrek transplantasyonundan sonra donöre özgü Treg aktivasyonunu spesifik olarak analiz edip sayılarında belirgin bir artış tespit etmişlerdir. Genel bilimsel görüş ise, Treg'lerin immünoşüpresif bir bağışıklık yanıtı teşvik etmekteki önemini sorgulaması da Treg'lerin böbrek transplantasyonu sonuçları üzerindeki etkisi günümüze kadar tartışılmaktadır (40). Çalışmamızda canlı donörden nakil olan 13 hasta bulunmaktadır, bu hastalardan 7 tanesinde β -katenin ekspresyon seviyesinde artış gözlenmiştir. β -katenin ekspresyon artışı olan bu hastalarda, rejeksiyon olan 11 ve 23 numaralı hasta hariç diğerlerinde nakil sonrası herhangi bir sorun olmadığı ve akut böbrek hasarının gelişmediği gözlenmiştir. Canlı nakil olup β -katenin ekspresyonu düşük olan hastalardan 4'ünün erken dönem greft disfonksiyonu, akut böbrek hasarı geliştiği ve bunlardan 3'ünün rejeksiyon geçirdiği, diğer ikisinin ise ABH gözlenmemesine rağmen kötü greft'e sahip oldukları bilinmektedir. Dolaşımda aktifleştirilmiş Treg'lerin aktivasyonu ve greft sağ kalımı arasında korelasyon bulunamamış olsa da Treg'lerin klinik sonuçlara bağlanabileceğine dair kanıtların da olması ve β -katenin ekspresyonunun Treg regülasyonunda görev alması verilerimizin greft sağ kalımı ile ilişkili olabileceğini düşündürmektedir.

Chae ve Bothwell yaptıkları araştırmalar sonucunda immün sistem hücreleri ve Wnt sinyal iletimi ilişkisini açıklamaya çalışmış Wnt proteinlerinin, T hücre seçiminde rollerinin olduğunu ortaya koymuşlardır. $CD4^+$ T hücrelerinin polarizasyonu sırasında Wnt sinyaline bağlı β -katenin birikimi meydana geldiğini ve Wnt sinyalinin T hücre polarizasyonu ve seçimini pozitif yönde etkilediğine değinmişlerdir. Bununla birlikte β -katenin ekspresyonunun her türlü T hücre farklılaşmasını ve fonksiyonunu arttırdığını literatüre kazandırmışlardır (3). Çalışmamızda nakil olan tüm hastaların $CD4^+$ T hücrelerinde β -katenin ekspresyon düzeyleri incelendiğinde hastaların %60,8'inde β -katenin ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir (14 hastada artış). Artış görülen hastalardan %14,2'sinde rejeksiyon görülmüştür. Rejeksiyon atağı ile oluşan immün

yanıtla birlikte T hücre farklılaşmasının ve fonksiyonun arttığı bilinmektedir. Chae ve Bothwell'in literatüre kazandırdığı bu bilgi ile çalışmamızın verileri değerlendirildiğinde T hücre organizasyonunda β -katenin aktivasyonunun ilişkili olduğunu öngörmekteyiz. Ancak bu ilişkinin mekanizmasının anlaşılabilmesi için artış görülen diğer hastaların immünolojik açıdan takibinin yapılması ve greft fonksiyonu açısından değerlendirilmesi önemli olacaktır.

İnflamatuvar ve fibrotik hastalıklarda Wnt sinyalinin rolü, Wnt proteinlerinin doku hasarı ve onarımındaki bilinen rolleri ile tutarlıdır. Qiao ve arkadaşları, TGF- β 'nin en önemli anti-enflamatuvar moleküllerden biri olduğundan yola çıkarak, TGF- β , β -katenin ve Foxo (Forkhead box) arasında ilişki olduğunu öne sürmüşlerdir. Foxo; apoptoz, hücre proliferasyonu, hücre döngüsü ve hücre farklılaşmasında görev alan transkripsiyon faktörüdür (41). Yang ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, β -katenin/Foxo1 ve β -katenin/TCF-1'i böbrek nakilli hastaların biyopsilerinde böbrek inflamasyonu, fibrozis ve böbrek işlev bozukluğu açısından incelemişlerdir. Bu çalışmada 33 adet böbrek nakli hastasının nakil öncesi ve nakil sonrası 1-3-12. ayları takip edilerek inflamasyon, fibrozis, histoloji ve fonksiyonellik açısından değerlendirilmiştir. Nakil sonrası erken dönemde alınan biyopsi örneklerinde β -katenin/Foxo1'in, β -katenin/TCF'ye oranının, böbrek fonksiyonu ile pozitif korelasyon gösterdiğini, ancak böbrek transplantasyonundan bir yıl sonra alınan örneklerde ise histolojik hasar, fibrozis ve inflamasyon ile negatif ilişkili olduğunu göstermişlerdir. Bu oranın, böbrek naklinde inflamasyon ve fibrozisin ilerlemesinin biyolojik bir göstergesi olabirliğine değinilmektedir (42). Yaptığımız bu çalışmada β -katenin geninin ifadesinin böbrek sağ kalımı ile ilişkili olabileceği düşünölmekte ayrıca Yang ve arkadaşlarının çalışması göz önüne alındığında, Foxo1 ve TCF ile ilişkisinin değerlendirilmesinin faydalı olabileceği düşünölmektedir.

Böbrek transplantasyonu öncesi ve sonrasında hastaların kreatin düzeyleri dikkat edilmesi gereken bir parametredir. Rejeksiyon olan hastalarda dahil olmak üzere hasta grubunun kreatin düzeylerinde nakil sonrası azalma görölmektedir. Ancak bu beklenen bir durumdur. Burada değinmemiz gereken nokta rejeksiyon meydana gelen grup ile meydana gelmeyen grup arasındaki kreatin düzeylerinin değerlendirilmesidir. Tablo 12'de göröldüğü gibi tüm hastalarda kreatin düşüş eğilimindedir fakat rejeksiyon meydana gelen hastalarda kreatin değeri istenilen ideal seviyelere inmemiştir. β -

katenin ekspresyon değişim düzeyleri ile kreatin seviyeleri değerlendirildiğinde aralarında anlamlı bir ilişki kurulamamıştır.

Tüm nakillerde ne kadar uyumlu olsa da temel olarak o sistem ile yabancı bir doku veya organ etkileşime girmekte ve olumlu-olumsuz bir immünolojik reaksiyon gerçekleşmektedir. Wnt/ β -katenin'in, böbrek hasarı üzerindeki biyolojik etkisini anlamak oldukça zordur. Bu noktada böbrek hasarında etkili bir Şekilde tedavi sağlanması, terapötik yaklaşımların doğru Şekilde kullanılması için bu sinyal iletiminin etkilerinin tam olarak tanımlanması gerekmektedir (43). Munoz-Castaneda ve ark., sıçanlarda yaptıkları çalışmalarda renal Klotho ekspresyonunun azalması ile ilgili faktörleri araştırmışlardır. Rekombinant FBF23 (rFBF23) uygulaması sağlıklı sıçanlarda fosfaturi ve azalmış renal Klotho ekspresyonu üretmiştir. Nefrektomize edilmiş sıçanlarda, dolaşımdaki FBF23 seviyeleri önemli ölçüde artmış ve Klotho'nun azaldığı bulunmuştur. Bu sıçanlarda anti FBF23 antikörlerinin uygulanması renal Klotho ekspresyonunu daha da azaltmıştır. Tüm bu sonuçlar artan tübüler fosfat yükünün Klotho ekspresyonunda bir azalmaya neden olduğunu göstermektedir (26, 43). Klotho eksikliği diyabetik nefropatinin fare modellerinde ve diyabetli hastalarda podosit hasarı ile ilişkili olan Wnt aktivasyonunu indüklemektedir. β -katenin'in ortamdan uzaklaştırılmasından sonra podosit hasarı azalmaktadır. Tam anlamıyla kanıtlanmamasına rağmen, Wnt tarafından GSK3 β yoluyla indüklenen bir transkripsiyon faktörü olan Snail-1, podosit hasarında önemli bir rol alan nefrin ekspresyonunu azaltır. Olgun böbrekte Wnt baskılanır ve podositin fizyolojik işlevini yerine getirmesi sağlanır. (44). Yaptığımız çalışmada da β -katenin ekspresyonundaki azalma 9 örnekten mevcuttur. Bu 9 rneğin 7'sinde kötü graft, enfeksiyon, bazal kreatin yüksekliliği gözlenmektedir. Bu 7 rneğin 3'nde rejeksiyon gözlenmiştir. Ancak iki hasta nakil sonrası sorunsuz devam etmektedir. Bu aşamada β -katenin ifadesi azalan iki hasta, Wnt sinyal aktivasyonunun baskılanmasının podosit hücrelerinin fizyolojik işlevini yerine getirmesini sağlayarak böbreği korumuş olabileceği yorumunu destekler niteliktedir. Ancak hasta sayısının az olması bu yorumu net olarak yapmamızı engellemektedir. Bunun dışında β -katenin bağımsız Wnt yolaklarının da aktivasyonu söz konusu olabileceğinden daha fazla araştırma yapmak gerekmektedir (26). Ancak verilerimizden elde edilen genel görüş, β -katenin artışının nakil sonrası böbreği koruduğu yönündedir.

Böbreklerde akut hasar tübüler epitel hücrelerinin ölümüne ve doku yaralanmalarına neden olmaktadır. Yaralanan bu hücreler hem Wnt hem de proinflamatuvar sitokinler salgılamakta ve makrofajların toplanmasına neden olmaktadır. Bu durum Wnt yolağının aktivasyonuna katkıda bulunur (45, 46). Bu doku ve hücrelerdeki apoptoz ise AKT'nin β -katenin'e bağlı fosforilasyonu ile aracılık ettiği pro-apoptotik Bax'ın veya p53'ün inhibisyonu ile önlenmektedir (47). Wnt/ β -katenin yolağı ayrıca Survivin ekspresyonunun artmasıyla hücre sağkalımını desteklemektedir. Wnt/ β -katenin yolağı ile aktive edilen hedef genler, siklin D ve cMyc gibi proliferatif proteinler içermektedir. Proliferasyon, yaralanma sırasında ölen hücrelerin değiştirilmesine yardımcı olur ve bu yenilenen hücrelerin farklılaşmasına yol açar (48). Çalışmamızda erken dönem akut böbrek hasarı oluşan 8 hasta vardır. Bunların yaklaşık olarak %62,5'inde β -katenin ekspresyon düzeyleri azalmıştır. Bu 5 hastada erken dönem greft disfonksiyonu gözlenmiş ve 3'ü rejeksiyon geçirmiştir. β -katenin ekspresyonu artan 14 hastadan 3'ünde ABH gelişmiş ancak bu hastaların biri ürosepsis geçirmiş, diğeri ex olmuş ve ekspresyon artışı en yüksek olan hastamız (12.48) erken dönemde akut antikor rejeksiyonu geçirmiş olmasına rağmen mükemmel graft ve 1.0 kreatin düzeyi ile takip edilmektedir. Bu bağlamda akut böbrek hasarı gelişiminde aktif olarak görev alan β -katenin ifadesinin artış ve azalışının böbrek fonksiyonuna etkisinin olduğunu söylemek mümkündür (46).

6.SONUÇ VE ÖNERİLER

Ekspresyonu artan 14 hastanın 7'si kadavra, azalan 9 hastanın 3'ü kadavra donöre sahiptir. Bu bağlamda donör tipi ile Wnt sinyali ilişkisi bazı hastalar dışında literatürle paralellik göstermektedir. Donör tipinin rejeksiyon ve iskemi hasarında etkili olduğu bilindiğinden bu verilerin β -katenin ekspresyon düzeyleri ile ilişkili çıkması bulgularımızı desteklemektedir.

Rejeksiyon görülen 5 hastanın 3'ünde β -katenin ekspresyonunun nakil sonrasında azaldığı görülmüştür. Tahmin edildiği gibi rejeksiyon mekanizmasıyla indüklenen immün yanıtta T hücre farklılaşması ve fonksiyonunun artışının, β -katenin ifadesi ile düzenlenmiş olabileceği düşünülebilir. Rejeksiyonla ilgili çalışmaların arttırılması daha olası yorumlar yapılabilmesine olanak sağlayabilir.

Çalışmamızda erken dönem akut böbrek hasarı ile Wnt sinyali arasında ilişki olabileceği gözlenmiştir. Nakil gerçekleştirilen 8 hastada erken dönem akut böbrek hasarı meydana gelmiş ve bu hastaların %62,5'inde β -katenin ekspresyon değerleri azalmıştır. Akut böbrek hasarının onarımını gerçekleştirmek için gerekli olan Wnt sinyalinin bu hastalarda azalmasının ABH gelişiminde rolü olduğu düşünülmektedir. Ekspresyonu değişen hastaların akut böbrek hasarı gelişme durumlarının ve klinik takipleri yapılarak hasar ile Wnt mekanizması ilişkilendirilmesine devam edilmelidir.

Wnt/ β -katenin'nin transplantasyon immünolojisindeki yerinin daha iyi anlaşılabilmesi için veri havuzunun genişletilmesi gerekmektedir. Bu nedenle çalışmaya dahil edilen örnek sayısının arttırılması önemlidir. Çalışmamızda mRNA düzeyinde bir değerlendirme yapılmıştır. Verilerin doğrulanması için protein düzeyinde de incelenmesi gerekmektedir. Çalışmamızda β -katenin düzeyi CD4⁺ T hücre popülasyonunda incelenmiştir. İmmün yanıtta rol alan diğer hücre popülasyonlarında β -katenin ekspresyon düzeylerinin incelenmesi transplantasyon immünoloji mekanizmasının anlaşılabilmesi için çok yönlü bakış açısı sağlayabilir. Çalışmada sadece Wnt sinyalinde görevli majör protein olan β -katenin incelenmiştir, fakat yolaktaki diğer moleküllerin de incelenmesi bu karmaşık sinyal yolağının daha iyi anlaşılmasına katkı sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

1. Kawakami, T., Ren, S., & Duffield, J. S. (2013). Wnt signalling in kidney diseases: dual roles in renal injury and repair. *The Journal of pathology*, 229(2), 221-231.
2. Staal, F. J., & Arens, R. (2016). Wnt signaling as master regulator of T-lymphocyte responses: Implications for transplant therapy. *Transplantation*, 100(12), 2584-2592.
3. Chae, W. J., & Bothwell, A. L. (2018). Canonical and non-canonical Wnt signaling in immune cells. *Trends in immunology*, 39(10), 830-847.
4. Gattinoni, L., Ji, Y., & Restifo, N. P. (2010). Wnt/ β -catenin signaling in T-cell immunity and cancer immunotherapy. *Clinical Cancer Research*, 16(19), 4695-4701.
5. Wang, Y., Zhou, C. J., & Liu, Y. (2018). Wnt signaling in kidney development and disease. In *Progress in molecular biology and translational science* (Vol. 153, pp. 181-207). Academic Press.
6. Nelson, W. J., & Nusse, R. (2004). Convergence of Wnt, β -catenin, and cadherin pathways. *Science*, 303(5663), 1483-1487.
7. Ackers, I., & Malgor, R. (2018). Interrelationship of canonical and non-canonical Wnt signalling pathways in chronic metabolic diseases. *Diabetes and Vascular Disease Research*, 15(1), 3-13.
8. Nusse, R., & Varmus, H. E. (1992). Wnt genes. *Cell*, 69(7), 1073-1087.
9. Nusse, R. (2005). Wnt signaling in disease and in development. *Cell research*, 15(1), 28-32.
10. Lustig, B., & Behrens, J. (2003). The Wnt signaling pathway and its role in tumor development. *Journal of cancer research and clinical oncology*, 129(4), 199-221.

11. Khalaf, A. M., Fuentes, D., Morshid, A. I., Burke, M. R., Kaseb, A. O., Hassan, M., ... & Elsayes, K. M. (2018). Role of Wnt/ β -catenin signaling in hepatocellular carcinoma, pathogenesis, and clinical significance. *Journal of hepatocellular carcinoma*, 5, 61.
12. Taciak, B., Pruszyńska, I., Kiraga, L., Bialasek, M., & Krol, M. (2018). Wnt signaling pathway in development and cancer. *J Physiol Pharmacol*, 69(2), 185-196.
13. Haseeb, M., Pirzada, R. H., Ain, Q. U., & Choi, S. (2019). Wnt signaling in the regulation of immune cell and cancer therapeutics. *Cells*, 8(11), 1380.
14. Moon, R. T., Kohn, A. D., De Ferrari, G. V., & Kaykas, A. (2004). WNT and β -catenin signalling: diseases and therapies. *Nature Reviews Genetics*, 5(9), 691-701.
15. Xiao, Q., Chen, Z., Jin, X., Mao, R., & Chen, Z. (2017). The many postures of noncanonical Wnt signaling in development and diseases. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 93, 359-369.
16. Gewin, L. S. (2018). Renal tubule repair: is Wnt/ β -Catenin a friend or foe?. *Genes*, 9(2), 58.
17. Vondran, F. W., Timrott, K., Tross, J., Kollrich, S., Gwinner, W., Lehner, F., ... & Schwinzer, R. (2011). Association of high anti-donor alloreactivity and low frequency of FoxP3-expressing cells prior to kidney transplantation with acute graft rejection. *Clinical transplantation*, 25(6), 905-914.
18. Corrêa, Rosana Rosa Miranda, et al. "The importance of C4d in biopsies of kidney transplant recipients." *Clinical and Developmental Immunology* 2013 (2013).
19. Kamei, C. N., Gallegos, T. F., Liu, Y., Hukriede, N., & Drummond, I. A. (2019). Wnt signaling mediates new nephron formation during zebrafish kidney regeneration. *Development*, 146(8).
20. Terada, Y., Tanaka, H., Okado, T., Shimamura, H., Inoshita, S., Kuwahara, M., & Sasaki, S. (2003). Expression and function of the developmental gene Wnt-4 during experimental acute renal failure in rats. *Journal of the American Society of Nephrology*, 14(5), 1223-1233.

21. Ng, L. F., Kaur, P., Bunnag, N., Suresh, J., Sung, I. C. H., Tan, Q. H., ... & Tolwinski, N. S. (2019). WNT signaling in disease. *Cells*, 8(8), 826.
22. Chen, D. Q., Cao, G., Chen, H., Liu, D., Su, W., Yu, X. Y., ... & Zhao, Y. Y. (2017). Gene and protein expressions and metabolomics exhibit activated redox signaling and wnt/ β -catenin pathway are associated with metabolite dysfunction in patients with chronic kidney disease. *Redox biology*, 12, 505-521.
23. He, W., Dai, C., Li, Y., Zeng, G., Monga, S. P., & Liu, Y. (2009). Wnt/ β -catenin signaling promotes renal interstitial fibrosis. *Journal of the American Society of Nephrology*, 20(4), 765-776.
24. Hu, M. C., Kuro-o, M., & Moe, O. W. (2013). Klotho and chronic kidney disease. In *Phosphate and Vitamin D in Chronic Kidney Disease* (Vol. 180, pp. 47-63). Karger Publishers.
25. Satoh, M., Nagasu, H., Morita, Y., Yamaguchi, T. P., Kanwar, Y. S., & Kashihara, N. (2012). Klotho protects against mouse renal fibrosis by inhibiting Wnt signaling. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 303(12), F1641-F1651.
26. Muñoz-Castañeda, J. R., Rodelo-Haad, C., Pendon-Ruiz de Mier, M. V., Martin-Malo, A., Santamaria, R., & Rodriguez, M. (2020). Klotho/FGF23 and wnt signaling as important players in the comorbidities associated with chronic kidney disease. *Toxins*, 12(3), 185.
27. Abbas, A. K., Lichtman, A. H., & Pillai, S. (2010). *Cellular and Molecular Immunology*. six Edition.
28. Staal, F. J., Luis, T. C., & Tiemessen, M. M. (2008). WNT signalling in the immune system: WNT is spreading its wings. *Nature Reviews Immunology*, 8(8), 581-593.
29. Liang, H., Chen, Q., Coles, A. H., Anderson, S. J., Pihan, G., Bradley, A., ... & Jones, S. N. (2003). Wnt5a inhibits B cell proliferation and functions as a tumor suppressor in hematopoietic tissue. *Cancer cell*, 4(5), 349-360.

30. Li, X., Xiang, Y., Li, F., Yi, Q., Li, B., & Ke, X. (2019). WNT/ β -catenin signaling pathway regulating T cell-inflammation in tumor microenvironment. *Frontiers in Immunology*, 10, 2293.
31. Muranski, P., Borman, Z. A., Kerkar, S. P., Klebanoff, C. A., Ji, Y., Sanchez-Perez, L., ... & Roychoudhuri, R. (2011). Th17 cells are long lived and retain a stem cell-like molecular signature. *Immunity*, 35(6), 972-985.
32. Notani, D., Gottimukkala, K. P., Jayani, R. S., Limaye, A. S., Damle, M. V., Mehta, S., ... & Galande, S. (2010). Global regulator SATB1 recruits β -catenin and regulates TH 2 differentiation in Wnt-dependent manner. *PLoS Biol*, 8(1), e1000296.
33. Castañeda-Patlán, M. C., Fuentes-García, G., & Robles-Flores, M. (2018). Wnt signaling as a master regulator of immune tolerance in a tumor microenvironment. In *Cell Signalling-Thermodynamics and Molecular Control*. IntechOpen.
34. van Loosdregt, J., Fleskens, V., Tiemessen, M. M., Mokry, M., van Boxtel, R., Meerding, J., ... & Gröne, A. (2013). Canonical Wnt signaling negatively modulates regulatory T cell function. *Immunity*, 39(2), 298-310.
35. Karahan İ. H. Böbrek Transplantasyonu Sonrasında IL-2 Sitokin Gen Profilinin İncelenmesi, Yüksek lisans tezi, İzmir Kâtip Çelebi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İzmir 2018:65
36. Maarouf, O. H., Aravamudhan, A., Rangarajan, D., Kusaba, T., Zhang, V., Welborn, J., ... & Humphreys, B. D. (2016). Paracrine Wnt1 drives interstitial fibrosis without inflammation by tubulointerstitial cross-talk. *Journal of the American Society of Nephrology*, 27(3), 781-790.
37. Seifert, M. E., Gaut, J. P., Guo, B., Jain, S., Malone, A. F., Geraghty, F., ... & Mannon, R. B. (2019). WNT pathway signaling is associated with microvascular injury and predicts kidney transplant failure. *American Journal of Transplantation*, 19(10), 2833-2845.

38. Zhao, H., Alam, A., Soo, A. P., George, A. J., & Ma, D. (2018). Ischemia-reperfusion injury reduces long term renal graft survival: mechanism and beyond. *EBioMedicine*, 28, 31-42.
39. Van Loosdregt, J., & Coffey, P. J. (2018). The role of WNT signaling in mature T cells: T cell factor is coming home. *The Journal of Immunology*, 201(8), 2193-2200.
40. Mederacke, Y. S., Vondran, F. W., Kollrich, S., Schulde, E., Schmitt, R., Manns, M. P., ... & Jaeckel, E. (2019). Transient increase of activated regulatory T cells early after kidney transplantation. *Scientific reports*, 9(1), 1-12.
41. Qiao, X., Rao, P., Zhang, Y., Liu, L., Pang, M., Wang, H., ... & Wang, X. M. (2018). Redirecting TGF- β signaling through the β -catenin/Foxo complex prevents kidney fibrosis. *Journal of the American Society of Nephrology*, 29(2), 557-570.
42. YANG, Y., Rao, P., Zhao, J., Yu, H., Chen, T., Cao, Q., ... & Harris, D. (2019). SUN-129 The significance of β -catenin/Foxo in kidney transplantation. *Kidney International Reports*, 4(7), S212.
43. Tan, R. J., Zhou, D., Zhou, L., & Liu, Y. (2014). Wnt/ β -catenin signaling and kidney fibrosis. *Kidney international supplements*, 4(1), 84-90.
44. Oh, H. J., Nam, B. Y., Wu, M., Kim, S., Park, J., Kang, S., ... & Han, S. H. (2018). Klotho plays a protective role against glomerular hypertrophy in a cell cycle-dependent manner in diabetic nephropathy. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 315(4), F791-F805.
45. Basile, D. P., Anderson, M. D., & Sutton, T. A. (2011). Pathophysiology of acute kidney injury. *Comprehensive Physiology*, 2(2), 1303-1353.
46. Huffstater, T., Merryman, W. D., & Gewin, L. S. (2020, March). Wnt/ β -Catenin in Acute Kidney Injury and Progression to Chronic Kidney Disease. In *Seminars in Nephrology* (Vol. 40, No. 2, pp. 126-137). WB Saunders.

47. Wang, Z., Havasi, A., Gall, J. M., Mao, H., Schwartz, J. H., & Borkan, S. C. (2009). β -Catenin promotes survival of renal epithelial cells by inhibiting Bax. *Journal of the American Society of Nephrology*, 20(9), 1919-1928.
48. Bao, H., Ge, Y., Wang, Z., Zhuang, S., Dworkin, L., Peng, A., & Gong, R. (2014). Delayed administration of a single dose of lithium promotes recovery from AKI. *Journal of the American Society of Nephrology*, 25(3), 488-500.



EKLER

Ek1: Etik Kurul Karar Formu

T.C.
İZMİR KÂTİP ÇELEBİ ÜNİVERSİTESİ
Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu
Karar Formu

(İzmir Kâtip Çelebi Üniversitesi Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi 35360 Karabağlar / İZMİR)

Sayın Dr. Öğr. Üyesi. Melek PEHLİVAN

Karar No: 335
Tarih : 10.10.2018

KARAR

Böbrek Nakli öncesi ve sonrasında Wnt sinyal yolağında B-Katenin ekspresyon değişimlerinin incelenmesi adlı araştırma başvuru dosyanız kurumumuzda gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiştir. İnceleme sonucunda çalışmanın yapılacağı başvuru dosyasında belirtilen merkezlerde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel açıdan sakınca bulunmadığına toplantıya katılan etik kurul üyelerinin oy birliği ile karar verilmiştir.

Doç. Dr. Orhan GÖKALP
Başkan

Doç. Dr. Serdar BAYATA
Başkan Yardımcısı

Prof. Dr. Yasemin TOKEM
Üye

Prof. Dr. Belde Kasap DEMİR
Üye

Doç. Dr. Özgür TOSUN
Üye

(T. KATILMADI)
Doç. Dr. Aşlı BAYSAL
Üye

Uzm. Dr. Ayşenur ATAY
Üye

(T. KATILMADI)
Dr. Mehmet ERTAN
Üye

Uzm. Dr. Doğu Barış KILIÇCIOĞLU
Raportör Üye

KARŞI OY _____ :

T.C.
İZMİR KÂTİP ÇELEBİ UNIVERSITY
Non-Interventional Clinical Studies
Institutionel Review Board

To : Melek PEHLİVAN, MD
From : Assoc. Prof. Orhan GÖKALP, MD, Chair
Date : 10.10.2018
IRB # : 335

Study Title : Investigation of B-catenin expression changes in Wnt signaling pathway before and after kidney transplantation.

At its board meeting **10.10.2018** your submission for the above referenced research study has received review and approval from İzmir Kâtip Celebi Non-Interventional Clinical Studies Institutional Review Board.

Assoc. Prof. Orhan GÖKALP
Chair

İzmir Kâtip Çelebi Üniversitesi Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi 35360 Karabağlar / İZMİR / TÜRKİYE
Tel: 0 232 245 04 38 - 0 232 244 44 44 / 1234
Fax: 0 232 245 04 38
E-posta: ikcetik2@gmail.com

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	Onur YÜKSEL
Doğum Yeri	Soma, MANİSA
Doğum Tarihi	14.01.1994
Telefon	+905545143578
E-Posta Adresi	onur-oy@hotmail.com

Eğitim Bilgileri	
Lisans	
Üniversite	Ege Üniversitesi
Fakülte	Mühendislik Fakültesi
Bölümü	Biyomühendislik
Mezuniyet Yılı	2017

Yüksek Lisans	
Üniversite	İzmir Kâtip Çelebi Üniversitesi
Enstitü Adı	Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı
Programı	Tıbbi Biyoloji ve Genetik