

T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ (TIP) YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

**FARELERDE HIPPO SİNYAL YOLAĞI AKTİVATÖR VE
İNİBİTÖRÜNÜN FETUS GELİŞİMİ BOYUNCA KALP
HÜCRELERİ ÜZERİNDE ETKİSİ**

MERVE ŞEHNE
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Kemal ERGİN

Bu tez Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından TPF-15065 proje numarası ile desteklenmiştir

AYDIN-2017

KABUL VE ONAY SAYFASI

T.C. Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Anabilim DalıProgramı
çerçevesinde.....tarafından hazırlanan “.....” başlıklı tez,
aşağıdaki jüri tarafından Doktora/Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi:/...../.....

Üye (Tez Danışmanı):

Üye :

Üye :

ONAY:

Bu tez Adnan Menderes Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun görülmüş ve Sağlık Bilimleri Enstitüsünün tarih ve sayılı oturumunda alınan nolu Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Ahmet Ceylan
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Öncelikle tezimin oluşturulmasında bana destek veren, tez çalışmamın her aşamasında değerli katkıları ve fikirlerini paylaşan eğitimim boyunca gerekli tüm yardımlarıyla beni her zaman yönlendiren, Biyolog olarak başladığım Anabilim Dalından bir Histolog olarak mezun olmamı sağlayan değerli Hocam Sayın Prof. Dr. Kemal ERGİN'e teşekkür ederim.

Eğitimim boyunca benim üzerimde çok emeği olan fikirlerine ve eleştirilerine önem verdiğim başta Anabilim Dalı Başkanı olan değerli hocam Prof. Dr. Alpaslan GÖKÇİMEN olmak üzere tüm Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerine teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimim boyunca sürekli yanımda olan bana manevi güç veren desteklerini hep hissettiğim çok değerli arkadaşlarım Anatomi AD üyesi Ayşe Gizem Polat, Histoloji ve Embriyoloji AD üyesi Gülünar Erdem Koç, Fizyoloji AD üyeleri Gül Taşlı Yeşilçayır, Cenk Orak ve Ferhat Şirinyıldız'a teşekkür ederim.

Deney süreçlerinde bana yardımcı olan ve destek veren onlarla çalışmaktan mutluluk duyduğum Histoloji ve Embriyoloji AD öğrencileri Gözde Alkan, Ayşenur Bostancı ve Selen Kum'a destekleri ve yardımları için teşekkür ederim.

Tüm hayatım boyunca hep yanımda olan sevgisini hep hissettiğim iyi ki varsın dediğim ve beni bugünlere getiren sevgili Anneme... Tüm bu Tez çalışmasında ve yazım aşamasında mutsuz ve huysuz yüzümü gören işin kötü kısmına katlanan, bana inanan ve sürekli destek veren moralimi hep yüksek tutmaya çalışan elinden geldiğince benimle olan sevgili Ercan Tanrıkut'a teşekkür ederim.

Merve ŞEHNE

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY SAYFASI.....	i
TEŞEKKÜR	ii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
RESİMLER DİZİNİ	ix
TABLolar DİZİNİ.....	xi
ÖZET	xii
ABSTRACT	xiii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Kalp Histolojisi ve Anatomisi	3
2.2. Kalbin Embriyolojik Gelişimi	11
2.3. Farelerde Embriyonik Kalp Gelişimi	19
2.4. Kalp Gelişiminin Moleküler Düzenlenmesi	22
2.5. WNT Sinyalizasyonu ve Kalp Gelişimi	29
2.6. Hippo Sinyal Yolağı	37
2.6.1. Drosophilada Hippo Sinyali	37
2.6.2 Drosophila Hippo Sinyalizasyon Ağı	39
2.6.3. Hippo Sinyalizasyonunun Memelilerde Çekirdek Kinaz Kaskadı	44
2.6.4. Memeli Hippo Kinaz Kaskadının Upstream Düzenleyicileri.....	47
2.6.5. Hippo Kinaz Kaskadının Aktivasyon Mekanizmaları.....	49
2.6.7. LATS Aktive Edici Kinazlar Olan MST1 / 2 ve MAP4K'ların Düzenlenmesi	50
2.6.8. YAP / TAZ Transkripsiyonel Programları ve İşlevsel Çıktıları.....	52
2.7. Hippo Sinyalizasyonu ve Wnt Sinyalizasyonu Arasındaki İlişki.....	54
2.8. Hippo Sinyalini Aktivatör Olarak Hedefleyen Verteporfin	55

2.9. Hippo Sinyalini İnhibitör Olarak Hedefleyen C2 Ceramide	57
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	59
3.1. DeneY Hayvanlarının Temini	59
3.2. DeneY Hayvanlarının Gruplandırılması.....	59
3.3. İlaçların Uygulanması.....	61
3.4. DeneYin Sonlandırılması	61
3.5. Doku Takibi.....	62
3.6. Histokimyasal Boyamalar	63
3.7. İmmünohistokimya.....	65
3.8. İstatistiksel Analiz	66
3.8.1. Fetus Ağırlıkları.....	66
3.8.2. İmmünohistokimyasal Değerlendirme Sonuçları	66
4.BULGULAR	67
4.1. Fetus Ağırlıkları.....	67
4.2. İmmünohistokimyasal Değerlendirmeler	67
4.2.1. Gata-4 Değerlendirme	67
4.2.2. β -Catenin değerlendirme	71
4.2.3. YAP Değerlendirme	75
4.3. Histokimyasal Boyamaların Değerlendirilmesi	79
4.3.1. Trikrom Boyamanın Değerlendirilmesi.....	79
4.3.2. PAS Boyamanın Değerlendirmesi.....	81
4.3.3. Hematoksilen-Eozin Değerlendirilmesi	82
5. TARTIŞMA.....	87
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	92
KAYNAKLAR.....	93
ÖZGEÇMİŞ.....	109

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AMPK	: AMP-activated protein kinase
AP-1	: Activator Protein-1
BHLH	: Basic Helix-Loop-Helix
BRCA2	: Breast cancer-2
CDK1	: Cyclin Dependent Kinase 1
CDK2	: Cyclin Dependent Kinase 2
CK	: Kazein Kinaz
C-src	: Proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src
DDIT4	: DNA Damage Inducible Transcript 4
DKK1	: Dickkopf WNT Signaling Pathway Inhibitor 1
EMT	: Epitelyal Mezenkimal Geçiş
FERM	: 4.1/ezrin/radixin/moesin
FGF	: Fibroblast Growth Factor
FOS	: Fos Proto-Oncogene, AP-1 Transcription Factor Subunit
GATA	: GATA Binding Protein
Hand1	: Heart And Neural Crest Derivatives Expressed 1
Hand2	: Heart And Neural Crest Derivatives Expressed 2
JNK	: Jun-N-terminal kinase
JUN	: Jun Proto-Oncogene, AP-1 Transcription Factor Subunit
Isl1	: Islet 1
MAP4K	: Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase Kinase
MAPK	: Mitogen-Activated Protein Kinase
MEF2	: Myocyte Enhancer Factor 2
Mesp	: Mesoderm Posterior BHLH Transcription Factor
Mir1	: MikroRna-1

mTORC1	: Mammalian target of rapamycin complex 1
myoD	: Myogenic Differentiation
NEDD4	: Neural Precursor Cell Expressed, Developmentally Down-Regulated 4, E3 Ubiquitin Protein Ligase
Nkx2.3	: Nk homeobox 3
Nkx2.5	: Nk homeobox 5
OCT4	: octamer-binding transcription factor 4
P13K	: Phosphatidylinositol 3-Kinase
PCP	: Planar Cell Polarity
PDZ	: Post-Synaptic Density-95, Discs Large, Zonula Occludens-1
PERK	: PKR-like ER kinase
Pitx2	: Paired Like Homeodomain 2
PKA	: Protein kinase A
RhoA	: Ras Homolog Family Member A
SIAH	: Siah E3 Ubiquitin Protein Ligase
SOX 17	: SRY-Box 17
Tao	: Thousand and one amino acid kinase
Tbx	: T-Box
TEF	: Thyrotroph Embryonic Factor
α	: Alfa
β	: Beta
ϵ	: Epsilon

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1: Kalbin toraks boşuğu içinde yerleşimi	3
Şekil 2: Kalbin 4 odacığı.	4
Şekil 3: Atrium sinistrum ve buraya açılan yapılar ile birlikte ventriculus sinister boşluğu. 6	
Şekil 4: Kalp ve perikardiyumun tabakaları	7
Şekil 5: Kalp duvarının histolojik yapısı	8
Şekil 6: Kalp kası lifleri	10
Şekil 7: Kalp, sağ ventrikül	10
Şekil 8: Kalp, sağ ventrikül	11
Şekil 9: Embriyonik gelişimin 19 ve 21 günleri	12
Şekil 10: Embriyonik gelişimin üçüncü haftasında dorsal görünümün şematik olarak gösterilmesi.....	13
Şekil 11: Endokardiyal tüplerin tek bir endokardiyal tüp halini almasını gösteren transvers kesitler.....	14
Şekil 12: 4. Haftada primordiyal kalp tüpü ve saat yönünün tersine kıvrılma hareketi	15
Şekil 13: Atrioventriküler kapakların chordae tendinea ve musculus papillaris'in gelişimi17	
Şekil 14: Semilunar kapaklarının gelişimi	18
Şekil 15: Fare erken dönem kalp gelişimi	19
Şekil 16: Drosophila kalbi	24
Şekil 17: Memeli kalp gelişiminde sistematik transkripsiyonel ağ.....	28
Şekil 18: Axin'in protein yapısı.....	31
Şekil 19: Wnt/ β katenin sinyal yolağı	32
Şekil 20: Wnt sinyalizasyonunun kardiyak hat kök hücre farklılaşmasında ki rolü	37
Şekil 21: Hippo yolağı Çekirdek kinaz kaskadı	39
Şekil 22: Hpo yolağının ve Yki'nin farklı yukarı akış bileşenleri arasındaki etkileşimleri 42	
Şekil 23: Hippo yolağının farklı bileşenleri arasındaki etkileşimler.	44

Şekil 24: Yap/Taz'ın çekirdek kinaz kaskadına yanıtı	45
Şekil 25: Drosophila ve Memelilerde Hippo sinyal yolağı	47
Şekil 26: Wnt ve hippo sinyalizasyon ilişkisi.....	55



RESİMLER DİZİNİ

Resim 1: Gruplandırılan gebelerin Takibi	60
Resim 2: Vajinal plağın tespiti.....	60
Resim 3: Fetusların anneden çıkarılması	61
Resim 4: E18.5 ait fetuslar	62
Resim 5: E10,5 Embriyoların disseksiyon mikroskobu altında ekstraembriyonik membranlarından ayrılması ve disseksiyon sonrası görünümü	62
Resim 6: Gata-4, NT grubu, x40 büyütme.....	69
Resim 7: Gata-4, Dmsu grubu, x40 büyütme	69
Resim 8: Gata-4, C2 Ceramide grubu, x40 büyütme.....	70
Resim 9: Gata-4, Verteporfin grubu, x40 büyütme	70
Resim 10: Gata-4, x100 büyütme (A, NT Grubu; B, DMSO Grubu; C, Ceramide grubu D, Verteporfin Grubu)	71
Resim 11: β -Catenin, NT grubu, x40 büyütme.....	73
Resim 12: β -Catenin, Dmsu grubu, x40 büyütme	73
Resim 13: β -Catenin, C2 Ceramide, x40 büyütme	74
Resim 14: β -Catenin, Verteporfin grubu, x40 büyütme	74
Resim 15: β -catenin, x100 büyütme (A, NT Grubu; B, DMSO Grubu; C, Ceramide grubu; D, Verteporfin Grubu).....	75
Resim 16: YAP, NT grubu, x40 büyütme	77
Resim 17: YAP, Dmsu Grubu, x40 büyütme	77
Resim 18: YAP, C2 Ceramide grubu, x40 büyütme.....	79
Resim 19: YAP, Verteporfin grubu, x40 büyütme	79
Resim 20: YAP, x100 büyütme (A, NT Grubu; B, DMSO Grubu; C, Ceramide grubu D, Verteporfin Grubu).	80
Resim 21: Trikrom boyama, NT grubu, x40 büyütme	80

Resim 22: Trikrom boyama, Verteporfin grubu, x40 büyütme	80
Resim 23: Trikrom boyama, C2 Ceramide Grubu, x100 büyütme.....	80
Resim 24: Trikrom boyama, C2 Ceramide grubu, x40 büyütme.....	81
Resim 25: Pas boyama, x40 büyütme (A, NT Grubu; B, DMSO Grubu C, Ceramide grubu; D, Verteporfin Grubu).....	81
Resim 26: NT Grubu, HE Boyama, x40 büyütme	82
Resim 27: Dmso grubu, HE boyama, x40 büyütme	83
Resim 28: C2 Ceramide grubu, HE boyama, x40 büyütme.....	84
Resim 29: Verteporfin Grubu, HE Boyama, x40 büyütme.....	85
Resim 30: Tüm gruplar arası (A, NT; B, Dmso; C, C2 Ceramide; D, Verteporfin) genel görünüş, HE, objektiften dijital büyütme.....	86

TABLolar DİZİNİ

Tablo 1: Drosophila ve insanda hippo sinyalizasyonunun bileşenleri	49
Tablo 2: Doku takibi işlemi	63
Tablo 3: Hematoksilen-Eozin boyama prosedürü	63
Tablo 4: Trikrom boyama prosedürü.....	64
Tablo 5: Pas boyama prosedürü.....	64
Tablo 6: İmmünohistokimya prosedürü	65
Tablo 7: Ağırlık ölçüm sonuçları.....	67
Tablo 8: Gata-4 atriyum skor sonuçları.....	67
Tablo 9: Gata-4 ventrikül epikard skor sonuçları	68
Tablo 10: Gata-4 ventrikül myokard skor sonuçları.....	68
Tablo 11: Gata-4 ventrikül endokard skor sonuçları	68
Tablo 12: β -catenin atriyum skor sonuçları.....	71
Tablo 13: β -catenin ventrikül epikard skor sonuçları.....	72
Tablo 14: β -catenin ventrikül myokard skor sonuçları.....	72
Tablo 15: β -catenin ventrikül endokard skor sonuçları	72
Tablo 16: YAP atriyum skor sonuçları.....	75
Tablo 17: YAP ventrikül epikard skor sonuçları	76
Tablo 18: YAP ventrikül myokard skor sonuçları.....	76
Tablo 19: YAP ventrikül endokard skor sonuçları	76

ÖZET

FARELERDE HIPPO SİNYAL YOLAĞI AKTİVATÖR VE İNHİBİTÖRÜNÜN FETÜS GELİŞİMİ BOYUNCA KALP HÜCRELER ÜZERİNDE ETKİSİ

ŞEHNE M. Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji (Tıp) Programı Yüksek Lisans Tezi, Aydın, 2017.

Organ büyümesi dahil olmak üzere hücresele düzeyde meydana gelen çeşitli süreçlerde Hippo sinyal yolağı görev almaktadır. Hippo sinyal yolağının transkripsiyon ko-aktivatörü olan YAP birçok genin ekspresyonunda görev almaktadır. Bu nedenle Hippo sinyal yolağının aktivasyonunun veya inhibisyonunun kalp hücrelerinin gelişimi üzerine etkili olduğu düşünülmektedir. Benzer olarak Wnt sinyalizasyonu farklılaşma ve büyüme gibi çeşitli hücresele süreçlerde görev almaktadır ve Hippo sinyal yolağı ile ilişki göstermektedir.

Bu çalışmada fareler kontrol (NT), DMSO, Verteporfin ve C₂ Ceramide olmak üzere dört gruba ayrıldı. Fetal gelişimin 18.5 gününde anneden alınan fetusların ağırlıkları değerlendirildi. 18.5 günlük fare embriyolarının kalp dokularında hippo sinyal yolağının aktivatörü olan Verteporfin ve hippo yolağı inhibitörü olan C₂ Ceramide uygulanması sonrasında YAP, β -katenin, GATA-4 gibi genlerin immünohistokimya ile ifade düzeylerine bakıldı. Ayrıca kalp dokuları PAS, trikrom ve Hematoksilen-Eozin boyaları ile boyanarak morfolojik olarak değerlendirildi.

Deney sonuçlarına göre Verteporfin uygulanan fetüslerin ağırlıkları diğer gruplara oranla anlamlı olarak düşük saptanmıştır. İmmünohistokimya sonuçlarına göre NT ve DMSO gruplarına oranla, Verteporfin grubunda YAP, β -katenin ve GATA-4 ifadesi anlamlı olarak azalırken, C₂ Ceramide grubunda YAP, β -katenin ve GATA-4 ifadesi anlamlı olarak artmıştır. HE boyama ile morfolojik olarak tüm gruplar arasında bir fark görülmemiştir. Trikrom boyama ile gruplar arası epikard ve miyokardda farklılık görülürken, PAS boyama ile Verteporfin grubunda farklılık saptanmıştır.

Bu sonuçlar doğrultusunda Hippo sinyal yolağı kalp gelişiminde yer alan gen ifadelerine etki etmenin yanı sıra Wnt sinyalizasyonunun anahtar proteini olan β -katenin ile de bu süreçlerde etkileşim kurmakta ve ifade düzeylerini etkilemektedir.

Anahtar kelimeler: Kalp gelişimi, Hippo sinyali, Wnt sinyali, verteporfin, C₂ Ceramide

ABSTRACT

THE EFFECT OF HIPPO SIGNALING PATHWAY ACTIVATOR AND INHIBITORS ON THE CARDIAC CELLS DURING THE FETUS DEVELOPMENT IN MICE

SEHNE M. Adnan Menderes University Health Sciences Institute Histology and Embryology (Medicine) Program Master Thesis, Aydin, 2017.

The hippo signaling pathway plays a role in various processes that take place at the cellular level, including organ growth. YAP, Hippo signaling transcription coactivator, is involved in the expression of many genes. Therefore, activation or inhibition of the hippo signaling pathway is thought to be effective on the development of heart cells. Also, Wnt signaling plays a role in various cellular processes such as differentiation, growth, and correlates with the Hippo signal pathway.

In this study, mice were divided into four groups: control (NT), DMSO, Verteporfin and C2 Ceramide. The weights of the fetuses taken from the mother were evaluated at 18,5 days of fetal development. The expression levels of YAP, β -catenin, and GATA-4 genes in the heart tissues of 10.5 and 18.5 day old mouse embryos were examined by immunohistochemistry after administration of Verteporfin, an activator of the Hippo signal pathway and C2 Ceramide an inhibitor of hippo pathway. In addition, heart tissues were evaluated morphologically by staining with PAS, trichrome and hematoxylin-eosin stain.

According to the results of the experiments performed, the weight of verteporfin applied fetuses was significantly lower than the other groups. According to the Results of immunohistochemistry, YAP, β -catenin and GATA-4 expression in the Verteporfin group were decreased significantly compared to NT and DMSO groups, whereas YAP, β -catenin and GATA-4 expression in the C2 Ceramide group increased significantly. There was no difference between the groups on morphology with HE staining. There was a difference in epicardium and myocardium between groups with trichrome staining, whereas there was a difference in Verteporfin group with PAS staining.

In the light of these results, the Hippo signaling pathway not only influences gene expression in heart development but also interacts with β -catenin, the key protein of Wnt signaling, in these processes and affects expression levels.

Keywords: Heart development, Hippo signaling, Wnt signaling, Verteporfin, C2 Ceramide



1. GİRİŞ

Kalp, memeli gelişiminde oluşan ilk organdır. Düzgün bir şekilde boyutlandırılmış ve işlevsel olarak fizyolojisini koruyan bir kalp ömür boyunca yaşamsal önem taşımaktadır. Günümüzde ise konjenital kalp hastalıkları her 1000 canlı doğumda 5 ile 8 arasında bir oran göstererek en büyük sağlık problemlerinden biri olmaktadır (Mangomi ve Nargeot, 2008). Konjenital kalp hastalıkları kötü prognozu nedeniyle yenidoğan mortalitesinin önde gelen nedenlerinden biri olarak önemli bir halk sağlığı problemidir. ABD’de kalp ve kan damarlarının malformasyonundan kaynaklanan bebek ölümlerine ilişkin klinik bir rapora göre mortalite her 100.000 canlı doğumda 3.769’dır (Mcguire ve ark, 1996). Yüksek yenidoğan ölüm oranına ek olarak hayatta kalan yeni doğanların yarısına kadar geniş bir yelpazesinde de nörogelişimsel bozukluklar meydana gelmektedir. Fetüslerde konjenital kalp hastalığının yanı sıra, kanın intrakardiyak karıştırılmasından kaynaklanan hipoksi meydana gelmekte ve bunun sonucu olan yetersiz serebral oksijen serebral gelişimde de bozulmaya neden olmaktadır (Mangomi ve Nargeot, 2008). Bu nedenle, konjenital kalp hastalıklarının terapötik stratejilerini iyileştirmek ve patogenez mekanizmalarını aydınlatılabilmek amacıyla kardiyak gelişim mekanizmalarını anlamak önem arz etmektedir (Morton ve ark, 2001). Kalbin gelişimsel patolojilerinde morfogenetik mekanizmalar hassas bir şekilde rol oynamaktadırlar. Neredeyse birçok insan kardiyak malformasyonları anatomik ve fizyolojik olarak karakterize edilmiş olsa da genetik temeller hala daha tam olarak anlaşılmış değildir (Olson ve Srivastava, 1996). Organ ve dokuların oluşum süreçleri, hücrelerin kaderini belirleyen ardışık gen düzenleyici adımlarla ilerlemektedir ve özel hücre tipleri karmaşık üç boyutlu yapı ve işlev birimlerine organize olmaktadır. Basit model organizmalarda ve omurgalılarda kalp gelişiminin ve genetik temellerinin araştırılması kardiyak hücre akıbeti, miyosit farklılaşmasını ve kardiyak morfogenezi yönlendiren yukarı akış sinyalleme yolları arasındaki fonksiyonel bağlantılardan oluşan birçok gen düzenleyici ağları ortaya koymuştur. Fetal dönem sırasında gen ifadelerinin kardiyovasküler patolojiyi yönlendirmesi genler arası etkileşimin ve sinyallerin önemini arttırmaktadır (Cripps ve Olson, 1998; Bodmer, 1995).

Birçok sinyalizasyonun önemi kardiyogenez ve kardiyak morfogeneizde araştırılmış olsa da bunlardan biri olan Hippo sinyal yolağının kadiyogenezdeki rolü ve fonksiyonları halen daha araştırma ve merak konusudur. Hippo sinyalizasyonu hücre çoğalmasını inhibe ederek, apoptozu teşvik ederek, kök / progenitör hücrelerin kaderlerini düzenleyen ve bazı

durumlarda hücre boyutunu sınırlayarak, organ boyut kontrolünde rol oynayan evrimsel olarak korunmuş ve yakın zamanda tanımlanmış bir sinyal kaskadıdır. Araştırmalar bu yolağın kardiomyosit çoğalması ve kalp büyüklüğünün düzenlenmesinde önemli bir rol oynadığını da göstermektedir. Hippo yolağının inaktivasyonu veya onun efektörü olan Yes ile ilişkili protein (YAP) transkripsiyon koaktivatörünün aktivasyonunun kardiak rejenerasyonu geliştirdiği gösterilmiştir. Ayrıca YAP'ın birçok transkripsiyonel mekanizma ile kardiak kaderi yönlendirdiği düşünülmektedir (Zhou ve ark, 2015).

Wnt sinyalizasyonu ise çoklu ve karmaşık sinyal kaskadlarını kapsamaktadır. Kanonikal Wnt merkezinde yer alan β -katenin ile birlikte doku modellemesi, hücre akıbeti ve hücre bölünmesinin kontrolü gibi birçok gelişim sürecinde yer almaktadır. Sinyal faaliyetlerinin doğru bir şekilde düzenlenmesi embriyonik gelişimin doğru bir şekilde ilerlemesi için gereklidir. Wnt sinyalizasyonunun kardiyoasküler gelişimde yer alması bilinmektedir fakat hala aktivasyonunun veya inaktivasyonunun etkilerinin ne olduğu tamamiyle aydınlatılamamıştır (Hermans ve Blankesteyn, 2015).

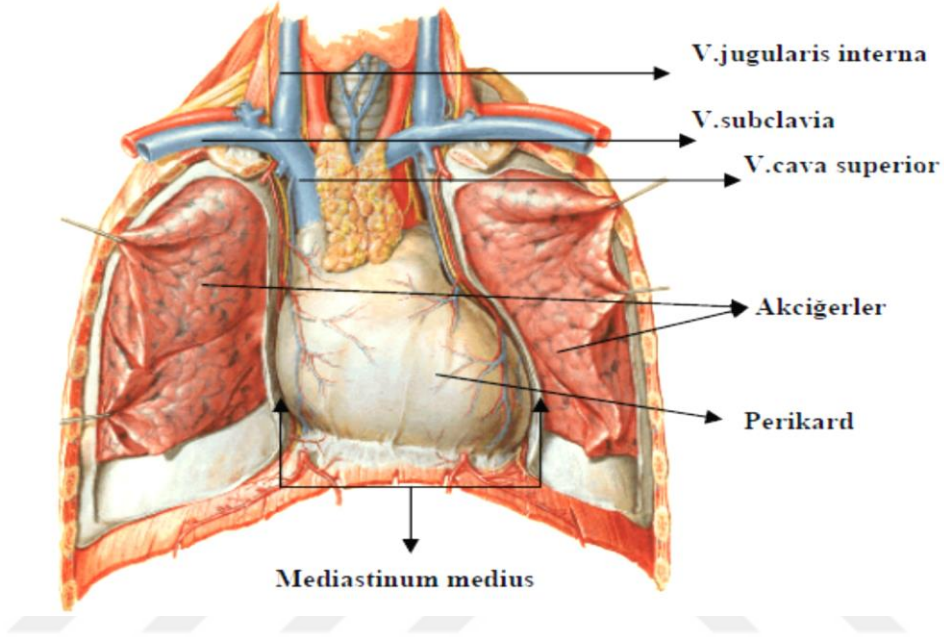
Kardiyogenezde tüm sinyal ağlarının aydınlatılması gerek konjenital malformasyonlar gerekse erişkin dönemlerde meydana gelebilecek miyokard hasarlarının önüne geçilmesine katkıda bulunabilecektir. Bu nedenle Hippo sinyalizasyonunun ve Wnt sinyalizasyonunun terapötik hedef olarak kullanılmasının veya kardiak gelişim süresince etkilerinin tamamen aydınlatılması için daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır.

Bu tez çalışması ile Hippo sinyalizasyonunun kalp gelişim süresindeki etkisi ve aynı zamanda Wnt sinyali ile olası etkileşiminin değerlendirilmesi hedeflenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kalp Histolojisi ve Anatomisi

Dolaşım sisteminin merkez organı olan kalp içi boş musküler piramit yapılı bir organdır ve mediastinum'da perikard içinde bulunmaktadır (Şekil 1) (Kuran, 1983).



Şekil 1: Kalbin toraks boşluğu içinde yerleşimi (Netter, 2006)

Kalbin dış yüzünde fibro-seröz bir zar olan perikardiyum bulunmaktadır. Büyük damarların kalbe giriş çıkış yaptığı noktaları da içeren perikardiyum kalbin toraks boşluğunda bulunan komşu organlara ve diyafragma tutunmasını sağlar (Ross ve Pawlina, 2014).

Kalbin üç yüzü bulunmaktadır. Bunlar; facies sternocostalis (ön), facies diaphragmatica (alt) ve basis cordis (arka). Aynı zamanda aşağıya öne ve sola doğru uzanan bir apex cordis'i vardır (Snell, 2004).

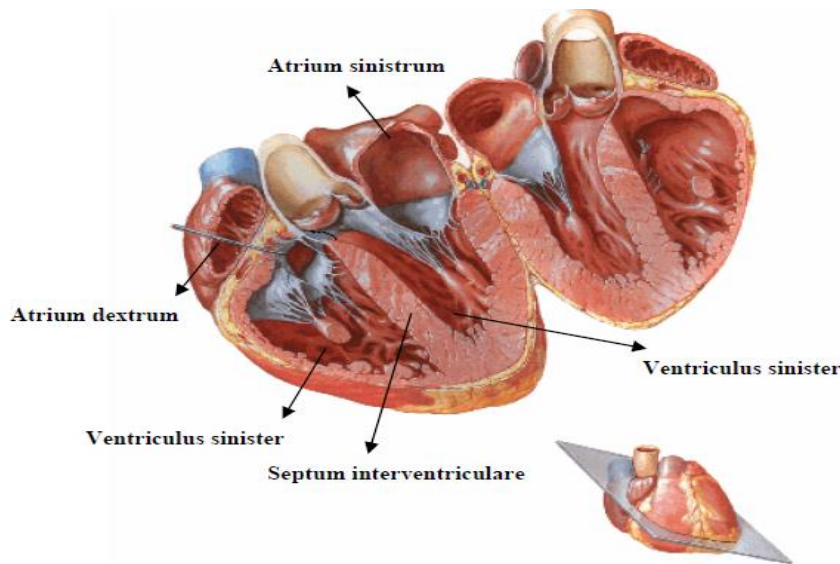
Facies sternocostalis; vertikal seyirli atrioventriküler oluk tarafından birbirlerinden ayrılan sağ atrium ve sağ ventrikül tarafından meydana getirilmiştir. Sağ kenarı sağ atrium, sol kenarı sol ventrikül ve sol auricula'nın bir bölümü tarafından oluşturulmuş olup bu yüzde sağ ventrikül ile sol ventrikül, sulcus interventricularis anterior aracılığı ile birbirinden ayrılmıştır. (Snell 2004).

Facies diaphragmatica, sulcus interventricularis posterior tarafından birbirlerinden ayrılan sağ ve sol ventrikül tarafından meydana getirilmiş olup bu yüzün bir parçasını da v.cava inferior'un açıldığı sağ atriumun alt yüzü oluşturmaktadır (Snell, 2004).

Apeks cordis; kalp tepesi, çentikli bir şekildedir ve bu çentik ön ve alt yüzlerde bulunan sulcus interventricularis'lerin tepede birbirleri ile birleşmesi ile oluşmaktadır. Bu çentik tepeyi ikiye bölerek sağdaki parça sağ ventrikularise soldaki daha geniş parça sol ventrikularise aittir (Kuran, 1983).

Basis cordis; kalp tabanı sağa, arkaya ve yukarı doğru bakmaktadır, konveks bir yapıdadır. Bu tabanda büyük damarlar ve atriumlar yer almaktadır, basis cordis de sol atrium sağ atriuma nazaran daha geniş yer kaplamaktadır. Kalp tabanı aynı zamanda arka mediasten organları ile ilişki kurmaktadır (Kuran, 1983).

Kalp, vertikal bölme ile sağ-sol atriumlar ve ventriküller olmak üzere dört odacığa bölünmüş haldedir ve kan bu odacıklar içinde pompalanmaktadır. Boşlukların çıkış bölgelerinde ise kanın geri kaçışına engel olan kapaklar (valf) bulunmaktadır (Ross ve Pawlina, 2014). Sağ atrium sol atriumun ön kısmında, sağ ventrikül ise sol ventrikülün ön kısmında yer almaktadır. Kalbin duvarları myokardiyum denilen kalp kasından meydana gelmiştir. Bu kas dıştan epikardiyum denilen seröz bir perikard ile içten de ince bir endotel tabakası olan endokardiyum ile sarılmış haldedir (Şekil 2) (Snell, 2004).

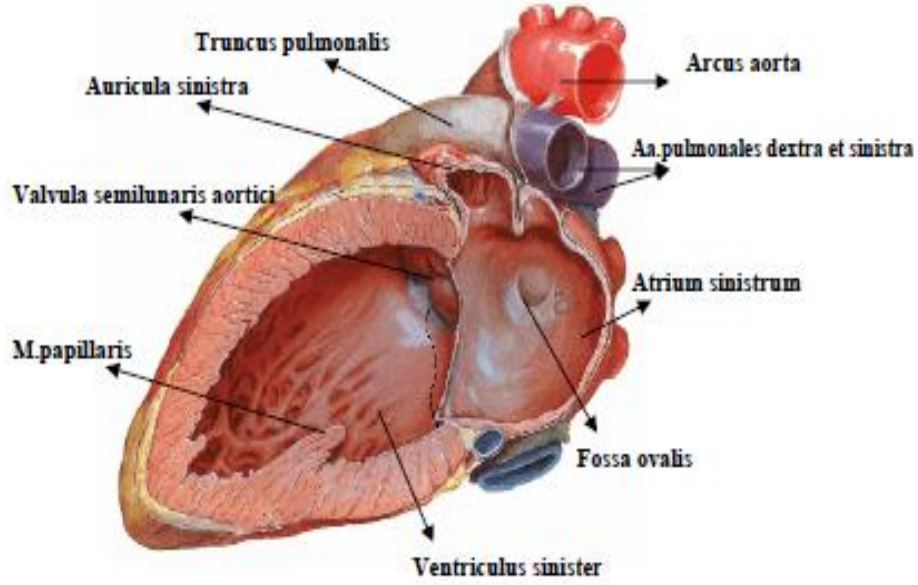


Şekil 2: Kalbin 4 odacığı (atrium dextrum, ventriculus dexter, atrium sinistrum, ventriculus sinister) ve septum interventriculare yer almaktadır (Netter, 2006).

Her iki atrium alt, üst ön arka iç yan dış yan olmak üzere altışar duvarlıdır ve ventriküllere oranla duvarları daha incedir. Atriyumların işlevi venler aracılığıyla kendilerine gelen kanı ventriküllere iletmektedir (Kuran 1983).

Sağ atrium, bir ana boşluk ve küçük bir dış kesecik olan auricula'dan oluşmaktadır. Sağ atrium ve sağ auricula arasında, kalbin dışında bir vertikal oluk sulcus terminalis bulunurken, kalbin iç yüzeyinde çizgi şeklinde bir çıkıntı olan crista terminalis bulunur. Bu çıkıntının arkasında uzanan atrium ana parçası, düz duvarlıdır. Çıkıntının ön yüzündeki atrium kısmı ise musculi pectinati denilen kas lifleri nedeniyle trabeküllüdür. Musculi pectinati, crista terminalis'ten auricula'ya doğru uzanır (Snell, 2004). V.cava superior, vücudun üst yarısından gelen kanın kalbe dönmesini sağlar ve sağ atriumun üst kısmına açılır ve kapağı bulunmamaktadır. Vücudun alt yarısından gelen kanın kalbe dönmesini V.cava inferior sağlar ve sağ atriumun alt kısmına açılır. Fonksiyon görmeyen bir kapağa sahiptir. (Snell 2004, Kuran 1983). Vena cava inferior ile atriventriküler deliğin arasında sağ atriuma açılan sinus coronarius, kalp duvarından gelen kanın büyük kısmını drene etmektedir (Snell 2004). Ostium atrioventriculare dextrum, vena cava inferior'un açılma yerinin önünde yer alır ve burada triküspit kapak bulunur (Şekil 3) (Snell 2004).

Aynı sağ atrium gibi sol atrium da bir boşluk ve bir aurikuladan oluşmaktadır. Sol atrium sağ atriumun arkasında yer alır ve kalbin taban veya arka yüzünün büyük bir bölümünü meydana getirir. Arka tarafında seröz perikardın oblik sinusu uzanırken fibröz perikard sol atriumu özofagustan ayırmaktadır. Sol atriumun iç yüzü düzdür, fakat sol aurikula, müküler çıkıntılara sahiptir (Snell 2004).



Şekil 3: Atrium sinistrum ve buraya açılan yapılar ile birlikte ventriculus sinister boşluğu (Netter, 2006)

Her akciğerden iki tane olacak şekilde, dört vena pulmonalis arka duvara açılır ve bunların kapakları bulunmamaktadır. Sol atrioventriküler delikte ise (ostium atrioventriculare sinistrum) mitral kapak bulunur.

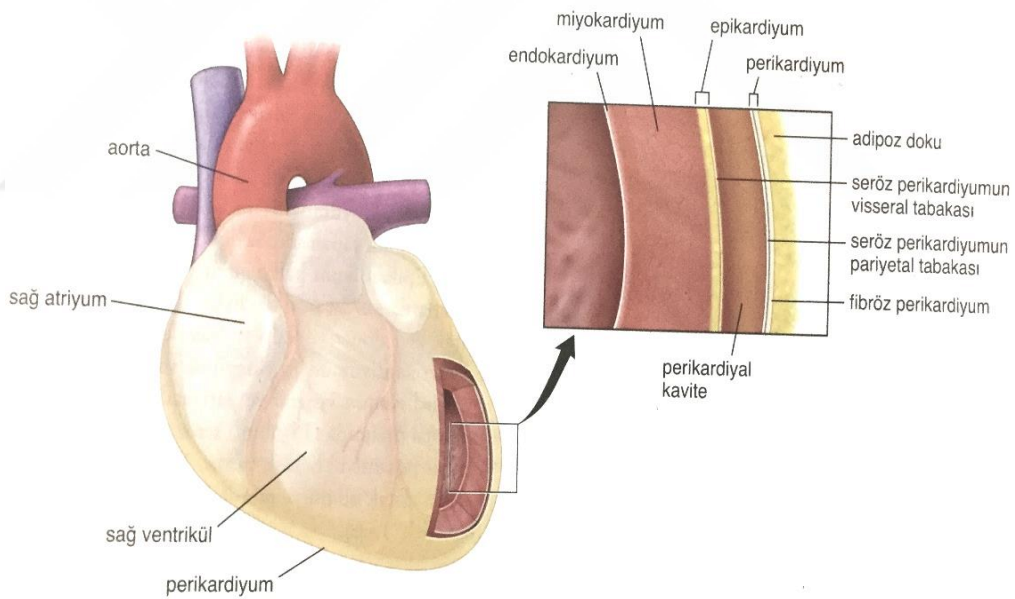
Sağ ventrikül (ventriculus dexter) atrium dextrum'dan apex cordis'e kadar uzanmaktadır. Kalbin facies sternocostalis'inin büyük bir kısmını oluşturmaktadır. Ön kısmının büyük çoğunluğu perikardiyum vasıtasıyla göğüs ön duvarıyla ilişki kurarken sol tarafında kalan ufak bir kısmı sol plevra ve sol akciğerin ön kısmı ile ilişki kurar (Arıncı ve Elhan, 2014). Sağ atriuma oranla sağ ventrikülün duvarları çok daha kalındır ve kas demetlerinden oluşmuş iç çıkıntılar göstermektedir. Bu çıkıntılar ventrikül duvarına sünger şeklinde bir görüntü vermektedir ve bu çıkıntılar trabeculae carnea ismiyle bilinir (Snell, 2004).

Sol atriumla atrioventriküler delik vasıtasıyla ve ostium aortae vasıtasıyla da aorta ile birleşen sol ventrikül (ventriculus sinister) kan basıncının sağ ventrikülün içindeki basınçtan daha yüksek olmasından dolayı sağ ventriküle oranla daha kalın bir duvara sahiptir. Enine kesitte, sağ ventrikül yarım ay şekilli bir görünüme sahipken, sol ventrikül sirküler görünümündedir; bunun nedeni septum interventricularenin sağ ventrikül kavitesi içine doğru bombeleşme yapmasıdır (Snell 2004). Her iki ventrikül arasında septum interventriculare

yer almaktadır. Sol ventrikül iyi gelişmiş trabeculae carnae ve iki büyük m.papillaris bulundurmaktadır, fakat moderator band'a sahip değildir (Snell, 2004). Ostium atrioventriculare sinistrum'un sağ kısmında bulunan delik ostium aortae olarak adlandırılmaktadır ve burada valva aortae olarak isimlendirilen üç tane semiluner kapakçık yer almaktadır (Arıncı ve Elhan, 2014).

Kalbin iskeletini ise kalp delikleri etrafında bulunan dört adet annulus fibrosus ile bunlar arasında bulunan trigonum fibrosum dextrum ve sinistrum oluşturmaktadır (Arıncı ve Elhan, 2014).

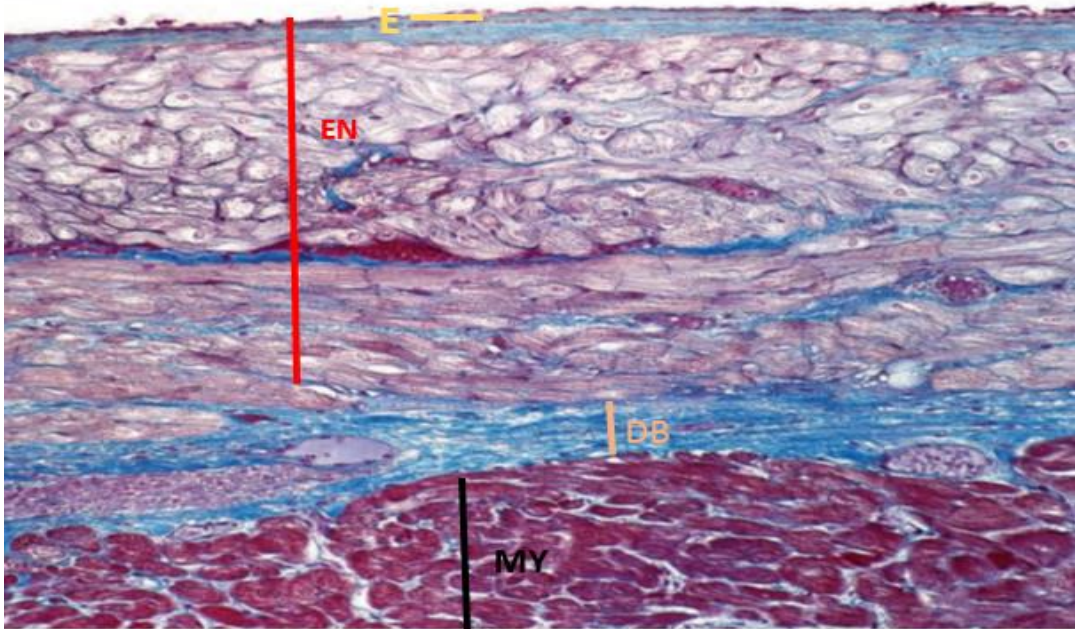
Kalp, içte endotelial bir tabaka olan endokardiyum (Endokard), ortada kas tabakası olan miyokardiyum (miyokard) dışta ise mezotelyal fibro-seros bir yapıda olan perikardiyum (Perikard) olmak üzere üç tabakadan meydana gelir (Şekil 4) (Kuran 1983).



Şekil 4: Kalp ve perikardiyumun tabakaları (Ross ve Pawlina, 2013)

Endokardiyum, kalp boşluklarının iç yüzeylerini, kalp kapakçıkları, M. papillaris, chorda tendinae, M. pectinati ve trabecula carnea'ları saran ince düz iki tabakalı bir zardır. İç tabakasını tek katlı endotel hücreleri ve subendotelial bir bağ dokusu oluştururken dış tabakasını kollajen, elastik ve bir miktarda düz kas liflerinden oluşan subendokardiyal bir tabaka oluşturmaktadır (Arıncı ve Elhan, 2014, Ross ve Pawlina, 2013). Kalınlığı

bulunduğu yere 20-500 mikron arasında değişiklik göstermektedir. Valvula'lar çevresinde ise bu fibröz doku çok sertleşerek adeta kıkırdaklaşmaktadır. Sürtünmelerin ve kas yapısının bol olduğu yerlerde ise incedir (Kuran, 1983). Birbirleri ile çapraz yaparak bir ağ oluşturan kollajenler, kalbin sistolü sırasında dalgalı halde bulunurlar ve diastol esnasında düz hale gelerek kalbin daha fazla genişlemesini önlerler. Diastol esnasında genişleyen kalbin tekrar eski hale dönmesine de elastik lifler yardım eder (Arıncı ve Elhan, 2014). Kalp kapakları bağ dokusu ve bağ dokusunun üzerinde yer alan endokardiyumdan meydana gelmektedir. Düzensiz sıkı bağ dokusu bileşenlerinden oluşan kompleks bir ağa tutunur halde bulunmaktadırlar ve bu ağ fibröz halkaları oluşturarak kapakları içeren delikleri sarmaktadır (Ross ve Pawlina, 2013). Her bir kapak üç tabakadan meydana gelmektedir. Fibroza tabakası, kapağın merkez kısmını oluşturur ve kalbin iskeletinden gelen düzensiz sıkı bağ dokusu fibröz uzantıları içermektedir. Spongiyoza tabakası, her bir kapağın atriyal veya kan damarları kısmında yer alan gevşek bağ dokusudur. Gevşek düzenlenmiş kollajenler ve elastik liflerden meydana gelmektedir. Ventrikülaris tabakası ise her bir kapağın atriyal ya da ventriküler yüzeyine komşu olarak bulunmaktadır ve endotel ile kaplıdır. Yoğun bir elastik lif tabakası içeren sıkı bağ dokusundan oluşmaktadır (Ross ve Pawlina, 2013).



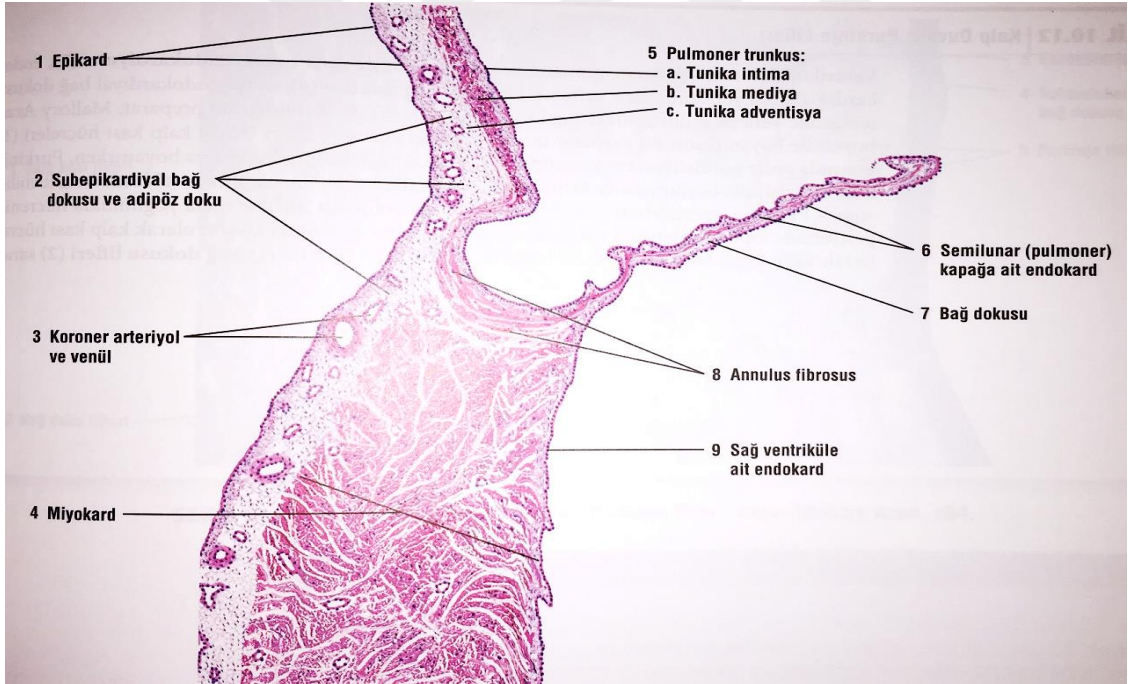
Şekil 5: Kalp duvarının histolojik yapısı, E; Endotelyum, EN; Endokard, DB; Düzensiz Bağ dokusu, MY; Miyokardiyum. (Ross ve Pawlina, 2013)

Endokardiyum kan damarları bulundurmamaktadır. Myokardiyumdan çıkan lympha yolları endotelyum altına kadar girerek bu tabakanın beslenmesini sağlamaktadırlar. Ayrıca endotel tabakasının altında çok sayıda sinir ağları mevcuttur bu ağlar kalp içi refleksler ile stimulusların oluşturulması ve dağıtılmasında önemli rol oynamaktadırlar (Kuran 1983).

Myokardiyum, kalp kasından meydana gelmektedir ve kalbin ana bileşenini oluşturmaktadır (Ross ve Pawlina, 2013). Mikroskopik açıdan çizgili kasa benzeyen myokardiyum işleyiş olarak düz kas gibi davranmaktadır. Birbirleri ile iç içe girmiş kas lifleri sinirlerini otonom sinir sisteminden almaktadırlar. Kalp kasları birbirlerine bağ dokusu ile bağlanmış olup demetler oluşturur ve bu demetlerde tabakaları meydana getirmektedir (Arıncı ve Elhan, 2014, Kuran, 1983. Atrium ve ventriküller arasında fibröz kalp iskeleti bulunduğu bunları saran kaslar birbirlerinin devamı olmaz ve bu yüzden atrium ve ventriküller ayrı ayrı kasılabilirler (Yıldırım, 2013). Sağ ve sol atriumları saran kas tabakası birbirleriyle devam etmezken ventrikülleri oluşturan kas tabakasındaki lifler birbirleri ile devam etmektedir (Arıncı ve Elhan, 2014). Kas lifleri atriumları saran lifler, ventrikülleri saran lifler ve fasciculus atrioventricularis (His Huzmesi) olmak üzere üç gruba ayrılmaktadır. Atriumları çevreleyen kas tabakası ventrikül duvarına oranla daha incedir ve diziliş yönleri farklı olan iki tabakadan meydana gelmektedir. Yüzeysel tabakada bulunan lifler her iki atriumu birden sararken, derin tabakadakiler sadece bir atriumu sararlar. Ventriküllerin kas tabakası ise atriuma oranla daha kalın olup daha karışık bir yönelme izlerler (Arıncı ve Elhan, 2014). Sol ventrikül duvarı ise sağ ventrikül duvarına oranla daha kalındır ve burada myokardiyum 3 tabakalıdır. Her bir tabakada bulunan lifler ise farklı yönlere doğru dağılmış durumda bulunurlar fakat birbirlerinin devamı şeklindedirler. Her bir kas lifi kalp iskeletinden başlayarak üç tabakayı meydana getirecek şekilde farklı yönlere doğru uzanır ve tekrar kalp iskeletinde sonlanır. Orta tabaka en kalın iken dış tabaka en ince olandır. Septum interventriculare'in yapısına katılan orta ve iç tabakada bir ventrikülden diğerine geçmez iken dış tabakanın lifleri her iki ventrikülü de çevrelemektedir (Şekil 5) (Arıncı ve Elhan 2014, Kuran, 1983).



Şekil 6: Kalp kası lifleri (diFiore'nin Histoloji Atlası, 2013).



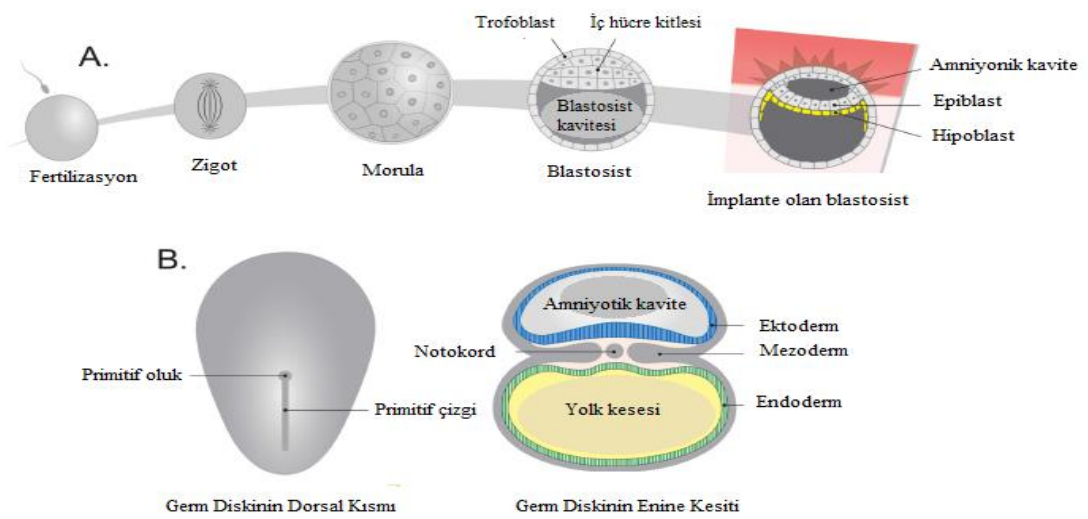
Şekil 7: Kalp, sağ ventrikül (diFiore'nin Histoloji Atlası, 2013)

Perikardiyum kalp ve büyük damarların kök kısmını çevreleyen iki tabakalı fibroseröz bir zarıdır. Dışta fibröz, pericardium fibrosum, içte seröz, pericardium serosum olarak

iki tabakadan meydana gelir (Arıncı ve Elhan, 2014). Epikardiyum ise kalbin dış yüzeyine bitişik haldedir ve seröz perikardiyumun visseral tabakasıdır (Şeki 7). Bu visseral tabaka tek tabakalı mezotelyum hücrelerinden ve bunların altında yer alan bağ ve adipoz dokudan meydana gelmektedir. Seröz perikardiyumun pariyetal tabakası ise kalbe giren ve çıkan büyük damarlarda perikardiyumun iç yüzeyinde uzanmaktadır (Ross ve pawlina, 2013).

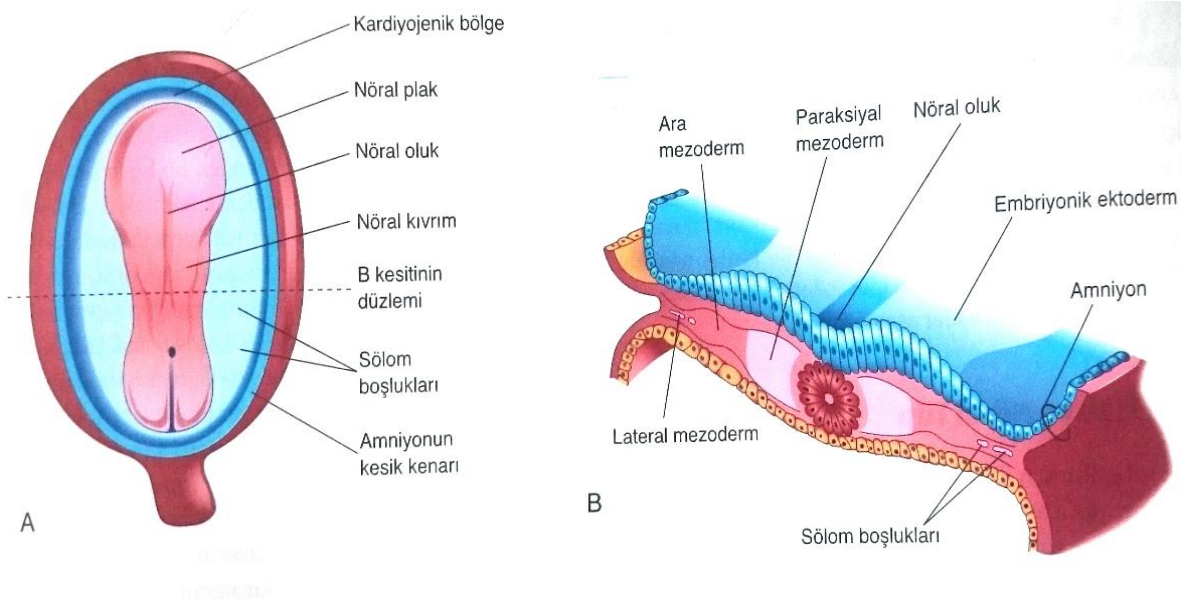
2.2. Kalbin Embriyolojik Gelişimi

Fertilizasyon ile gametler yani oosit ile sperm füzyona uğramaktadır. Böylece embriyogenez denen süreç başlamakta ve zigot meydana gelmektedir. Mitotik bölünmeler ile zigot birçok aşamadan geçerek blastosist aşamasına gelmekte ve bu aşamada uterusu implante olmaktadır (Kloesel ve ark, 2016). Blastosistin bir kutbunda embriyoyu oluşturacak olan iç hücre kitlesi bulunurken, blastosist kavitesi ile aynı zamanda iç hücre kitlesini de çevreleyen dış hücre kitlesi diğer bir adı ile trofoblast hücreleri bulunmaktadır. Dış hücre kitlesi farklılaşarak plasentayı oluşturacak yapıya katılırken, iç hücre kitlesi embriyoyu oluşturacak dokuları meydana getirecektir (Sadler, 2011). Embriyogenez devam ettikçe iç hücre kitlesinin blastosist kavitesini saran kübik hücrelerden hipoblast tabakası, amniyon kavitesini saran prizmatik hücrelerden epiblast tabakası oluşmaktadır. Bu tabakalar birlikte bilaminar germ diskini oluşturmaktadır. Bu süreçte epiblast tabakası içerisinde bir kavite meydana gelmektedir ve bu kavite amniyon boşluğu adını almaktadır (Şekil 8) (Moore ve Persaud, 2016).



Şekil 8: Fertilizasyon. A) Döllenme ve aşamaları. B) Üç germ hücre tabakasıyla germ diskinin farklılaşması (Kloesel ve ark, 2016)

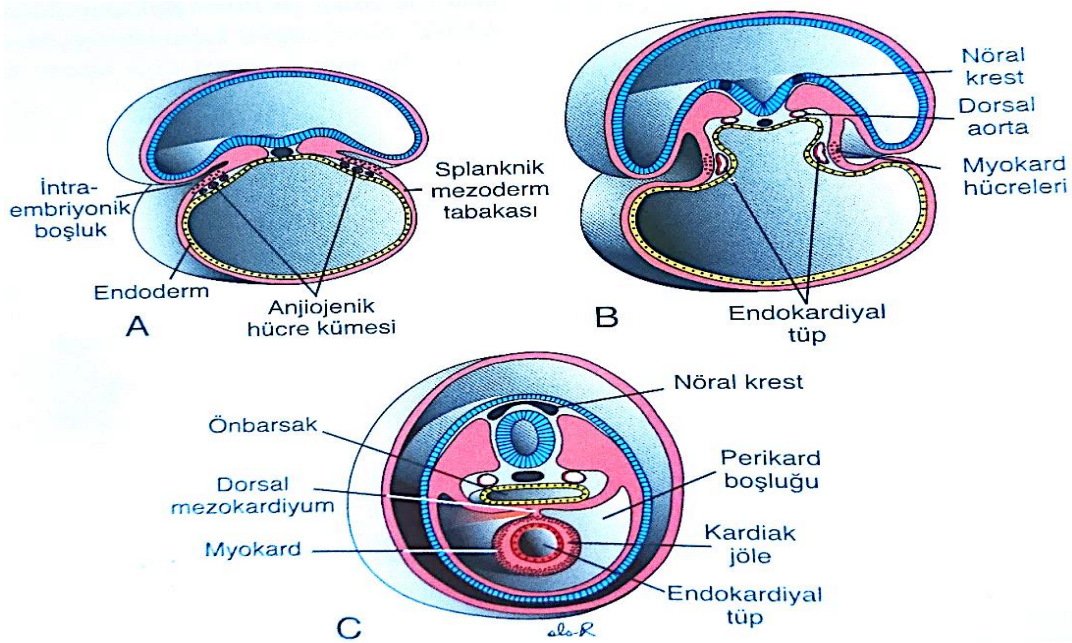
Embriyo yaklaşık 15-16 günlük olduğunda epiblastın yüzeyinde kaudal bölgeden kranial bölgeye doğru primitif (ilkel) çizgi oluşmaktadır. Orofaringeal (kranial) ve kloakal (kaudal) membranlar arasından primitif düğüme doğru uzanmaktadır. Sefalik uçta ise primitif düğüm primitif çukuru çevrelemektedir (Sadler, 2011; Kloesel ve ark, 2016). Epiblast hücrelerinin çoğalması ve göçü sonucu oluşan primitif çizgiden epiblast hücreleri çizgi boyunca hareket ederler ve çukurdan epiblastın altına doğru yerleşirler. Bu yerleşim düzeni hipoblastın itilmesiyle embriyonik endodermi, yeni oluşmuş endoderm ile epiblast arasında embriyonik mezodermi, epiblastta ise embriyonik ektodermi meydana getirmektedir (Şekil 9). Primitif çizgi kökenli mezenkimal hücreler geniş çaplı şekilde göç ederler ve bu hücre tipleri çeşitli hücre tiplerine farklılaşma yeteneğine sahiptirler (Sadler, 2011, Moore ve Persaud, 2016). Epiblast hücrelerinin gelecekleri, primitif çizgi boyunca göç etme yönüne göre belirlenir. Primitif düğümün kranial alanından içeriye doğru göç eden hücreler prekordal plağı ve notokordu oluştururken, primitif çizginin kranial ucu ve düğümün lateral bölgelerine göç edenler paraksiyel mezodermi, çizginin orta bölgesinden göç edenler intermediate mezodermi, çizginin kaudal bölgesinden göç eden hücreler lateral plak mezodermini, en kaudal kısımdan göç edenler ise ekstraembriyonik mezodermi oluştururlar (Sadler, 2011).



Şekil 9: Embriyonik gelişimin 19 ve 21 günleri. A, nöral diskin dorsal görüntüsü. B, Embriyonik diskin dorsalinden transvert kesit (Moore ve Persaud, 2016)

21. günde gerçekleştirirken kan pompalamaya 24. ve 25. günler civarında başlamaktadır (Kloesel ve ark, 2016).

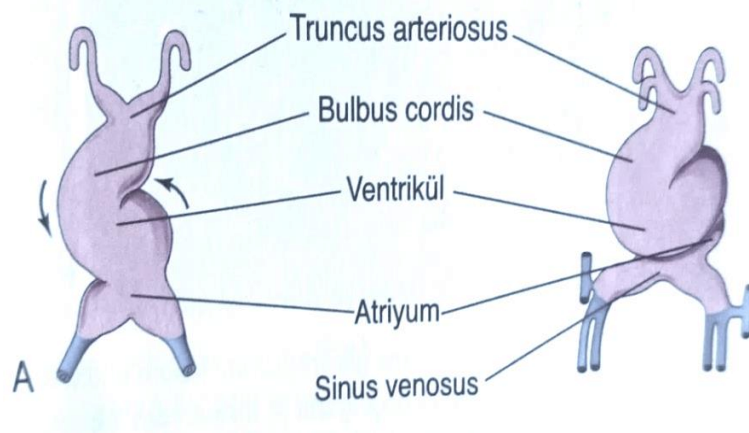
Embriyonik büyüme ile gerçekleşen kraniyo-kaudal ve lateral eksenlerde kıvrılma sonucu endokardiyal tüpler önce servikal ve sonra torasik bölgeye taşınır. Dorsal aortun kraniyal uçları ilk aortik kemeri oluşturmak üzere dorsoventral bir bölge olana kadar ventral olarak çekilir. Dördüncü ve beşinci haftaya kadar faringeal kemerlerle bağlantılı olarak dört ve daha fazla aortik kemer gelişim gösterir (Larsen, 1998). Her iki taraftaki yanal plak mezodermin splanknik tabakasında yer alan endokard tüpleri kaynaşarak orta hat alanında tek bir endokardiyal tüp oluşumunu sağlar. Bu iki tüpün füzyon olayı bağlantı yüzlerinde ki programlı hücre ölümü ile sağlanmaktadır. Yine büyük kan damarları endokardiyal tüp oluşumu ile aynı zamanlı gelişim göstermektedir (Kloesel ve ark, 2016). Kalbin birincil çıkış yolunu oluşturan çift dorsal aort ise notokordun her iki tarafındaki embriyonik diskin dorsal mezenkiminde gelişir ve katlanmaya başlamadan önce endokardiyal tüplerle bağlantısını oluşturur (Larsen, 1998). Endokardiyal tüp, miyokardiyal hücreler tarafından oluşturulan miyokardan ve endotel hücreleri tarafından oluşturulan endokardan meydana gelmektedir. Kardiyak jöle adı verilen bir hücre dışı matris bu iki hücre tipini ayırmaktadır (Şekil 11). Epikard daha sonra proepikardiyal öncül hücrelerin göçüyle oluşturulmaktadır (Kloesel ve ark, 2016).



Şekil 11: Endokardiyal tüplerin tek bir endokardiyal tüp halini almasını gösteren transvers kesitler. A. 17. gün, B. 18. gün, C. 22. Gün (Sadler, 2011)

Geçmişte, kalp tüpünün son halini yani dört odacıklı kalbi oluşturmak için gerekli tüm elementleri içerdiği kabul edilmekteydi fakat yeni araştırmalar, ilk kalp alanındaki hücreler tarafından oluşturulan ilkel kalp tüpünün, dört bölmeli kalpten sadece küçük bir bölüm oluşturduğunu göstermektedir. İlk kalp alanındaki hücreler bir iskele sağlarken, kalbin çoğunluğu kalp tüpünün uzamasına neden olan ikinci kalp alanından kaynaklanan öncü hücre göçüyle oluşturulmaktadır (Kelly, 2012). Endokardiyal tüpün yeniden düzenlenmesi dört kalp odasının oluşturulabilmesi için çok önemlidir. Kardiyak düğüm, öncü hücrelerin göçüyle endokardiyal tüpün uzaması ile yönlendirilir. 23 ile 28 günler arasında endokardiyal tüp kardiyak düğüm yapısını üstlenmek için bükülür. Çıkış bölgelerinin ve atriyoventriküler kanalın orta hat pozisyonuna hareket ettirilmesi bu yapıları hizalamaktadır ve bu süreçte yakınsama olarak bilinmektedir (Kelly, 2012).

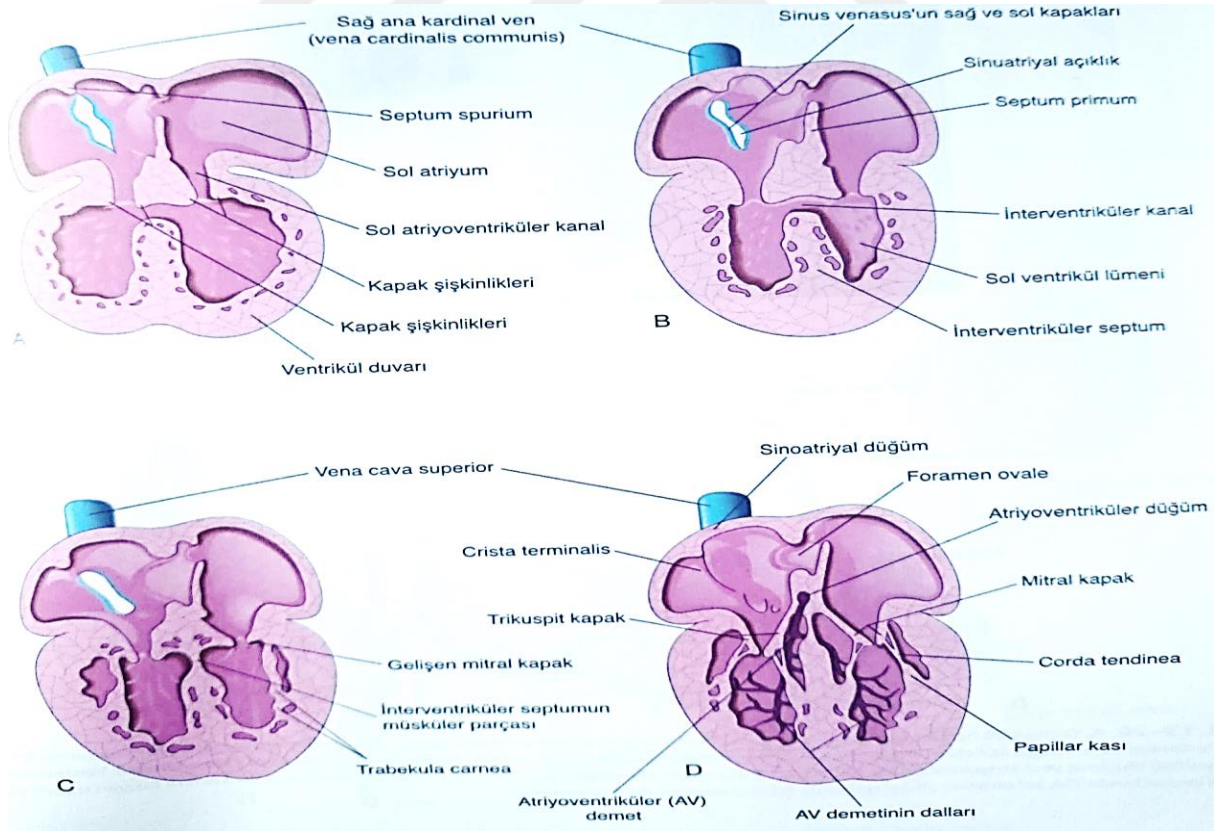
4. haftanın başlarında artık kalp tüpünde sinus venozus, truncus arteriosus, bulbus cordis, ventrikül ve atrium adı verilen bölmeler oluşmuş olur. Aorta arkuslarının çıktığı aort kesesi, Truncus arteriosus'un kranyal ucunda bulunurken kalp tüpünün en kaudal kısmında bulunan sinus venosus'a ise umbilikal ven, vitellin ve embriyodan ana kardinal venler açılmaktadır (Larsen, 1998). Bulbus cordis ve ventrikül çok hızlı büyümektedir bu nedenden dolayı 28.günde kalp tüpü eğim yaparak ve at nalı şeklinde bir bulboventriküler halka oluşturmaktadır. Atrium ve sinus venosus bu eğim ile birlikte truncus arteriosus, bulbus cordis ve ventrikülün arka bölgesinde yer alır (Şekil 12). Bu sayede 4 kalp boşluğunun uzaysal düzenlenişi sağlanmış olmaktadır (Cankara, 2010).



Şekil 12: 4. Haftada primordiyal kalp tüpü ve saat yönünün tersine kıvrılma hareketi (Moore ve Persaud, 2016)

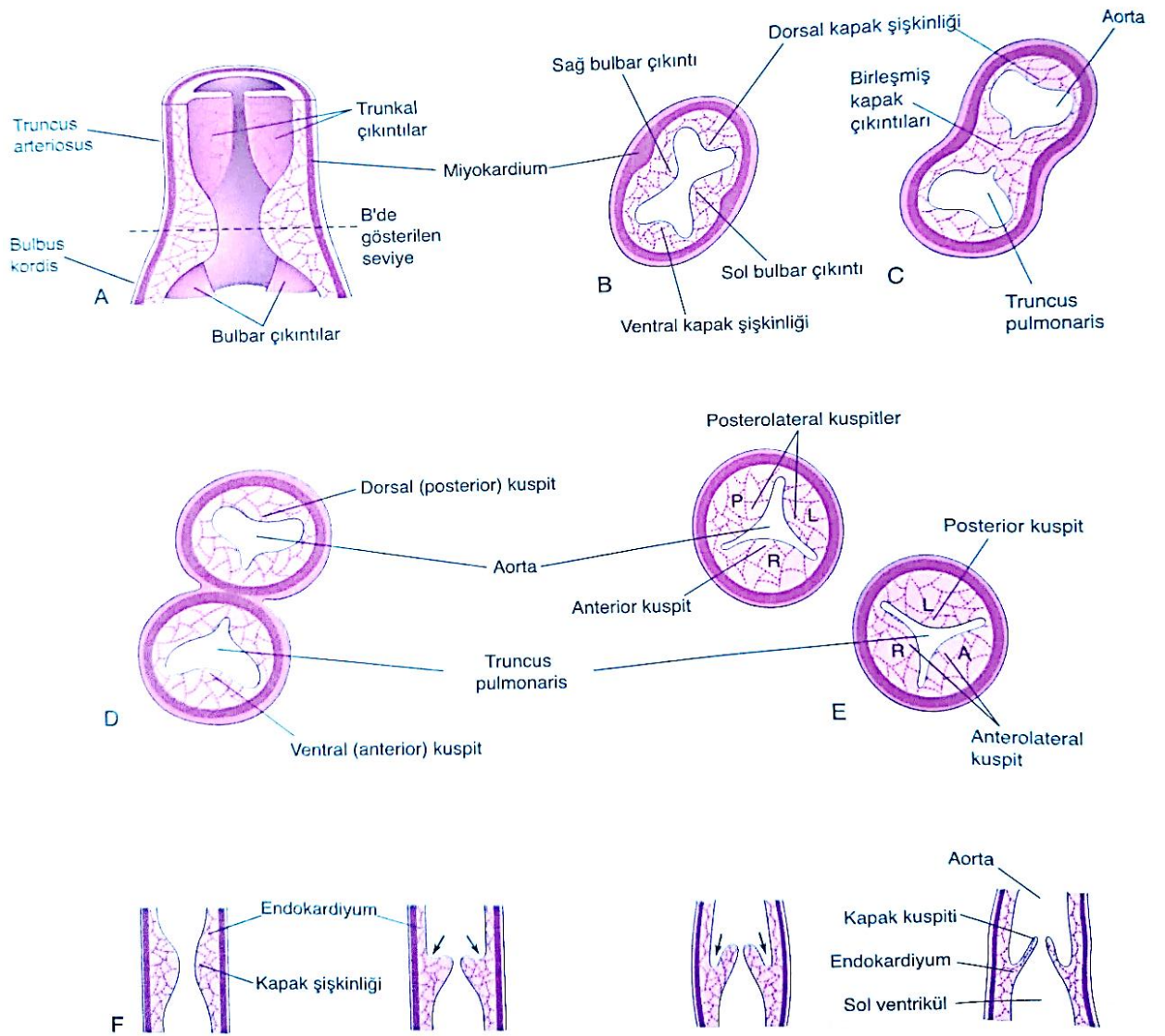
Dördüncü haftanın sonuna doğru atriyoventriküler kanalın ventral ve dorsal duvarından endokardiyal yastıklar meydana gelir. Bu yastıklar nöral krest ve kardiyak jelden köken almaktadır. Beşinci haftada endokardiyal yastıklar mezenkimal hücrelerin göçüyle birbirine yaklaşır ve atriyoventriküler kanalı sol ve sağ atriyoventriküler kanallar olmak üzere ayırır (Moore ve Persaud, 2016). Atriyal septasyon, gebeliğin dördüncü ve beşinci haftalarında tabandan tepeye doğru yükselen septum ile başlar. Septum primum sol ve sağ atriyumu iki farklı alan dışında böler. İlkel atriumda ilk olarak septum primum ve septum sekundum oluşmaktadır (Moore ve Persaud, 2016). Bu septumlar farklılaşarak birbiriyle birleşir ve ilkel atrium sağ ve sol atriumlara ayrılır. Septum primum, ilkel atriumun dorsokraniyal duvarından 28. günde atriyoventriküler kanalı bölen endokardiyal yastıklara doğru büyüyen ince bir zarıdır. Bu zarın serbest kenarıyla endokard yastıkları arasında foramen primum denilen bir delik bulunur ve zar endokard yastıkları ile kaynaştığında foramen primum kapanmaktadır (Sadler, 2011). Foramen sekundum ise foramen primum kapanmadan önce septum primumun orta kısmındaki programlanmış hücre ölümü sayesinde oluşan deliklerin birleşmesiyle oluşmaktadır. İlkel atriumun ventrokraniyal duvarından ikinci bir zarın septum primumun sağına doğru büyümesiyle septum sekundum oluşmaktadır 5. ve 6. haftalarda büyüyerek giderek septum primum üzerindeki foramen sekundumun üzerini kapatır. Septum sekundum atriumlar arasında tam bir bölme oluşturmaz, üst ve alt ayakları arasında bir açıklık bırakır. Bu açıklık foramen ovale'dir. Doğumdan önce sağ atriuma gelen kanın sol atriuma geçmesini sağlar ve doğumdan sonra ise sol atriumdaki basıncın yükselmesiyle doğumdan sonraki 3 hafta içinde kapanır (Moore ve Persaud, 2016). Dördüncü haftanın ortasından itibaren sinüs venozus sağ ve sol boynuzlarından venöz kan almaya başlamaktadır. Vitellin ven, umbilikal ven ve ortak kardinal ven bu boynuzlara gelmektedir. Sol boynuz 5. haftada gerçekleşen sağ umbilikal ven ve sol vitellin venin kapanmasıyla önemini kaybeder. Sağ boynuz ise genişler, atriuma açıldığı delik sağa kayar. Sağ boynuz baş-boyun bölgesindeki kanı superior vena cava yoluyla, vücudun alt kısmından gelen kanı ise vena cava inferior yoluyla alır ve sağ atriuma boşaltır (Sadler, 2011). Gelişim ilerledikçe başlangıçta ilkel kalbin ayrı bir bölümü olan sinüs venozusun sağ boynuzu sağ atrium duvarına katılır. Bu sayede vena cava superior ve inferior sağ atriuma direkt olarak açılır. Ayrıca sağ atriyum bu duvarı sinüs venarum adını alır. Geri kalan trabeküllü bir görünümde ve burası sağ aurikula adını almaktadır, atriyumun iç yüzeyinde bu iki kısım crista terminalis ile ayrılırken dışardan sulcus terminalis ile ayrılmaktadır (Moore ve Persaud, 2016).

Primordiyal ventrikül ilk olarak interventriküler septum ile bölmelenir. Septum, ventrikülün apeksine doğru tabanında yer almaktadır aynı zamanda sağ ve sol primordiyal ventriküllerin miyositleri de bu septumun yapısına katılarak buradaki proliferasyon septum boyutunu arttırmaktadır (Moore ve Persaud. 2016, Larsen. 1998). İnterventriküler septumun serbest kenarı ile kaynaşmış durumda bulunan endokardiyal yastıklar arasında yedinci haftaya kadar hilal şeklinde interventriküler foramen bulunmaktadır. Bu yapı sağ ve sol ventriküller arasındaki geçişe izin vermektedir. İnterventriküler foramen yedinci haftanın sonunda bulbar çıkıntılarının endokardiyal yastıklar ile kaynaşmasıyla kapanır. İnterventriküler septumun musküler kısmı ile endokardiyal yastığın sağ tarafında bulunan kısım İnterventriküler septumun membranöz kısmını oluşturur (Cankara, 2010; Sadler, 2011). İV foramen kapandıktan sonra trunkus pulmonalis ile sağ ventrikül ilişki kurarken aorta ile sol ventrikül aracılığıyla iletişim sağlanmış olur (Şekil 13). Ventrikül duvarlarında kavitelerin oluşumuyla ise ağ şeklinde kas demetleri meydana gelir. Bu kas demetlerinden ventriküllerin trabekül yapısı, papiller kaslar ve korda tendinealar oluşmaktadır (Moore ve Persaud, 2012).



Şekil 13: Atrioventriküler kapakların chordae tendinea ve musculus papillaris'in gelişimi (Moore ve Persaud 2016)

Kalp kapakları ise subendokardiyal bağ dokusunun artmasıyla oluşmaktadır. Endotel ile sarılmış sıkı bir bağ dokusu yapısındadır. Atrioventriküler kanalların etrafındaki mezokimal dokunun artışıyla sol atrium ve ventrikül arasında mitral (biküspid), sağ atriumla sol ventrikül arasında ise triküspid kapaklar gelişmektedir (Şekil 14). Aort ve pulmoner turunkus çevresinde ise semilunar kapaklar meydana gelir. Semilunar kapaklar 9. haftada gelişimini tamamlar (Moore ve Persaud 2016, Sadler 2011).

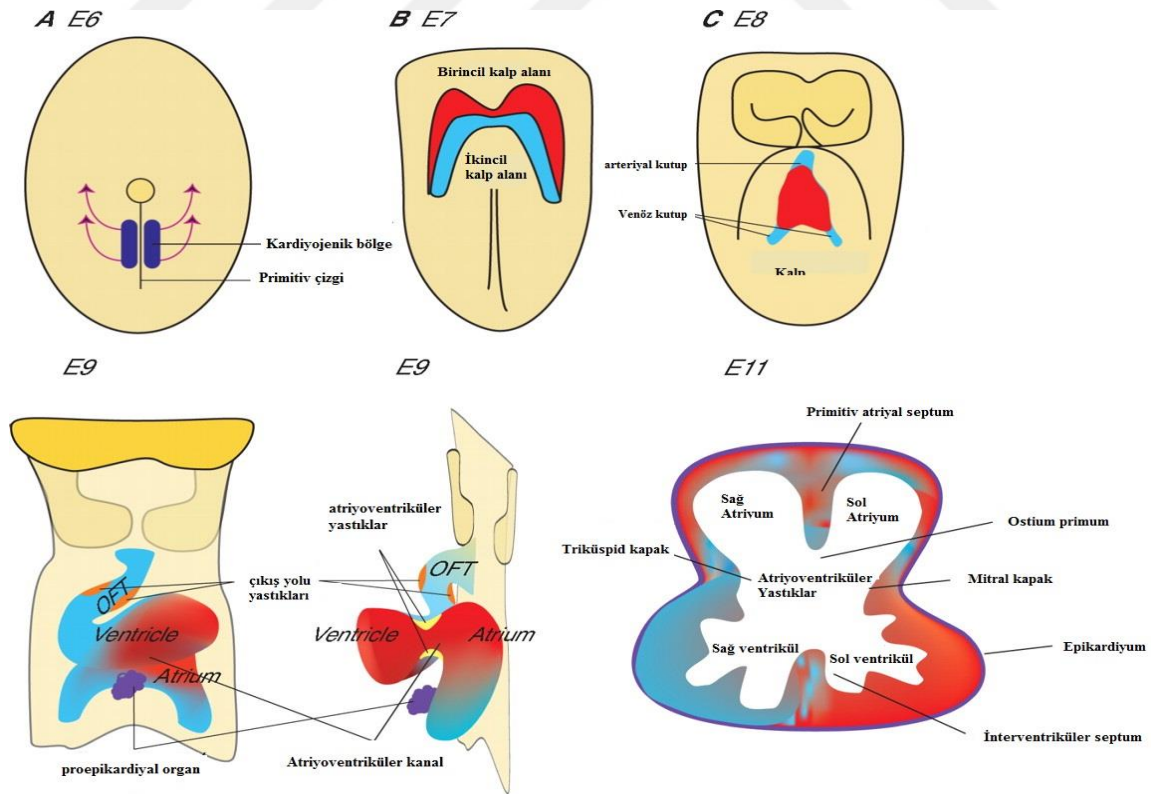


Şekil 14: Semilunar kapaklarının gelişimi (Moore ve Persaud 2016).

2.3. Farelerde Embriyonik Kalp Gelişimi

Fare embriyosunda da ilk gelişen ve işlev gösteren organ kalptir. Fare embriyosunun 7,5 gününde (E7.5) primitif çizgide bulunan prekürsör hücrelerden farklılaşan kardiyomiyositler primitif çizginin arteriyo-lateral yönünde hareket ederek çift taraflı kardiyojenik plakaları (miyokardiyal, primordiyal) meydana getirirler. Bu plakaların altında bulunan endotelial hücreler farklılaşarak sağ ve sol endokardiyal kalp tüpünü oluşturur (Kaufman ve Bard, 1999). Embriyonun 8. gününde (E8.0) bu endotelial kaplı damarlar birbirlerine paralel olarak hizalanır, rostral-arteriyal (aortik kese) ve kaudal venöz kutuplar (sağ ve sol sinüs boynuzları) tek bir kalp tüpünü oluşturmak üzere orta hatta füzyona uğrar (Şekil 16). Başlangıçta düzensiz olan kalp atışları E9.0 da düzenli bir kasılmaya dönüşür. Venöz kutup bir kalp pili gibi davranır ve kalp kasılması kalp tüpü boyunca yayılır (Şekil 15) (Kaufman ve Navaratnam, 1981).

Kalp tüpü dış miyokardiyal hücreler ve iç endotelial hücrelerden oluşmaktadır ve bu iki hücre tabakası arasında ekstraselüler matriks olan kardiyak jöle yer almaktadır (Kaufman ve Navaratnam, 1981). Kalp tüpü venöz kutbun kranial ve dorsal hareketi ile E8.5 ve E10.5 günler arasında sağa doğru döner.



Şekil 15: Farede erken dönem kalp gelişimi (Lin ve ark, 2012)

Sağa doğru kıvrılma ile eş zamanlı olarak kalp tüpü uzar ve gelecekteki odalarda balonlaşmaya başlamaktadır. Birincil kalp tüpünün oluşmasından sonra çıkış yollarının uzatılması için faringeal arkuslardan myokardiyum (ikinci kalp bölgesi) eklenir (Kirby 2007; Yelbuz ve ark. 2002). E9.5'dan itibaren birkaç segment kalpte ayırt edilmektedir. Sağ ve sol sinüs boynuzları tüm sistemik kanı ortak atriyal bölmeye boşaltırken, bu ortak atriyal bölme ilkel sol ventriküle bir atrioventriküler kanal ile bağlanmaktadır. Primitif sol ventrikül gelecekteki sağ ventriküle bulboventriküler kanal ile bağlanırken, OFT, konus ve trunkus gelecekteki sağ ventrikülü aortik keseye bağlamaktadır. Atriyal ve ventriküler parçaların daha da gelişmesi bu odaların balonlaşmasına dayanmaktadır. Atriyal odalar her iki atriyal kutupların genişlemesi ile gelişirken ventriküler odalarda balonlaşma arada bir interventriküler septum oluşturacak şekilde dış kavise doğru olmaktadır. E9.5 günlüğe ulaştığında atrioventriküler kanal ve ortak OFT iç hücre duvarının şişmesiyle ortaya çıkar. Bu şişkinlikler atrioventriküler ve OFT yastıkları olarak adlandırılmaktadırlar. Kalbe ait dört odacağı oluşturmak için gerekli septal ve valf yapılarının yanı sıra aorta ve pulmoner trunk'ın ayrılmasına da bu yastıklar katkıda bulunurlar (Fanapanazir ve Kaufman, 1988). Ekstrakardiyal hücrelerin üç popülasyonu ise göç yoluyla kalp yapısına dâhil edilmektedir. Bu hücreler, septum transversumun mezenkiminden pro-epikardiyum, vücut duvarından atriyuma dahil edilen mezokard ve faringeal arkuslardan OFT'nin dorsaline gelen kardiyak nöral krest hücreleridir. E9 ve E11 günleri arasında pro-epikardiyum OFT de dahil olmak üzere tüm kalbin dış yüzeyini sarar. Buna ek olarak da koroner damar sisteminin endotel ve düz kas hücreleri ile bağ dokusu epitelyal mezenşimal transformasyon ile epikardiyumdan oluşur (Perez-Pomares ve ark. 1997).

Embriyo 11.5 günlüğe ulaştığında ortak çıkış yolları henüz bölümlenmemiş 3 parçadan oluşmaktadır. Bunlar; aortik kese, trunkus (arteriosus) ve konustur. Embriyonik gelişimin 13.5 gününde Ortak çıkış yollarının septasyonu boyunca bu parçalar çıkışlara, kapakçıklara, aortik ve pulmoner trunkusların bazaline katkıda bulunurlar (Kirby, 2007).

Atrioventriküler kanalda ise atrioventriküler endokardiyal yastıklar görünür hale gelmeye başlar. İnferiyor atrioventriküler kanal dış bükey ile ilişkili iken, süperiyor atrioventriküler kanal iç bükey ile ilişkilidir. Kalbin iç bükeyi boyunca çıkış yolları ve atrioventriküler yastıklar birbirleri ile ilişki kurarlar ve bu aşamada bulbus kordisden çıkış yolları ortaya çıkarken atrioventriküler kanal bulboventriküler kanaldan köken alır. Çıkış yolları ve atrioventriküler yastıkların gelişmesi ve olgunlaşması epitelyal-mezenşimal

transformasyon ile gerçekleşmektedir. Transformasyon boyunca luminal epitel tabakalarındaki mezenşim fenotipindeki endokardiyal hücreler yastıkların ekstraselüler matriksine göç etmektedir (Savolainen ve ark, 2009). Yine 11. günde sistemik venlere baktığımızda venöz drenajda yeni düzenlemeler meydana gelmektedir. Sağ vitellin veni vena kavayla ilişkide bulunarak oksijenden fakir kanı alt gövdeden kalbe getirmektedir. Duktus venozus adı verilen damar ise plasental oksijenlenmiş kanı sol umbilikal venden doğrudan inferior vena kava içine getirmektedir. Sol sinüs boynuzunun çapı ise önemli ölçüde azalır ve sol koroner sinüs halini alarak gelişmekte olan sol üst vena kava ile inferior vena kava'nın post-hepatik kısmı arasında bağlantı yapar. Bu aşamada sağ sinüs boynuzu ve ortak kardinal venler sağ atriya dahil edilir ve süperiyor vena kavaya katkıda bulunur. Sonuçta tüm venöz kollar inferior vena kava ile ilişkili olarak sinüs venosus adı verilen tek bir açıklıktan varsayımsal olarak sağ atriya gelmiş olur. İntra-atriyal septasyonun ilk belirtisi ise septum primum oluşumudur. Septum primum E10.0 atriyoventriküler endokardiyal yastık dokusuna doğru büyümeye başlar ve atriyoventriküler yastıklar yaklaşık olarak E12.0'de kaynaşır. Diğer inter-atriyal septum, septum sekundum ise E12.5'te gelişmeye başlar (Ho ve Handerson, 2010). E12.5 da semilunar çıkış yolu kapaklarını da içeren çıkış yolunun distal bölümünün septasyonu tamamlanmış ve konusdaki çıkış yolu septumunun proksimal kısmı distalden kapatılmaya başlamıştır. Üst ve alt atriyoventriküler yastıklar, atriyoventriküler kanalın ayrı sağ kanallara ve sol kanallara bölünen bir atriyoventriküler septum veya septum intermedium oluşturması için kaynaşırlar. Diğer tüm kalp septaları (çıkış yolunun konik yönü septum, interventriküler septum ve septum primum) atriyoventriküler yastıklarla kaynaşır ve atriyoventriküler septasyona katkıda bulunurlar. E12.5'te hala iki ventrikül arasında iletişim vardır ve ventriküller arasındaki bağlantı E13.5-14.0'a kadar kapatılır (Kaufmann ve Bard, 1999). E13.5 çıkış yollarının septasyonu tamamlanmıştır. Kalbi kapsayan kesenin dış kısmı olan perikardiyum-(parietal) perikard esas olarak bağ dokusundan oluşur. Perikard, posterior olarak diyafragma, lateral olarak mediastinal plevraya, ventrik olarak göğüs kafesine bağlanır. Epikard (visseral perikard) kalpteki en dış hücre tabakasıdır ve kalbi E11.0 de kuşatır (Kirby, 2007). E14.5 da inferior ve superior endokardiyal atriyoventriküler yastıklar sırasıyla sağ triküspid ve sol mitral septal valf broşürlerine modifiye edilmiştir. Atriyum odaları E14.0 de ikiye bölünmüş olmasına rağmen burada bulunan açıklığa foramen ovale adı verilir ve inferior vena kava yoluyla sağ atriya giren büyük oranda oksijenlenmiş kanı orta hat boyunca sol atriya boşluğuna yöneltir. Sağ atriyaun rostral kısmına giren deoksijene kan ise sağ üst vena kava yoluyla sağ ventriküle yönlendirilir (Kaufman ve Bard 1999). Foramen ovale doğumla

birlikte iki atriyal septanın kaynaşmasıyla kapanır. Önceki evrelerle karşılaştırıldığında, E15.5'te görülen önemli değişiklikler ise sağ atriyum hacminde, sol atriyumun hacminde artış ve kalp yönelimde değişikliğin olmasıdır. Kalp, atriyoventriküler kapak broşürleri ve koroner arter hariç E15.5 ile kesin prenatal konfigürasyonuna ulaşmış olmaktadır. Atriyoventriküler kapakların oluşturulmasında endokardiyal atriyoventriküler yastıklar önemlidir, ancak kapak yaprakçıklarının daha sonraki olgunlaşması için miyokardın yeniden şekillenmesi adımları gereklidir. E15.5 ve E18.5 arasında, miyokard geliştirmekte olan broşürlerden kademeli olarak kaybolur ve olgun valf yapılarına benzeyen ince, lifli yaprakçıklar elde edilir. Kalp kasına kan sağlayan koroner vasküler sistem ise epikardiyumdan türeyen endotelial pleksustan gelişir (Kaufmann ve Bard, 1999).

2.4. Kalp Gelişiminin Moleküler Düzenlenmesi

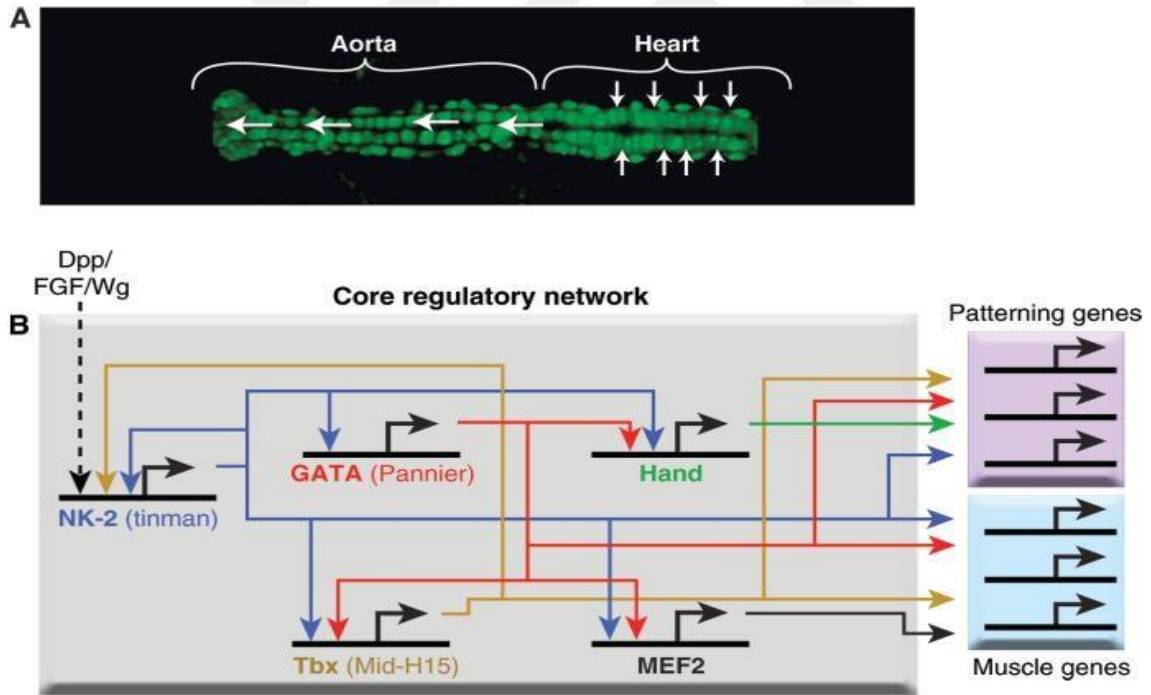
Organ ve dokuların oluşum süreçleri, hücrelerin kaderini belirleyen ardışık gen düzenleyici adımlarla ilerlemektedir ve özel hücre tipleri karmaşık üç boyutlu yapı ve işlev birimlerine organize olmaktadır. Basit model organizmalarda ve omurgalılarda kalp gelişiminin ve genetik temellerinin araştırılması, miyojenik transkripsiyon faktörleri, onların aşağı doğru hedef genleri, kardiyak hücre akıbeti, miyosit farklılaşmasını ve kardiyak morfogenezi yönlendiren yukarı akış sinyalleme yolları arasındaki fonksiyonel bağlantılardan oluşan evrimsel olarak korunmuş bir gen düzenleyici ağı ortaya koymuştur (Cripps ve Olson, 1998). Geniş çapta yapılan filogenetik çalışmalarda kalp gelişimi ile ilgili transkripsiyonel ağlar arasındaki çarpıcı paralellikler, giderek artan karmaşıklıkla evrimsel olarak ortaya çıkan kalplerin, kalp transkripsiyon faktörlerini kodlayan bir atasal ağın modifikasyonu ve genişlemesi yoluyla oluştuğu fikrini desteklemektedir. Kalp düzenleyici genlerin çoğalmasıyla birlikte kardiyak genetik ağların genişlemesi ve ilave gen hatlarının birleşmesi, muhtemelen, ilkel bir damar benzeri kalbe, odalar, valfler ve iletim sistemi gibi yeni yapıların eklenmesine izin vermiştir (Fishman ve Olson, 1997).

Kalp gelişimi, kalp hücresi kaderini, kontraktıl proteinleri kodlayan genlerin ekspresyonunu ve kardiyak yapıların morfogenezi kontrol eden, evrimsel olarak korunan transkripsiyon faktörlerinin (NK2, MEF2, GATA, Tbx ve HAND) çekirdek seti tarafından yönetilir. Bu transkripsiyon faktörleri aynı zamanda birbirlerinin ifadelerini düzenleyerek, kalp gen programını stabilize eder ve güçlendirir. Birçok durumda yine onlarca başka

transkripsiyon faktörü bu çekirdek düzenleyiciler için yardımcı faktörler olarak görev yaparak kardiyogeneze katkıda bulunur (Cripps ve Olson, 1998; Buckingham ve ark, 2005).

Metazonlar boyunca korunan ve mayada bile bulunan MADS-box protein MEF2, en eski miyojenik transkripsiyon faktörüdür. Atasal organizmada kas hücreleri çeşitlendiğinde, MEF2 kas gen düzenleyici ağların merkezi bir bileşeni haline gelerek tüm kas hücresi türlerinin farklılaşması ile ilişkili olarak bilinen tek miyojenik transkripsiyon faktör halini almıştır. Kalp kası hücrelerinde, MEF2 çekirdek kardiyak transkripsiyon faktörleri ile kontraktıl protein gen ekspresyonunu düzenlerken, iskelet kasında MEF2, bHLH transkripsiyon faktörlerinin MyoD ailesiyle birlikte çalışmaktadır. Bu nedenle MEF2, cis düzenleyici sekansların spesifik kombinasyonları yoluyla farklı kas gen programlarını düzenlemek için farklı transkripsiyonel ilişkiler kurmaktadır (Black ve Olson, 1998). Kalp kası hatları içinde Mef2, kalp kası ve ilişkili endodermal yapılara katılan NK2 homeodomain proteinlerinin kontrolü altına girmiştir (Buckingham ve ark, 2005). Bilateral canlıların kardiyak gelişiminde ilişkili olan Mef2 ve NK2 homeobox geni, kalp içermeyen sölenterlerin gastrodermisindeki miyoepitelyal hücrelerde de eksprese edilir, bu ekspresyon bu genlerin ortak atada kas geni programı ile ilişkili olduğunu düşündürmektedir. Sölenter benzeri ataya ait organizmanın endodermine NK2 sınıfı bir genin yönlendirmesi altında gelişen bir kas hücresi tabakasının, erken bilateral canlı döneminde bir pulsatör kas damarına dönüştüğü kabul edilmektedir. Evrimsel süreçte yaşanan gen duplikasyonları, bu çekirdek kardiyak transkripsiyon faktörlerini kodlayan genlerin sayısını arttırmıştır (Olson, 2006). Bu gibi duplikasyonlar, cis-regülatör elementlerin modifikasyonu ile birleşince, yeni gen ifade kalıpları ortaya çıkmış ve protein kodlayıcı bölgedeki değişiklikler de kalp yapılarının ve fonksiyonlarının edinilmesine veya değiştirilmesine izin veren yollar oluşturmuştur. Yeni gen ailesi üyelerinin işlev kazandığı veya ince işlevleri maskeleydiği fikrine uygun olarak, kardiyak düzenleyici ağın nispeten daha basit olduğu *Drosophila*'daki kardiyak düzenleyici genlerdeki mutasyonlar sıklıkla kardiyakta anomalilerle sonuçlanmaktadır. Omurgalı canlılarda da bu genlerin bireysel paraloglarının mutasyonları, kalpteki belirli yapıları sıkça etkilemektedir (Cripps ve Olson, 1998). *Drosophila*, bu kardiyak düzenleyici ağın mimarisini tanımlamak için güçlü bir model sağlamaktadır. Dorsal damarın oluşumunda transforming growth faktör- β süper aile üyesi olan Decapentaplegic (Dpp), Fibroblast growth faktör (FGF) ve Wnt Süper ailesine üye olan wingless (Wg) yer alırken, *Drosophila* NK2 homeobox geni olan tinman, kardiyak hücre kaderini belirlemek ve kardiyogenez için indükleyici sinyalleri hedef almak için gereklidir

(Cripps ve Olson, 1998). Tinman'ın hedef genleri arasında, her kas tipinin farklılaşması için gerekli olan Mef2 geni de bulunur. Drosophila'daki tek Mef2 geninin fonksiyon kaybı, kalp, iskelet ve visseral kas hücrelerinde kontraktıl protein genlerinin ekspresyonunu ortadan kaldırırken kas hücre kimliğini etkilememektedir, bu Mef2 faktörün kas farklılaşmasında görev aldığını göstermektedir. Drosophila'daki GATA geninin (pannier) mutasyonu, kardiyoblastların yokluğuna ve perikardiyal hücrelerin sayısının azalmasına neden olmaktadır (Sorrentino ve ark, 2005). Çoklu T-box genleri, dorsal damarın kardiyak akıbetini, farklılaşmasını ve patternini kontrol etmek için tinman ve pannier ile birlikte işlev görmektedir. Drosophila genomu doğrudan Tinman ve Pannier tarafından düzenlenen ve dorsal damarın normal gelişimi için gerekli olan HAND ailesinin tek bir üyesi olan bHLH transkripsiyon faktörünü kodlar. Tinman, Mef2, pannier, T-box ve Hand genlerinin otoregülasyonu ve çapraz-düzenleyici etkileşimleri upstream indükleyici sinyaller tarafından aktive edildiğinde kardiyak fenotip korunmaktadır (Olson, 2006).



Şekil 16: Drosophila kalbi. A) Drosophila embriyosunun kalbi, B) Drosophila da kalp gelişiminin çekirdek transkripsiyonel ağının basitleştirilmiş diyagramı (Olson, 2006)

Omurgalı embriyolarında komşu dokulardan gelen sinyaller vasıtasıyla lateral mezoderimde kardiyak prekürsör hücreler belirlenmektedir. (Cripps ve Olson, 1998;

Bodmer, 1995). Birincil kalp alanındaki kardiyak progenitörler ventral orta hatta birleşirler ve hem yapısal hem de işlevsel olarak atasal kordalılarda varolduğu düşünülen ilkel kalbe benzeyen doğrusal bir kalp tüpü oluştururlar. Kalp tüpünün olgun çok odacıklı kalbe geliştirilmesi, omurgalılara özgü genetik programlara bağlı birden fazla adım gerektirmektedir. Kalp tüpü, dört bölmeli kalpteki sol ventrikülün ortaya çıkmasına neden olur; bunun, atasal kordalarda kalp bölmelenmesini temsil ettiğine inanılmaktadır (Buckingham ve ark, 2005). Sağ ventrikül ve çıkış yolu ile daha sonra ki evrimsel ilerlemeler, öncelikli olarak, ikincil veya anterior kalp alanı olarak adlandırılan bitişik bir prekürsör popülasyonundan oluşmaktadır (Kelly ve ark, 2001). Bu ek hücre popülasyonunun, birincil kalp alanının genişletilmiş bir bölgesi karşısında ayrı bir kalp alanını temsil edip etmediği konusunda tartışmalar olmasına rağmen, kardiyak yapı ve fonksiyonun yeni bir birimi olan sağ ventrikülün evrimsel olarak eklenmesinin, önceden haberci hücrelerin ortak bir alanını basitçe genişletmek yerine yeni bir prekürsör hücre popülasyonunun önceden var olan bir organa dahil edilmesiyle oluştuğu düşünülmektedir. İkincil kalp alanının yeni bir ventrikül sağlamak için değil de orijinal tek ventrikül kütlelerini arttırmak için ortaya çıktığı ve bu durumun evrimsel süreçte ikinci ventrikül meydana gelmeden ortaya çıktığı düşünülmektedir (Simoes- Costa ve ark, 2005).

Kalp tüpünün arka ucunda, omurgalılarda olan retinoik asit ile sinyal gönderilmesi, ventriküler kaderi benimseyen hücrelerde atriyal kimlik oluşturur, böylece oda-spesifik genlere anterior-posterior eksen boyunca konumsal bilgi aktarılmaktadır. Bu durumda, yeni bir yapı oluşturmak için atasal kalp düzenleyici ağa yeni bir sinyal yolağı bağlanmış olmaktadır. Kalp tüpünün parçaları, omurgalılara özgü genetik yollar yoluyla kardiyak iletim sistemini oluştururlar (Olson, 2006).

Drosophila tinman'ın bir homoloğu olan homeobox geni *Nkx2-5*, kardiyak progenitör hücreler ile endoderm ilişkili kordalılarda eksprese edilir ve kardiyogenezi başlatan indükleyici sinyaller için bir hedefdir (Holland ve ark, 2003). Zebra balığı veya kurbağa embriyolarında *Nkx2-5*'in zorunlu ekspresyonu, kalp alanını genişletir ve kardiyak gen ekspresyonunu teşvik ederken dominant negatif bir *Nkx2-5* mutant proteini, kurbağa embriyolarında kardiyogenezi bloke eder. *Nkx2-5* ve *Nkx2-3* dominant negatif mutantlarının kombine ekspresyonu ise tek başına olan protein mutantlarına göre daha ciddi bir fenotipe neden olmaktadır. Bununla birlikte, dominant-negatif mutant proteinlerin aşırı ekspresyonu, özellikle transkripsiyon faktörlerinin kombinasyon halinde etkileşime girdiği

kalp gelişimi ortamında birden çok transkripsiyon faktörünün faaliyetlerini de bozabilir ve bu nedenle, gen delesyonlarından daha ciddi fenotiplere neden olabilirler. Nkx2-5'den yoksun farelerde, kalp oluşumunun başlangıç olayları normal olarak gerçekleşir, ancak embriyolar kalp tüpünün anormal morfogenezisinden ve sol ventrikül gelişimindeki başarısızlıktan ölmektedir. Bu kusurlar birincil kalp alanının türevlerinin seçici bir kaybı olarak yorumlanabilmektedir. Drosophila'daki kardiyak soyun özelleşmesinde tinman'ın esaslı erken rolü ile Nkx2-5 mutant farelerindeki nispeten geç kalp defekti arasındaki fark, diğer NK2 homeodomain proteinleri veya Nkx2-5'den daha erken fonksiyon gösteren diğer kardiyak transkripsiyon faktörleri ile açıklanmaktadır (Lin ve ark, 1997).

Omurgalı dört adet Mef2 geninden, Mef2c, kardiyak kontraktıl protein genlerinin bir alt grubunun aktivasyonunun yanı sıra sekonder kalp alanında türetilen kalp yapılarının geliştirilmesi için gerekli bir genidir. Dolayısıyla, evrim süresince, bu eski miyojenik düzenleyicinin daha gelişmiş kalpte ortaya çıkan kalp yapılarının oluşumuna katkıda bulunan yeni fonksiyonlar kazandığını göstermektedir. Buna ek olarak omurgalı Mef2 genlerinin ek fonksiyonları muhtemelen maskelenmiş haldedir (Olson, 2006).

Çinko parmak transkripsiyon faktörlerinin üyelerinden olan GATA ailesi, sayısız kardiyak kontraktıl protein genlerinin yanı sıra, Nkx2-5, Mef2 ve HAND gibi yukarı akış düzenleyici genleride regüle etmektedir (Sorrentino, 2005). Omurgalılarda altı GATA geninden üçü (Gata4, -5 ve -6) kalpte ifade edilmektedir. Xenopus ve zebra balığı embriyolarında kardiyak GATA faktörlerinin zorla ekspresyonu kardiyak gen ekspresyonunun erken aktivasyonuna neden olmaktadır (Olson, 2006)

En az yedi Tbx geni birincil ve ikincil kardiyak hatlarda ve diğer kardiyak yapılarında çakışan bir ifade göstermektedir. Tbx5 içermeyen farelerde, atriumdan türeyen kalp tüpünün arka bölgesinde kusurlar meydana gelmektedir. Xenopus embriyolarında meydana gelen dominant negatif bir Tbx5 mutantın ekspresyonu, ilkel kalbin oluşumunu engellemektedir. Ayrıca Tbx5 ve Tbx20 sırasıyla kalp iletim sisteminin ve ventriküler odaların oluşumunda rol oynamaktadır. Tbx2 ve Tbx3, odacıklarda miyokardın baskılayıcıları olarak işlev görürken iletim sisteminin gelişimi ile de ilişkilidir (Buckingham ve ark, 2005).

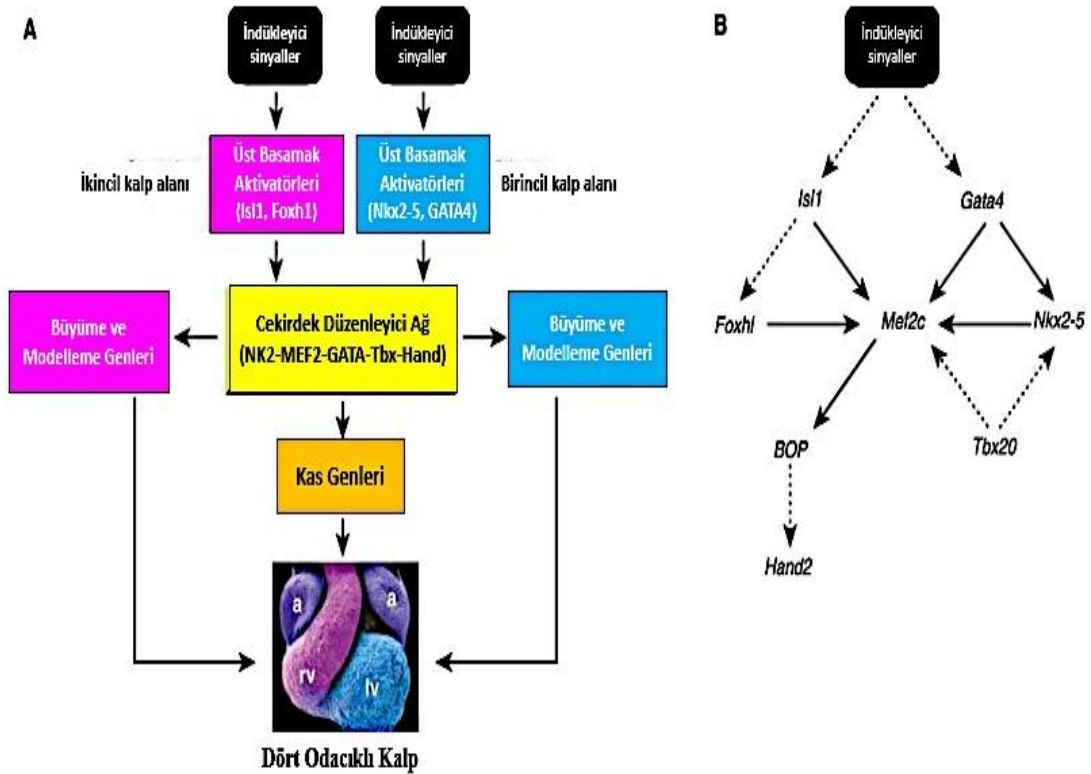
Gen duplikasyonu ve kardiyak karmaşıklık arasındaki korelasyon, ventriküler büyümeyi düzenleyen Hand genleri ile ilişkilidir (Buckingham ve ark, 2005; Srivastava ve

Olson, 2000). Tek bir ventrikül içeren amfibiler ve balıklar, yalnızca bir Hand genini ifade ederler ve Hand geni bulunmayan zebra balığı mutantları ventriküler bölmeyi oluşturamazlar. Farelerde, Hand1 ve Hand2 genleri sırasıyla primer ve sekonder kalp alanlarının türevleri ile ifade edilmektedir (Buckingham ve ark, 2005). Hand2'den yoksun olan fareler bir sağ ventrikül oluşturamazlar. Hand1 mutant olan embriyonik kök hücreler kalbin dış kavisine katkıda bulunamadığından sol ventrikülün oluşmasına neden olmaktadır. Primer kalp bölgesinde Hand1 ekspresyonunu düzenleyen Hand2 ve Nkx2-5 gen ifadelerinin silinmesi, her iki ventriküler odacığı da ortadan kaldırarak yalnızca bir atriyal kalıntı bırakır. Böylece, ventriküler odaların evrimsel duplikasyonu Hand genlerinin duplikasyonu ile korelasyon göstermektedir (Srivastava ve Olson, 2000).

Çekirdek kardiyak gen ağına farklı upstream yeni üyelerin de girmesi kalbin evrimsel süreci için önemli olmuştur. Tunicate Ciona'da, bHLH transkripsiyon faktörünü kodlayan tek Mesp geni, kardiyak progenitörlerden eksprese edilir ve NK2 ve Hand genlerinin ifadesi için gereklidir. Benzer şekilde, farede bulunan iki Mesp paraloğu (Mesp 1 ve -2), kardiyak mezoderm oluşumu için gereklidir. Kardiyak regülasyon ağına upstream girişlerin çeşitlenmesi sağ ventriküler odacığın sekonder kalp alanından gelişimine ilişkin bir açıklama da sağlamaktadır. Hem sağ hem de sol ventriküldeki kardiyak kas hücreleri, kardiyomiyosit farklılaşması ve kontraktıl protein genlerinin ekspresyonu için gerekli gen programının aktivasyonu için aynı transkripsiyon faktör setine ihtiyaç duyar fakat birincil ve ikincil kalp alanlarından türetilen hücrelerde bu düzenleyici ağa upstream girişler farklıdır. İkincil kalp alanının evrimsel ilavesi, çekirdek kardiyak transkripsiyonel ağını aktive etmek için bir sinyal mekanizması gerektirmiştir (Zhao ve ark, 2005). Özellikle sekonder kalp alanında ifade edilen Islet 1 (Isl1) transkripsiyon faktörü, kardiyak öncü hücre popülasyonunda Mef2c genini doğrudan aktive etmektedir. Böylece Isl1 muhtemelen Mef2c ve belki diğer çekirdek kardiyak düzenleyici genler tarafından Isl1'e bağlı modüllerin kazanılması yoluyla kardiyak düzenleyici ağa bağlanmıştır bunun sebebi Isl1 kardiyak spesifik olmaması ve başlangıçtaki aktivasyon ve downstream hedefler üzerindeki etkileridir. Her iki kalp alanında da ifade edilen ve sekonder kalp alanında Mef2c ekspresyonu için gerekli olan GATA faktörleri ve Nkx2-5, Isl1'nin bu rolüne hizmet ediyor olabilmektedir. Forkhead transkripsiyon faktörü Foxh1 ayrıca sekonder kalp alanında Mef2c transkripsiyonunu aktive eder ve Isl1'in downstream basamağında hareket eder (Von Both ve ark, 2004). Isl1, Mef2c veya Foxh1'deki mutasyonlar, bu kardiyojenik düzenleyicilerin birbirlerine olan bağımlılığını gösteren, ikincil kalp alanının ve alt yapılarındaki ciddi

kardiyak kusurlarla sonuçlanır. Bu bulgular, dört bölmeli kalbe olan evrimin, atalara ait kardiyak transkripsiyon faktörü genlerine yeni düzenleyici girdi kazanılmasını içerdiğini düşündürmektedir. Çekirdek kardiyak ağı içerisindeki genlerin çapraz regüle olmaları ve ekspresyonlarını otoregüle etmeleri, ağdaki bir veya birkaç genin aktivasyonuna ve genler ile ve aynı zamanda da downstream genlerini harekete geçirmektedir (Lin ve ark,1997).

Kardiyak büyüme ve morfogenezi yönlendiren çekirdek kardiyak transkripsiyon faktörlerinin downstream hedef genleri hakkında nispeten az bir bilgi vardır. Kardiyak kıvrılma ve ventriküler odaların spesifik şekil ve pozisyonlarını nasıl benimsedikleri, cevaplanmamış önemli sorulardır. Morfogenez ve kalp büyümesi kardiyak fonksiyonla yakından ilişkili olmasına rağmen bu bağın mekanik temeli belirsizdir, ayrıca kalp (veya diğer organların) vücudun boyutunu koordine eden mekanizmalar da belirsizliğini korumaktadır. Kardiyak odaların meydana gelmesi, miyosit farklılaşması ve kontraktıl aktivitenin yanı sıra kan akışı, sıvı dinamiği ve oksijenasyonuna da bağlıdır. Bu içsel ve dışsal etkilerin kalp büyümesi ve gelişimini nasıl düzenlediği hala tam olarak açık değildir (Olson, 2006).



Şekil 17: Memeli kalp gelişiminde sistematik transkripsiyonel ağ (Olson, 2006)

2.5. WNT Sinyalizasyonu ve Kalp Gelişimi

Embriyonik gelişim ve erişkin biyolojik süreçlerde rol oynayan birçok yolak gibi Wnt sinyal yolağında önem arz etmektedir. Hücre siklusunun regülasyonu, hücre adezyonu, hücre çoğalması ve farklılaşması gibi fonksiyonlarda rol oynadığı daha ilk tanımlandığı yıllarda ortaya çıkarılmış olup son yıllarda ise karsinogenesisiz, apoptoz, anjiyogenez gibi süreçlerde de rol aldığı gösterilmiştir. Fonksiyon gören tanımlanmış üç farklı wnt sinyalizasyonu bulunmaktadır. En sık ilgilenileni ise Wnt/ β -katenin sinyalizasyonu olmuştur (Logan ve Nusse, 2004).

Wnt/ β -katenin sinyalizasyonu bir protein olan Wnt'nin hücre zarındaki reseptörüne bağlanması ile başlamaktadır. Bu bağlanma sinyali hücre çeşitli fosforilasyon mekanizmalarına neden olarak sinyalin hücre zarından sitozole doğru aktarılmasını tetiklemektedir. Sitozole aktarılan sinyal yolakta görev alan birçok molekülde çeşitli değişiklikler meydana getirterek β -katenin proteininin sitozolde birikmesine neden olur. Sitozolda biriken β -katenin çekirdeğe taşınarak burada yer alan transkripsiyon faktörlerini aktifleştirerek sinyal yolağının hedef genlerinin ifadesinin aktivasyonuna neden olmaktadır (Kestler and Kühl, 2008).

Yine ekstraselüler matrikste bulunan bazı engelleyici biyomoleküller ise Wnt/ β -katenin sinyal yolağının inaktif durumda kalmasını sağlamaktadır. Wnt proteininin reseptörlere bağlanmasına engel olan bu biyomoleküller Wnt/ β -katenin sinyal yolu inaktif halde kalmasını sağlar. İnaktif halde bulunan sinyal yolağında fosforilasyonlar gerçekleşemez ve yolağın hedefinde yer alan β -katenin proteininin bir kısmı hücre zarında birikerek hücre bağlantılarında görev alır, diğer bir kısmı da proteozomlarda parçalanmaktadır. Bu durumda sitozolde yeteri kadar β -katenin bulunmadığından çekirdekte hedef genlerin transkripsiyonu engellenir (Kikuchi ve ark, 2006).

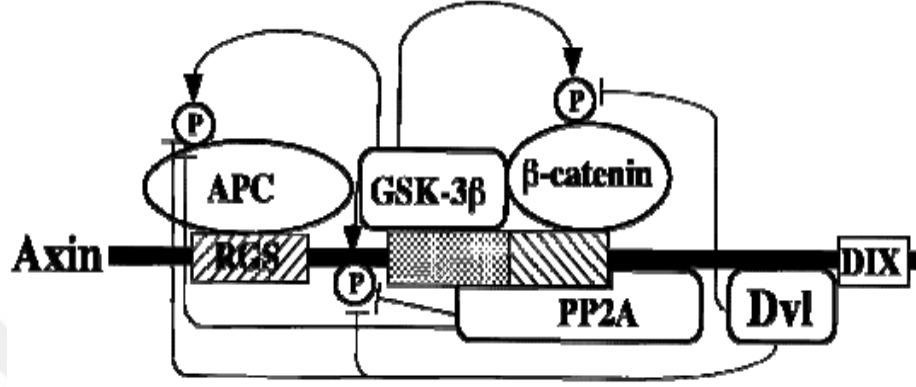
Omurgasızlardan omurgalılara kadar pek çok canlıda korunmuş Wnt geninin yaklaşık 19 tanesi insanda tanımlanmıştır. Yaklaşık 350-380 amino asitten oluşan Wnt proteinleri 36-40 kD molekül ağırlığındadır. Yapılarında 23-25 adet korunmuş sisteinden zengin bölge yer almaktadır. Bu bölge Wnt proteinlerinin sinyal mekanizmasını başlatmak üzere hedef hücre zarında bulunan reseptörlerine bağlanmasını sağlamanın yanı sıra sistein rezidüleri arasında oluşan molekül içi disülfid bağları da Wnt proteinlerinin üç boyutlu konformasyonlarının sağlanmasında ve fonksiyonel sinyal haline gelmelerinde önemli rol oynamaktadır (Kikuchi ve ark, 2006).

Wnt/ β -katenin sinyal yolu: Wnt/ β -katenin sinyal yolu “canonical”, “standart” veya “klasik” yol olarak da isimlendirilmektedir. Bu yolağın kontrolsüz aktivasyonu ise kanser başta olmak üzere çok sayıda hastalıkla da ilişkilidir. Wnt/ β -katenin sinyal yolu mekanizması hücre zarında başlamaktadır. Aktivasyon ile birlikte sinyal önce sitoplazmaya oradan da çekirdeğe yönelmektedir. (Coudreuse ve Korswagen 2007).

Wnt/ β -katenin sinyal yolağı aktivasyonu Wnt proteininin hedef hücre zarında yer alan reseptörlerine bağlanması ile başlamaktadır. Ekstraselüler halde olan sinyal bu bağlanma ile intraselüler hale gelmektedir. Wnt proteininin hücre zarında yer alan reseptörleri “Frizzled (Fz)” ve “Düşük yoğunluklu lipoprotein reseptör ilişkili protein 5/6 (LRP5/6)”dır. Wnt proteini bir ucuyla Fz reseptörüne, diğer ucuyla da LRP5/6 reseptörüne bağlanarak üçlü bir kompleks oluşturarak sinyalizasyonu başlatmaktadır. Ekstraselüler matrikste yer alan inhibitör proteinler olan “Dickkopf (Dkk)”, “sFRP (secreted frizzled-related proteins)”, “Wnt inhibitör protein (WIF)” gibi çeşitli moleküller ise, sinyalizasyonu kontrollü bir şekilde engellemektedir (Wawrzak ve ark, 2009). Reseptörlere bağlanan Wnt proteini ile zarda başlayan sinyal sitozole oradan da çekirdeğe kadar aktarılmalıdır. Sinyalizasyonda sitoplazmada görev alan çok sayıda biyomolekül yer almaktadır. En önemli temel moleküller ise Dishevelled (memelilerde Dvl şeklinde kısaltılır), Axin (Axis inhibition protein), Adenomatöz poliposis coli (APC), Glikojen sentaz kinaz 3 β (GSK3 β), Kazein kinazlar (CKI ϵ , CKI α , CKI γ) ve β -katenin’dir. Dvl, hücre içi ilk sinyal molekülüdür ve membrana bağlı reseptörler ile β -katenin kompleksi arasındaki ilişkiyi sağlamaktadır. Dvl, bir ucu ile zarda bulunan Fz’nin hücre içi kısmına bağlanırken, diğer ucu ile fosforillenmiş LRP5/6’ya bağlı halde bulunan Axin’e bağlanmaktadır. Bu bağlanma ile Axin proteininde konformasyonel bir değişim olur. Bu değişim, GSK-3 β ’nin Axin’den ayrılmasını sağlar. Axin’den ayrılan GSK-3 β hücredeki bir inhibitor protein (frequently rearranged in advanced T-cell lymphoma-1; Frat-1) tarafından inhibe edilir ve bu sayede GSK-3 β ’nin β -katenini fosforilleme etkisi ortadan kaldırılmış olur (Chen ve ark, 2008).

862 amino asit uzunluğunda olan Axin proteini 95,6 kd molekul ağırlığındadır. Wnt sinyal yolağında negatif düzenleyici görevinde bulunur ve yıkım kompleksinin merkez iskeletini meydana getirmektedir (Şekil 18). Amino terminalinde bulunan RGS (regulator of G protein signaling) domaini ile Adenomatous Polyposis Coli (APC)’ye, merkezi domaini ile β -katenin-Glikojen sentaz kinaz 3 β (GSK3 β)-protein fosfat 2A (PP2A)- Kazein kinaz I (CKI)’ya ve C-terminal (DIX) domaini ile de Dvl’ye bağlanan 3 adet domaine sahiptir.

Yıkım kompleksi Axin, GSK3- β -CKI-APC-PP2A- β -katenin multikompleksi ile meydana gelmektedir. Bu meydana gelen kompleks β -kateninin fosforilasyonunu sağlamaktadır (Wawrzak ve ark, 2009).

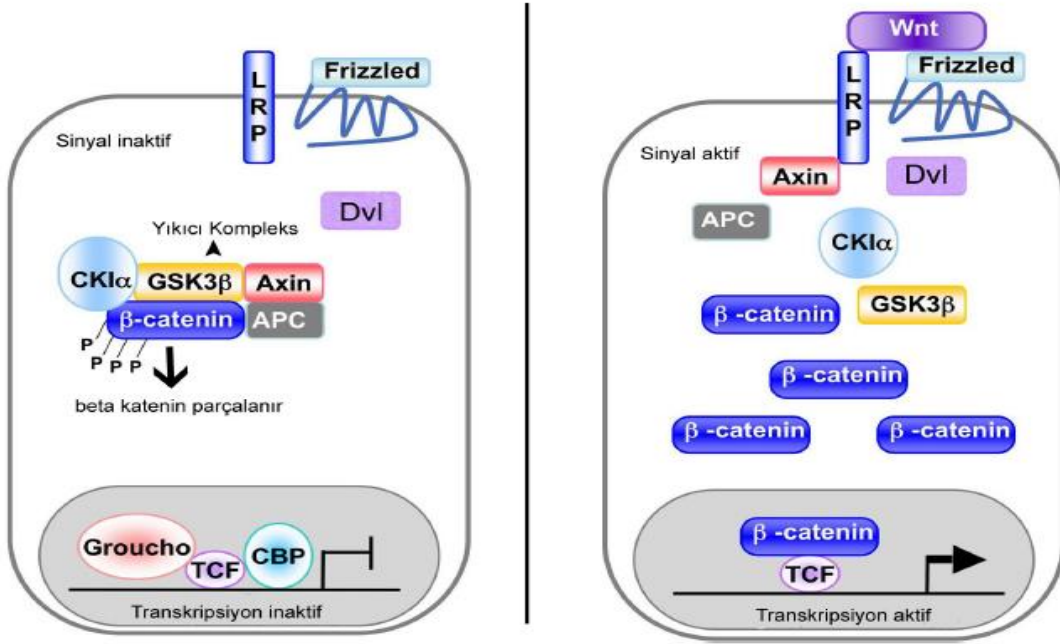


Şekil 18: Axin'in protein yapısı (Altınok, 2011)

2843 amino asitten meydana gelen APC proteini çok sayıda alt birimden oluşmuştur ve 312 kd molekül ağırlığına sahiptir. Hücrenin sitozolünde ve çekirdeğinde yer alan APC proteininin görevi β -katenin'in hücresel düzeylerini regüle etmektir. Negatif bir düzenleyici olarak Wnt sinyalizasyonunda görev yapmaktadır. β -katenin'in GSK3- β ile fosforilasyonunu hızlandırmasının yanı sıra bazı araştırmacılar APC proteininin sinyal yolağının aktivasyonu ile nükleusa ulaşan beta kateninin sitoplazmaya tekrar taşındığı ve bu şekilde hedef genlerin transkripsiyonunun önlediğide düşünmektedir (Brokardo ve Henderson 2008).

Yaklaşık 420 amino asit uzunluğunda ve 47 kd molekül ağırlığına sahip olan GSK-3 β wnt sinyalizasyonunda diğer bir negatif düzenleyicidir. β -katenin'in fosforilasyonundan sorumlu bir serin/treonin kinaz olup, β -katenini N terminal bölgesinden Serin (Ser) 33, Ser 37, Ser 45 ve Treonin (Thr) 41. pozisyonlardan fosforilasyona uğratmaktadır. Fosforile β -katenin ubiquitin proteozom bozunması için hedef hale gelmektedir. (Kikuchi, 2006). Ubikutin ligazın bir bileşeni olan β -TRCP, (β -transducin tekrarları içeren protein) fosforile β -katenin ile ilişki kurarak proteinin ubiquitinasyonla yıkımını uyarır. Wnt sinyali olmadığında, β -kateninin ubiquitin bozunumu Ser 45 rezidusunun Kazein kinaz α (CK1 α) tarafından fosforilasyonu ile başlamaktadır. Ser 45'in fosforile edilmesi CK1 α 'nın Axin'e bağlanmasına bağlıdır. Sonrasında β -katenin-APC-Axin-GSK3- β kompleksi meydana gelir.

GSK3- β , β -kateninin amino ucundaki diğer fosforilasyonları kolaylaştırarak fosforilasyon Thr 41, Ser 33 ve Ser 37 ile devam etmektedir. GSK3- β tarafından fosforilasyona uğrayan β -katenin, E3 ubikutin ligaz, β -TRCP tarafından komplekse bağlanır. Bu kompleks ubikütinasyon ve fosforile β -kateninin proteozomal yıkımına neden olur (Brokardo ve Henderson 2008).



Şekil 19: Wnt/ β katenin sinyal yolağı (Tanır, 2010)

CKI enzimi ise Serin ve treonin amino asitlerinin fosforilasyonunda görev alan tek bir polipeptitten oluşan yaklaşık 30-60 kd molekül ağırlığında olan bir protein kinazdır. CKI enzimleri hücre zarı, sitozol ve çekirdekte bulunmaktadır ve birçok proteinin fosforilasyonu ile biyolojik süreçlerde görev almaktadırlar. Fosforilasyon reaksiyonları proteinlerin aktif hale geçerek sinyal iletimini sağlamaktadır. CKI enzimlerinin Wnt/ β -katenin sinyal yolağında fosforilasyona uğrattığı ilk LRP5/6'dır (Coudreuse ve Korswagen 2007). Sinyalizasyonla birlikte konformasyonel değişime uğrayan LRP5/6, CKI γ tarafından fosforilasyona uğramaktadır. Diğer bir hedef molekül ise Dvl proteindir. Yine bu proteinde CKI ϵ tarafından fosforilasyona uğratılmaktadır. Wnt/ β -katenin sinyal yolağında CKI enzimlerinin en önemli fonksiyonu, yıkım kompleksinin yapısına katılarak komplekste bulunan Axin ve APC'yi ve de β -katenini fosforilasyona uğratmasıdır (Lustig ve Behrens 2003). Bu fosforilasyonlar, GSK3 β 'ın yapacağı fosforilasyon aksiyonları için bir hazırlık

sayılmaktadır. β -katenin düzeylerinin regülasyonunda bu iki kinaz birlikte büyük öneme sahiptir. Yıkım kompleksine bağlanan β - kateninin 45. Ser rezidusu CKI α tarafından fosforillenir. Bu fosforillenme GSK3 β enziminin β - kateninini Thr 41, Ser 37 ve Ser 33 amino asit rezidulerinden fosforilasyona uğratılmasını sağlar (Lustig ve Behrens 2003).

β -katenin, hücre-hücre bağlantılarıyla- Wnt sinyalizasyonunda yer alan birden fazla fonksiyonu olan 90kD'luk bir proteindir GSK-3 β için fosforilasyon bölgeleri Amino ucunda yer alırken, karboksil ucunda hedef genlerin aktivasyonu için gerekli transaktivasyon bölgesi yer almaktadır. β - katenin Proteinin orta bölgesinde yer alan "Armadillo repeat" Armadillo (Arm) ise adezyon reseptörü kaderin, degradasyon kompleksi Axin/APC/GSK-3 β ve transkripsiyon faktörleri TCF/LEF (T Cell Factor/Lenfosit enhancer binding factor) gibi çoğu negatif yüklü ligandlarla etkileşim için bu bağlanma bölgesi oluşturmaktadır. Adezyonla ilişkili β -katenin fosforilasyonu 142. ve 654. rezidulerdeki tirozin (Tyr) aminoasitlerinde oluşmaktadır. β -kateninin 654. Tyr'nin c-src tarafından fosforilasyonu E-kaderine bağlanmasında azalmaya sebep olurken, Tyr 142'nin Fer, Fyn veya Met tirozin kinazlar ile fosforilasyona uğratılması ise α -katenine bağlanmasında azalmaya neden olmaktadır. Tyr 142'den fosforilasyona uğradığında ise β -katenin BCL9-2 ile ilişki kurar, β -katenin-BCL9-2 kompleksinin çekirdeğe girerek TCF/LEF gibi DNA'ya bağlanan proteinler ile birlikte hedef genlerin transkripsiyonuna izin vermektedir (Lustig ve Behrens, 2003).

Sinyalizasyon tüm bunların ışığında kısaca şöyle özetlenmektedir. Hücreye bir Wnt sinyali gelirse Wnt proteini hedef hücre membranında bulunan Fz reseptörü ve LRP5/6 koreseptörü ile bağlanmaktadır. Bu ilişki sonucu Wnt bir takım fosforilasyon mekanizmalarını başlatmaktadır. Öncelikle LRP5/6'nın sitoplazmanın iç kısmında kalan bölgesi GSK3 β ve CKI ϵ enzimleri tarafından fosforilasyona uğratılmaktadır. Bu bölgenin fosforillenmesi, sitoplazma içinde yer alan Axin-APC-GSK3 β 'dan oluşan yıkım kompleksini uyarmaktadır. Fosforilasyon mekanizması yıkım kompleksini bir arada tutan Axin ile ona bağlı bulunan GSK3 β 'nın bu kompleksten ayrılarak LRP5/6'nın sitoplazma içindeki fosforillenmiş bölgesine bağlanmasına neden olmaktadır. Bu sırada başka bir fosforilasyon mekanizmasında sitoplazmada yer alan CKI, CKII ve Par-1 enzimleri ile Dvl proteininin fosforilasyona uğratılmasıdır. Dvl, Axin'e tutunarak, Axin 'de konformasyonel bir değişiklik oluşturmaktadır. Böylece GSK3 β 'nin, Axin'den ayrılması tetiklenmektedir. Axin'den kopan GSK3 β , Frat-1 tarafından inhibisyona uğramaktadır.. Bu sayede

GSK3 β 'nın β -katenini fosforilleme etkisinde yok olmaktadır. Böylece ' β -katenin'in sitozol içinde konsantrasyon düzeyleri artmaya başlamaktadır. Artan konsantrasyon ilk olarak " β -katenin" hücre zarındaki N-kaderin'in hücre içi bölgesine tutunarak hücreler arası bağlantıyı güçlendirici etkisi olmaktadır. İkinci olarakta çekirdeğe geçerek 'Tcf/Lef' transkripsiyon faktörlerine bağlanır Wnt sinyalizasyonunun hedef genlerinin transkripsiyonuna izin vermektedir (Ilyas 2005, Tanır ve Demirezen). Wnt sinyali olmadığı zaman Wnt proteini hücre membranında bulunan Fz ve LRP5/6 reseptörlerine tutunamaz. Buna bağlı olarak fosforilasyon mekanizması devreye giremediğinden yıkım kompleksi aktif halde kalır. Kompleks bileşenleri olan GSK-3 β -Axin- APC, " β -katenin" in amino ucunda yer alan serin ve treonin amino asitlerinden (kodon 33, 37, 41) fosforilasyonunu gerçekleştirirken, kazein kinaz-1 (CKI) ise Ser 45'den fosforilasyonunu gerçekleştirmektedir. Bu fosforilasyonlar β -katenine başka bir protein kompleksi (ubikutin ligaz kompleksi) için bağlanma bölgesi meydana getirir ve ubikütinasyon başlatılarak β -kateninin degradasyonu sağlanır (Şekil 19) (Lustig ve Behrens, 2003).

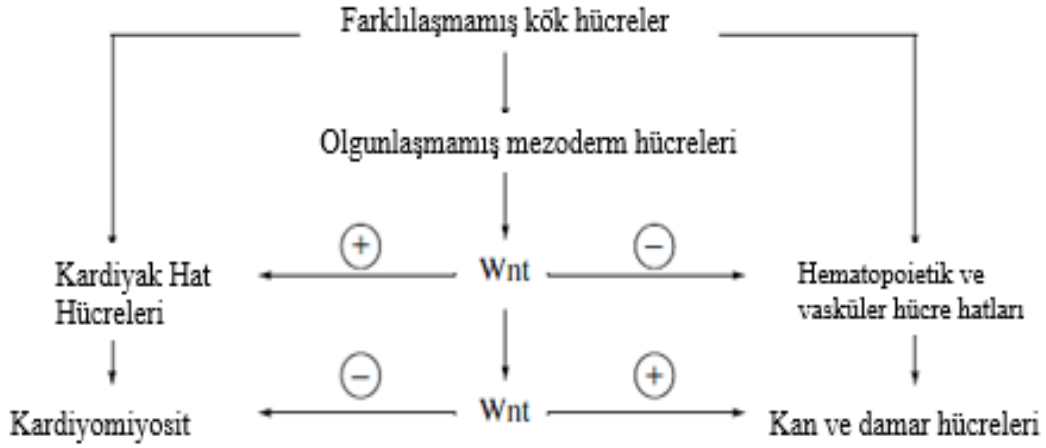
β -kateninin embriyonik gelişimdeki yapısal ve sinyalizasyon özellikleri knock-out ve transgenik fare modelleri kullanılarak çalışılmıştır. Sonuç olarak, zigot safhasında β -katenin delesyonu gastrulasyon aşamasında ciddi defektlere, embriyoda baş ve kalp gelişiminde gelişimsel bozukluklara ve hatta ölüme yol açmaktadır. Fare embriyo endoderminde β -katenin geninin uzaklaştırılması durumunda, kardiyak mezoderm hücrelerinde endoderm hücrelerinin yeniden yapılanması olayı gerçekleşir. Sonuçta birkaç kalpli embriyolar meydana gelir. Araştırmacılar, embriyogenez döneminde meydana gelen defektlerin interselüler adezyon sorunlarından kaynaklanabileceği gibi, β -katenin yokluğunun yol açtığı bağlantı sorunlarından da oluşabileceğini düşünmektedirler. Araştırmacılara göre, bu bozukluklara erken endodermdeki hücre proliferasyonu ve sinyal düzenlenme hataları neden olmaktadır. Bu şekildeki çalışmalar ve sonuçları, Wnt sinyalizasyonunun, özellikle de β -kateninin yalnızca embriyogenezde değil, memeli kardiyogenezinde de rolü olduğu noktasında varsayımda bulunmaktadır (Chen ve ark, 2006).

B-katenin geninin baskılandığı veya aşırı aktiflendiği mutant hayvan modelleri, Wnt/B katenin sinyalizasyonunun kalp gelişimindeki rolünü tanımlamaya öncülük etmektedir. Kardiyogenez üzerine yapılan çalışmalar Wnt/ β -kateninin sinyalizasyon düzenlenmesi hakkındaki rolünü desteklemekte ve gen ekspresyonu ile kalp gelişimi arasındaki ilişkiyi göstermektedir (Klaus ve ark, 2009).

Klaus ve arkadaşları β -katenin geninin birinci ve ikinci kardiyak alanlardaki mezoderm prekürsör hücrelerinde baskılanmasını sağladıkları çalışmada, birinci kardiyak bölgesinde formasyonun etkilendiğini fakat ikinci kardiyak bölgesinin gelişiminde akut defektlerin oluştuğunu ortaya koymuşlardır. Knock out modeller, β -kateninin yokluğunda kardiyak tüpün oluştuğunu fakat kardiyak loop, çıkış yolu ve sağ ventrikül gelişiminin gözlemlenmediğini ortaya koymuştur (Klaus ve ark, 2007). β -katenin sinyalizasyonunu test etmek için oluşturulmuş kardiyospesifik çalışmalarda, Wnt/ β -katenin sinyalizasyonu olmaksızın birinci kardiyak alanın geliştiği gösterilmiştir. Miyokardiyum gelişiminin ilerleyen aşamalarında ise Wnt sinyalizasyonundan kaynaklanan bozukluklar sonucu benzer fenotipler elde edilmiştir. Bu etkilerin tespit edilebilmesi için Nkx2.5 kontrolü altındaki Cre rekombinaz ile kardiyomiyositlerdeki prekürsör hücreleri silinmiştir ve araştırmacılar ikinci kardiyak alanlarda β -katenin genini Islet1 veya Mef2c-AHF promotörlerini kullanarak tespit etmeyi planlamışlardır. Bunun sonucunda uygun göstergeler ile ikinci kardiyak alanlarda fenotip tespit edilmiştir ve tersi şekilde uygun aktivite artırıcılar aracılığı ile aktif çoğalmaları da gözlenmiştir. Yapılan çalışmalarda 6.5 günlük embriyonik kalpte delesyona uğratılmış β -kateninin etkileri incelenmiş, 16.5 günlük embriyoda ve doğumdan hemen sonra bu defektlerin öldürücü etkisi olduğu saptanmıştır (Kwon ve ark, 2007). Bu durum embriyonik miyokardiyum gelişiminde Wnt/ β -katenin sinyalizasyonunun zamanlamasının önemini göstermektedir. β -kateninin kardiyojenezdeki sinyalizasyon üzerindeki önemi birinci ve ikinci kardiyak alanlarında, kardiyak tüpte, kardiyak loopte ve ventriküllerde gösterilmektedir. Yine β -kateninin endotelial hücrelerdeki doku spesifik kaybının endotelial hücrelerin migrasyonunu engellediğini ve endokard formasyonunu bozduğu saptanmıştır (Kiousi ve ark, 2002). Kurbağa embriyolarında, bu yolun aktivasyonu embriyonun bir tarafında β -kateninin nükleer birikimi ile sonuçlanmaktadır. β -katenin nükleer birikimi, embriyo içerisinde mezoderm ve endodermin oluşacağı bölgelerin oluşturulması için gerekli olan faktörlerin transkripsiyonel aktivasyonuna izin vermektedir. Kurbağa ya da zebra balığında maternal β -katenin tükenmiş olan embriyolar ya içlerinde aksis ya da mezoderm oluşturamazlar ve β -katenin aşırı ekspresyonu ise sekonder aksislerin oluşumu veya mesendoderm belirteçlerinin ektopik ekspresyonuyla sonuçlanmaktadır (Larabell ve ark, 1997). Homozigot β -katenin delesyonuna sahip olan farelerde ise ilkel çizgi yoktur ve hiçbir mezoderm de oluşmamaktadır. β -kateninin, embriyo içinde Nodal ekspresyonunun başlangıç pozisyonunu belirleyerek mezoderm oluşumu üzerine etkisini gösterdiği düşünülmektedir. Bu bulgular, kanonikal Wnt sinyalizasyonunun mezoderm oluşumu için ve bunun bir sonucu olarak kalp oluşumu için kritik olduğunu ortaya

koymaktadır (Hashimoto-Partyka ve ark, 2003). Mezoderm oluşumu başlayınca ise kanonikal Wnt/ β -katenin sinyalleme kardiyak mezoderm oluşumunu engellemektedir. Crescent, Dkk1 ve XDbf4 gibi Wnt sinyalini inhibe eden faktörler ise kalp oluşumunu aktive etmektedir. Dkk1 gibi Wnt önleyicileri doğrudan prekardiyak mezoderm üzerine etki etmez. Bundan ziyade, kardiyak mezoderm'e komşu endodermden kardiyak indükleyici faktörlerin ekspresyonunu aktive eder ve farelerin endoderminde β -katenin bağlı tükenme, orta çizgisi boyunca birden çok kalplerin oluşumuyla sonuçlanmaktadır. Bu β -Catenin etkinliğinin endodermden kardiyak katedeki önemi göstermektedir (Lickert ve ark, 2002). Wnt sinyal kaybıyla endodermden aktive olan faktörlerin doğası hala bilinmemektedir. Hem fare embriyonik kök (ES) hücrelerinden hem de embriyonal karsinom (EC) hücrelerinden (P19 hücreleri gibi) gelen kardiyomiyosit farklılaşması çalışmaları da bu fikri desteklemektedir. Hücre büyüme ortamına Wnt proteininin geçici eklenmesinin P19 hücrelerinde kardiyomiyosit farklılaşmasını arttırmaya yeteceğinden, kanonikal Wnt/ β -katenin sinyal yolağı yoluyla bifazik sinyalleme kalp oluşumu için gereklidir. Buna karşılık, Wnt3 ilavesi, bu hücrelerdeki kalp oluşumunu engellemektedir (Şekil 20) (Nainato ve ark, 2005). Benzer şekilde, ESC ve zebrafalığında Wnt sinyalizasyonunun zamansal olarak düzenlenmesi, kalp gelişiminde Wnt'ler için iki fazlı bir gerekliliği göstermektedir. Daha sonra kardiyak morfogenezinde kanonikal Wnt sinyal yolunun yeniden aktifleştirilmesi, sekonder kalp alanında kardiyak öncüllerin korunması ve çoğalması ile yastıkların ve valflerin oluşumu için gereklidir (Hurlstone ve ark, 2003).

Deneysel çalışmalar, kardiyogenezin farklı aşamalarında özelleşme, restorasyon ve farklılaşma aşamalarında Wnt/ β -katenin sinyalizasyonunun etkilerini göstermektedir. Bu çalışmalar, Wnt/ β -katenin sinyalizasyonunun kardiyomiyositlerde ve düz kas hücrelerinde hücreler farklılaşmaların gerçekleşmesi için zorunlu olduğunu göstermektedir. İlerleyen çalışmalar ve konuyla ilgili yeni yaklaşımlar, Wnt sinyalizasyon yollarının kompleks moleküler ve biyolojik bağlantılarını ortaya koymaya devam etmektedir (Piven ve ark, 2014).



Şekil 20: Wnt sinyalizasyonunun kardiyak hat kök hücre farklılaşmasındaki rolü (Naito ve ark, 2006).

2.6. Hippo Sinyal Yolağı

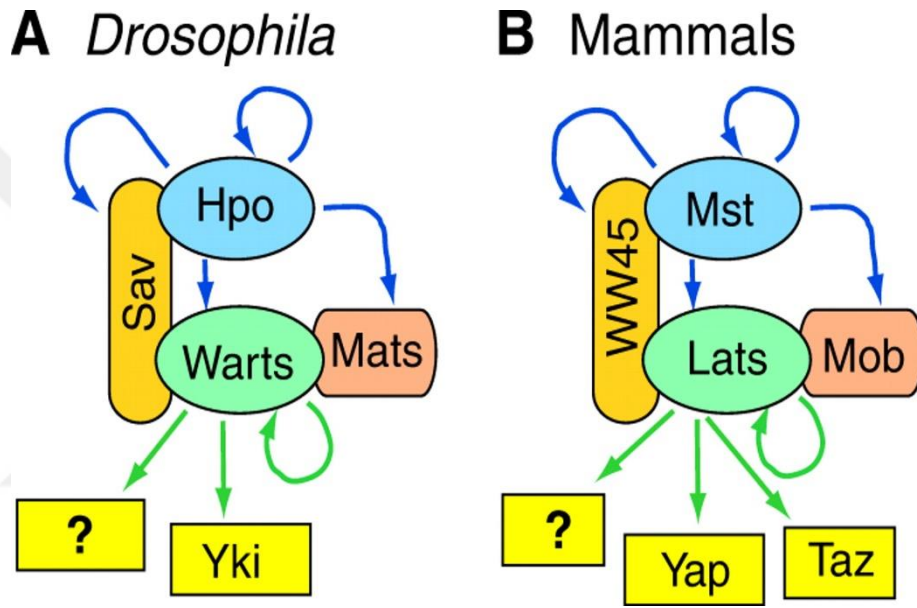
Hippo sinyal yolağı, yaklaşık 20 yıl önce ilk olarak doku büyümesi ile ilişkili olarak *Drosophila melanogaster*' da tanımlanmış ve son birkaç yılda hem *Drosophila* hem de memelilerde yoğun olarak çalışılmaya başlanmıştır. Hippo sinyal yolağının çekirdeğinde, bir kinaz kaskadı, transkripsiyon ko-aktivatörleri ve DNA bağlama üyeleri bulunmaktadır. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda Hippo yolağının en az 30'dan fazla bileşen bulundurmasıyla karmaşık bir sinyal ağı olduğu gösterilmiştir. Bu yolak hücre-hücre teması, hücre kutuplaşması ve aktin hücre iskeleti gibi intrinsik hücre mekanizmaları tarafından düzenlenmenin yanı sıra hücresel enerji durumu, mekanik stres ve G-protein bağlı reseptörler gibi sinyallerden de etkilenmektedir. Hippo sinyal yolağının başlıca işlevleri yetişkinlerde doku büyümesini sınırlamak ve geliştirmekte olan organlarda hücre çoğalmasını, farklılaşmasını ve göçünü modüle etmektir. Dahası, Hippo yolağının sinyalizasyonunda bozulma, anormal hücre büyümesi ve neoplaziye yol açmaktadır (Meng ve ark, 2016).

2.6.1. *Drosophila*da Hippo Sinyali

Hippo sinyal yolağının ismi, bir *Drosophila* kinaz geni olan *hpo*'dan gelmektedir. Bu gen, doku büyümesinin sınırlandırılmasında yaklaşık 10 yıl önce bağımsız olarak tanımlanmıştır. *Hpo* mutantları, aşırı hücre proliferasyonu ve apoptozun azalması nedeniyle birden fazla dokuda kontrolsüz büyümeye neden olmaktadır. Bu fenotipler, cyclin E (*cycE*)

ve Death associated inhibitor of apoptosis (diap1)'in artmış transkripsiyonuyla birlikte daha önce gösterilmiş olan salvador (sav) ve warts (wts) mutantları ile çok benzerdir (Tapon ve ark, 2002). Hpo, Sav ve Wts genetik etkileşimler gösterir ve Hpo doğrudan Wts'u fosforile ederek etkinleştirmektedir. Bu sebepten dolayı Hippo sinyal yolağı Salvador / Warts / Hippo (SWH) yolağı olarak da bilinir. Sav, Hpo'nun Wts'yi fosforile etmesinde bir adaptör proteini olarak görev yapar ve Hpo tarafından fosforile edilmektedir. Hpo ile olan etkileşim Sav'ın Hpo tarafından fosforilasyonuna neden olur bununla birlikte Wts'in fosforilasyonu ve cycE ve diap1'in transkripsiyonel baskılanması meydana gelmektedir (Meng ve ark, 2016). Buna ek olarak, Hpo'nun Sav'a bağlanması Sav ile HECT etki alanı proteini Herc4 (HECT ve RLD alanı içeren E3 ligaz) arasındaki etkileşimi önleyerek Sav'un protein stabilitesini artırır. HECT etki alanı proteini Herc4, Sav E3 ligazı olarak işlev görür ve Sav'ın ubiquitinilasyonuna ve bozunmasına neden olmaktadır. Diğer bir çekirdek bileşeni olan Mats (tümör baskılayıcı Mob) Wts kinaz aktivitesini güçlendiren bir Wts etkileşimli protein olarak tanımlanmaktadır. Mats kaybı, Drosophila'da hpo veya wts mutasyonuna benzer şekilde kontrolsüz doku büyümesine neden olmaktadır. Wts ile cycE ve diap1'in transkripsiyonel düzenlenmesi arasındaki en önemli bağlantıyı oluşturan Hippo yolağı efektörü Yorkie (Yki) ise 2005'te bir mayada keşfedilmiştir (Huang ve ark, 2005). Yki'nin aşım ifadesi, hücre proliferasyonu, apoptozis ve doku büyümesinde hpo, wts ve sav mutant fenotiplerini tekrar etmektedir. Buradaki biyokimyasal mekanizma, Wts'in Yki'yi fosforile ettiği ve Yki'nin 14-3-3 ile etkileşimine girerek sitoplazmik tutulmaya uğramasıdır. Yki, Scalloped (Sd) transkripsiyon faktörü ile etkileşerek gen transkripsiyonunu düzenlemektedir. Yki bağlanmasının yokluğunda, Sd, Tondu alanı içeren büyüme önleyicisine (Tgi) bağlanır ve gen ifadesi baskılanır. Yki ise Tgi'nin yerine geçerek Sd'yi bir transkripsiyonel aktivatör haline dönüştürmektedir (Zhang ve ark, 2008). Bu nedenle, Hippo yolağının düzenlenmesinin ortak moleküler mekanizması Drosophila ve memeliler arasında oldukça korunmuş durumdadır. Hippo sinyal yolağı çeşitli intrinsik ve ekstrinsik sinyallerle düzenlenir. Çoğu zaman Hippo yolağının merkezi olayı, fosforilasyona bağlı Wts aktivasyonu ve Yki inhibisyonu olarak görünür. Wts için ana kinaz, Tao kinazı tarafından fosforile edilebilen ve aktive olabilen Hpo'dur. Wts'in Hpo tarafından fosforilasyonu ayrıca, Mats ve Merlin (Mer) gibi bağdaştırıcı proteinlerin Wts'i plazma membranına almasını da gerektirir (Yin ve ark, 2013). Son çalışmalar, Misshapen (Msn) ve HappyHour (Hppy) olmak üzere iki başka kinazın, Wts'yi aktive edebileceğini ve Yki'yi Hpo'dan bağımsız olarak baskılayabildiğini göstermektedir. Hpo gibi, Hppy'nin de Wts'in hidrofobik motifini fosforile ettiğine dair kanıtlar vardır. Aynı zamanda Msn'nin doğrudan Wts'i fosforilasyona

uğratamayacağı da gösterilmiştir. Bununla birlikte, insan MAP4K4/6/7'nin (Msn homologları) LATS'i doğrudan fosforile edip aktive edebilmektedir. Bundan dolayı Msn'nin doğrudan Wts'yi fosforilasyona uğratıp aktive edip edemeyeceğini tam olarak açıklığa kavuşturulamamıştır. Msn, Hppy ve bunların memeli homologları MAP4K'lerin tanımlanması, Hippo yolağının kapsamını genişletmiştir ve çeşitli sinyallerin, MST1/2 nakavt hücrelerinde LATS'i nasıl aktifleştirebileceğinin moleküler temelini ortaya koymuştur (Şekil 22) (Zhao ve ark, 2012).



Şekil 21: Hippo yolağı çekirdek kinaz kaskadı (Reddy ve Irvine, 2008)

2.6.2 Drosophila Hippo Sinyalizasyon Ağı

Çekirdek kinaz kaskadını oluşturan dört tümör supresörünün keşfedilmesinin ardından genetik çalışmalar, faaliyetleri Hpo ve/veya Wts üzerinde etkili olan en az yedi ek tümör baskılayıcıyı daha ortaya çıkarmıştır. Bunlar, FERM domain içeren Merlin (Mer) ve Expanded (Ex), Protokadherinler Fat (Ft) ve Dachous (Ds), CK1 ailesi kinaz diski (Dco), WW ve C2 domain-içeren protein Kibra ile apikali transmembran protein olan Crumbs (Crb)dir. Bu üst düzey düzenleyicilerin Hippo kinaz kaskadında bir araya geldiği mekanizmalar karmaşıktır ve bazı durumlarda halen daha tam anlaşılammıştır (Şekil 23) (Pan, 2010).

Apikal protein kompleks içeren kibra, Ex ve Merlin; Band 4.1, Ezrin, Radixin, Moesin (FERM) domainini içeren aile üyesi proteinleri olan Merlin (Mer) ve Expanded (Ex)'in Hpo'nun potansiyel up-stream düzenleyicileridir. Mer ve Ex birbiri ile bağlanırlar ve epitel hücrelerinin apikal alanında lokalize olurlar (McCartney, 2010). Mer ve Ex'nin aşırı ekspresyonu, Wts fosforilasyonunu teşvik etmektedir. FERM proteinlerinin transmembran proteinlerini hücre iskeletine bağlayan adaptörler olan genel rolü göz önüne alındığında, Mer ve Ex, Hippo kinaz kaskadını, potansiyel transmembran reseptörlerine bağlamak için benzersiz şekilde konumlandırmaktadırlar (Pan, 2010). WW ve C2 domain içeren protein Kibra, Hippo sinyalini uyarmak için Mer ve Ex ile birlikte işlev gören apikal olarak lokalize bir tümör baskılayıcıdır. Kibra, Ex ve Mer birlikte Wts fosforilasyonunu teşvik etmektedir ve bu üç gen arasında meydana gelen ikili mutasyon kombinantları, herhangi tek bir mutasyona kıyasla daha güçlü Hippo sinyali defektlerine neden olmaktadır (Yu ve ark, 2010). Kibra-Ex-Mer kompleksi Hippo kinaz kaskadıyla çoklu protein-protein etkileşimleri yoluyla etkileşime girmektedir. Bu fiziksel etkileşimler Hippo kinaz kaskadını aktivasyon için plazma zarına getirmek için kritiktir. Nitekim çalışmalarda da tümör süpresör Mats'ın hücre zarında aktive olduğu gösterilmiştir (Ho ve ark, 2010). Her bileşenin Hippo yolunun düzenlenmesine ne ölçüde katkıda bulunduğu, doku türüne göre değişmektedir. Larval gözde Hippo sinyali için Ex tercihen gerekli iken pupal gözde tercih Mer'in kullanılmasıdır. Bu örnekler doğrultusunda Kibra-Ex-Mer kompleksi, zamansal ve mekansal olarak düzenlenmiş bir şekilde yukarı akış sinyallerinin dinamik bir bütünleştiricisi olarak işlev görmektedir (Pan, 2010).

Transmembran Protein FAT: Atipikal kaderin Fat (Ft), Hippo sinyalizasyonunu etkileyen ilk transmembran proteindir. Ft, N-terminal 450 kDa hücre dışı alanı, C-terminali 110 kDa transmembran fragmanı ile heterodimer bir yapıdadır. Ft, bir büyüme regülatörü rolünün yanı sıra Drosophila'daki kanat kıllarının koordineli yönlendirmesinde görüldüğü gibi bir epitel düzlemindeki hücrelerin apikal-bazal eksene dik olan bir ekseninde kendisini yönlendirmesi ile düzlemsel hücre polaritesini de etkilemektedir. Ft'yi Hippo sinyalizasyonuna bağlamak için iki farklı model öne sürülmüştür. İlkinde Ft, Ex ve Hpo'nun doğrusal bir yolda işlev gördüğü ve Ft'nin apikali membran lokalizasyonu ve Ex'in stabilitesi için gerekli olduğudur. Diğer modelde ise Ft ve Ex'nin birbirine paralel çalıştıkları ve sırasıyla Ft ve Ex'nin protein seviyelerinin Wts proteininin fosforilasyonunu etkilediğidir (Cho ve ark, 2006).

Hippo yolunda Ft hareketinin önemli alt düzenleyicisi miyozin Dachs antagonistik olarak Ft'ye ve Wts'in akış yukarısına işlev görmektedir. Dachs, Drosophila hücre kültürlerinde aşırı eksprese edildiğinde Wts ile ilişkilidir ve Wts proteolizisini teşvik ederek fonksiyon göstermektedir (Rogulja ve ark, 2008).

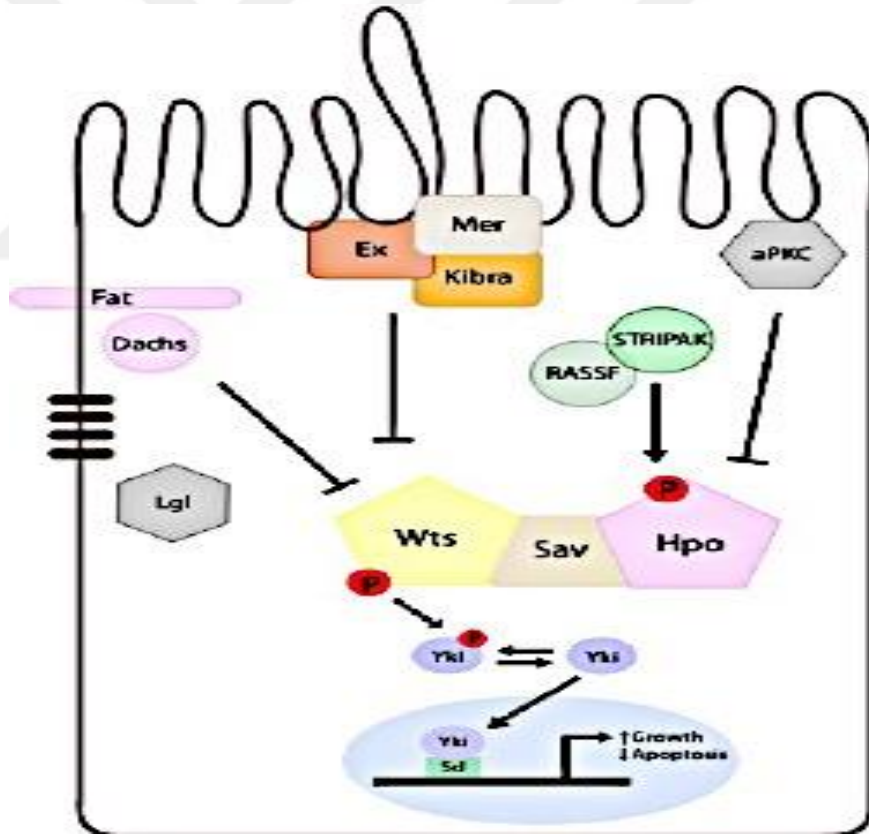
Ft, Dachsous (Ds) adı verilen başka bir atipik kaderine bağlanarak işlev görür ve bu süreç golgi ağında transit olarak Ft ve Ds'in kaderin domainlerini fosforile eden Golgi yerleşik kinazı olan Dört four-jointed (Fj) ile modüle edilmektedir. Fj ve Ds, birçok gelişmekte olan dokuda karşıt derecedeki gradyanlarda ifade edilir ve bunların ekspresyonu, Decapentaplegic (Dpp, BMP), Wingless (Wnt) ve Hedgehog gibi morfojenlerle düzenlenir ve doku şekli ile boyut koordinasyonunda potansiyel bir mekanizma sağlarlar. Fj aracılı fosforilasyon, Ft'nin Ds'leri bağlama yeteneğini artırırken, Ds'nin Ft'ye bağlanma kabiliyetini inhibe eder, bu bize Fj'nin birçok Drosophila dokusunda derecelendirilmiş ekspresyonunun, Dach'ların kutuplaşmış lokalizasyonu tarafından yansıtıldığı gibi, her hücredeki polarize Ft aktivitesine nasıl dönüştürülebileceğine ilişkin bir moleküler mekanizma sergilemektedir (Simon ve ark 2010).

Ft'nin bir başka modülatörü olan kazein kinaz Disc Overgrown (Dco), Ft'in hücre içi alanını fosforile edebilmektedir. Yine bir bir Ft regülatörü olan Lowfat (Lft), Ft ve Ds'lerin sitoplazmik alanlarına bağlanan ve sitoplazmik alanların stabilitesini etkileyen korunmuş bir sitoplazmik proteindir. Ft ve Ds ise tersine Lft'nin sub-apikal lokalizasyonunu kontrol etmektedir (Mao ve ark, 2009).

Ds-Ft sisteminin geleneksel reseptör-ligand etkileşimlerinden ayıran olağandışı özellikleri vardır. Birincisi, Ft sinyali yalnızca Ds miktarıyla değil, Ds gradyanının dikine göre düzenlenmektedir. Dik bir Ds gradyanı, Ft'yi inaktive edeken sığ bir gradyan Ft'yi harekete geçirir. İkinci olarak ise sinyal gönderen hücrelerde olduğu kadar sinyale yanıt veren hücrelerde de Ds gereklidir ve Ds'nin ligand ve reseptör benzeri aktivitelere sahip olduğu düşünülmektedir. Son olarak Ds ve Fj, Ft'ye bağlı PCP sinyalleme üzerinde ters etkilere sahiptir ancak Ft bağlı Hippo sinyalizasyonunda benzer etkileri vardır. Bu zıt etki, PCP'nin bir hücre içindeki Ft kutuplaşmasının yönlülüğü ile düzenlendiği bir modelle açıklanmaktadır (Rogulja ve ark, 2008).

Transmembran Protein crumbs; Crumbs(Crb), Drosophila embriyolarında apikal-bazal polaritenin düzenlenmesindeki rolü ile en iyi bilinen apikal transmembran proteindir.

Ekstraselüler hücre domaininde 28 EGF benzeri ve dört laminin AG benzeri tekrarlar ile bir juxtemembran FERM bağlama motifi (FBM) ve bir C terminali PDZ-bağlama motifi (PBM) içeren kısa bir hücre içi domain içermektedir. Crb, apikal kutup proteinleri Stardust (Sdt) ve Patj ile PBM motifi aracılığıyla protein kompleksi oluşturmaktadır ancak Crb'nin FBM'sinin moleküler fonksiyonu daha tam olarak açık değildir. Birkaç çalışmada, FBM'nin Ex stabilitesini ve lokalizasyonunu etkilediği gösterilmiştir (Ling ve ark, 2010). Crb'nin FBM'si Ex'nin FERM domainine bağlanır ve bu süreç Ex'in apikal lokalizasyonu için gereklidir. Crb'in aşırı ekspresyonu, FBM'ye bağlı dokunun aşırı büyümesine ve muhtemel bir dominant-negatif bir etki ile apikal Ex proteininin tükenmesine neden olur. Kibra ve ex gibi Hippo yolağının diğer upstream regülatörlerinde olduğu gibi crb'nin transkripsiyonu Hippo sinyalizasyonu ile negatif olarak düzenlenmektedir (Genevet ve ark, 2009).



Şekil 22: Hippo yolağının ve Yki'nin farklı yukarı akış bileşenleri arasındaki etkileşimleri (Parsons ve ark, 2014)

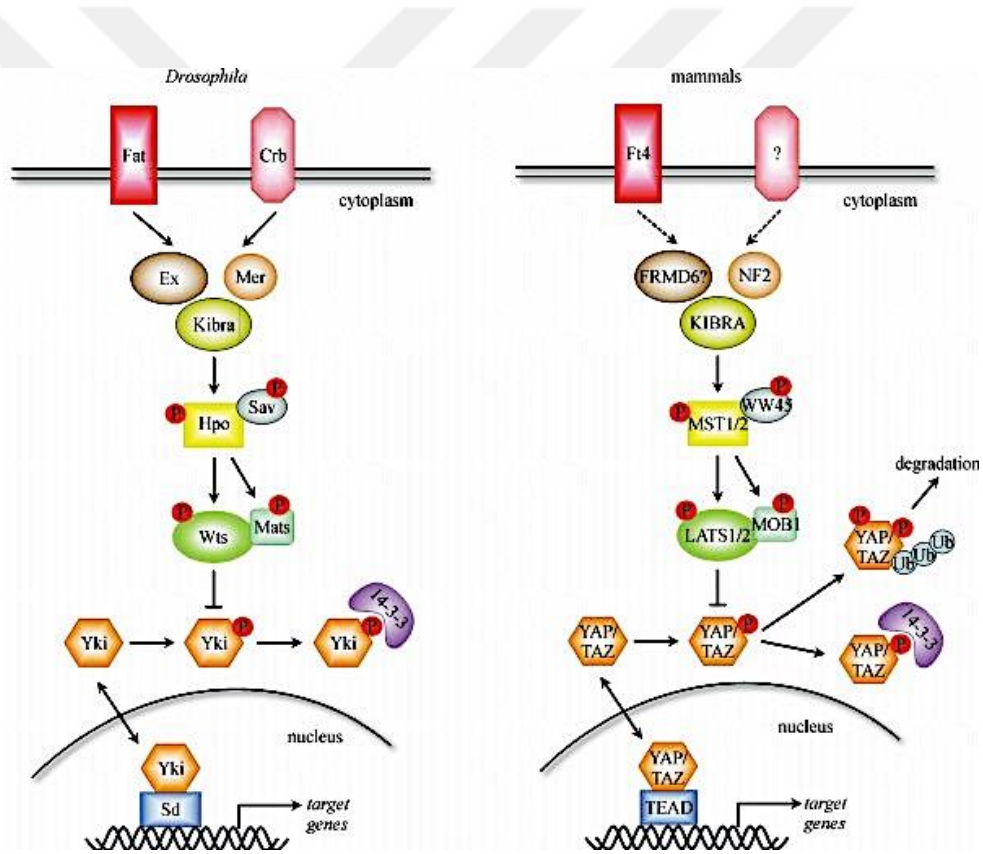
Yki etkinliğinin düzenlenmesi; Hippo yolağının upstream basamakları tarafından düzenlenmesi göz korkutucu bir şekilde karmaşık gözükse de, bu upstream bileşenleri, ortak

bir downstream büyüme düzenleyici efektör olan transkripsiyonel koaktivatör Yki'ye sinyal vermektedir. Nitekim Wts, Yki'nin Serin rezidülerinden (S168) doğrudan fosforile eder ve 14-3-3 proteinleri için bağlanma yeri oluşturur ve bu da Yki'nin nükleustan uzaklaşmasına ve sitoplazmik birikimine neden olur (Zhao ve ark, 2007). Hippo sinyalin kaybı, 14-3-3'ün nakavtı veya 14-3-3 bağlanma motifinin mutasyonu endojen Yki nükleer birikime ve / veya aktivasyonunun anormal hale gelmesine yol açar. Wts, aynı zamanda aşırı eksprese edilen Yki'nin faaliyetini ve nükleer lokalizasyonunu S168'den daha az olarak ve 14-3-3'ten bağımsız olarak S111 ve S250 olmak üzere iki ilave bölgeden de etkileyebilmektedir. Yki'nin WW alanları ile Ex, Wts ve Hpo'nun PPxY motifleri arasındaki doğrudan bağlanma vardır ve bu bağlantı Yki'yi durdurabilmektedir (Pan ve ark, 2010)

Yki tarafından transkripsiyonel regülasyon; bir transkripsiyonel koaktivatör olarak Yki doğrudan DNA'ya bağlanmaz, daha çok Yki'nin neden olduğu doku büyümesine aracılık eden TEAD/TEF aile transkripsiyon faktörü Scalloped (Sd) gibi DNA-bağlayıcı transkripsiyon faktörleri ile ortaklık eder. Sd, iyi karakterize edilmiş bir Hippo hedef geni olan diap1'in Hippo'ya bağlı transkripsiyonel regülasyonunu sağlayan minimum 26 bp Hippo yanıt elementine (HRE) direkt olarak bağlanır. Diğer DNA bağlayıcı transkripsiyon faktörleride Yki aktivitesinin bazal seviyelerine yanıt olarak hedef gen ekspresyonunu düzenlemektedir (Wu ve ark, 2008).

Hpo'dan Yki'ye kadar olan fosforilasyon mekanizmasında çekirdek kinaz kaskadı değişmez ve gerekliken kinaz aktivitesini etkileyen upstream basamakları çok daha çeşitli ve aslında kısmen gereğinden fazla olduğu göze çarpmaktadır. Yolaktaki asıl büyük soru, Hippo yolağını aktive eden birincil "sinyaller" olan hücre adezyonu ve polaritesinin özelliklerini tanımlamak ve bu sinyallerin Hippo kinaz kaskadı tarafından nasıl biyokimyasal olarak yorumlandığını anlamak gerekmektedir. Apikal olarak bulunan upstream reseptörleri Kibra-Ex-Mer kompleksi, downstream kinaz kaskadıyla doğrudan etkileşimleri göz önüne alındığında, sinyal entegrasyonu için bir platform olarak benzersiz bir konumdadır. Hippo kinaz kaskadının plazma zarında aktive edildiği düşünülse de, plazma membranında ki kinaz aktivasyonunun biyokimyasal mekanizması açıklığa kavuşturulmamaktadır. Ayrıca, memeli Hippo kinaz kaskadının bazı bileşenlerinin nükleus gibi ilave hücre içi bölmelerde mitotik çıkış ve sentromer duplikasyonunu kontrol altında tutmada aktive edilip edilemeyeceği de bilinmemektedir (Şekil 23) (Guo ve ark, 2007; Hergovich ve ark, 2009).

Pozitif upstream regülatörlerinin yanı sıra, proteinlerle sağlanan ilave sinyaller olan entegrasyon Hippo kinaz kaskadını negatif olarak da modüle edebilmektedir. Bu tür proteinler, daha öncede bahsedilen miyozin benzeri protein Dachs, Drosophila Ras ilişkili ailesi proteini dRASSF ve LIM ailesi protein Ajuba'dır (Mao ve ark, 2006; polesello ve ark, 2006). Bununla birlikte, memelilerdeki tümör süpresör karşılıklarından farklı olarak, dRASSF, Sav ile Hpo'ya bağlanması için rekabet ederek ve dSTRIPAK olarak adlandırılan Hpo'yu inaktive eden PP2A kompleksini aktive ederek büyümenin olumlu bir düzenleyicisi olarak işlev görmektedir (Ribeiro ve ark, 2010). Ajuba proteinleri sıkı bağlantı komponentleridir ve Hippo sinyalini Wts ve Sav ile fiziksel etkileşimler yoluyla inhibe etmektedir (Das thakur ve ark, 2010).

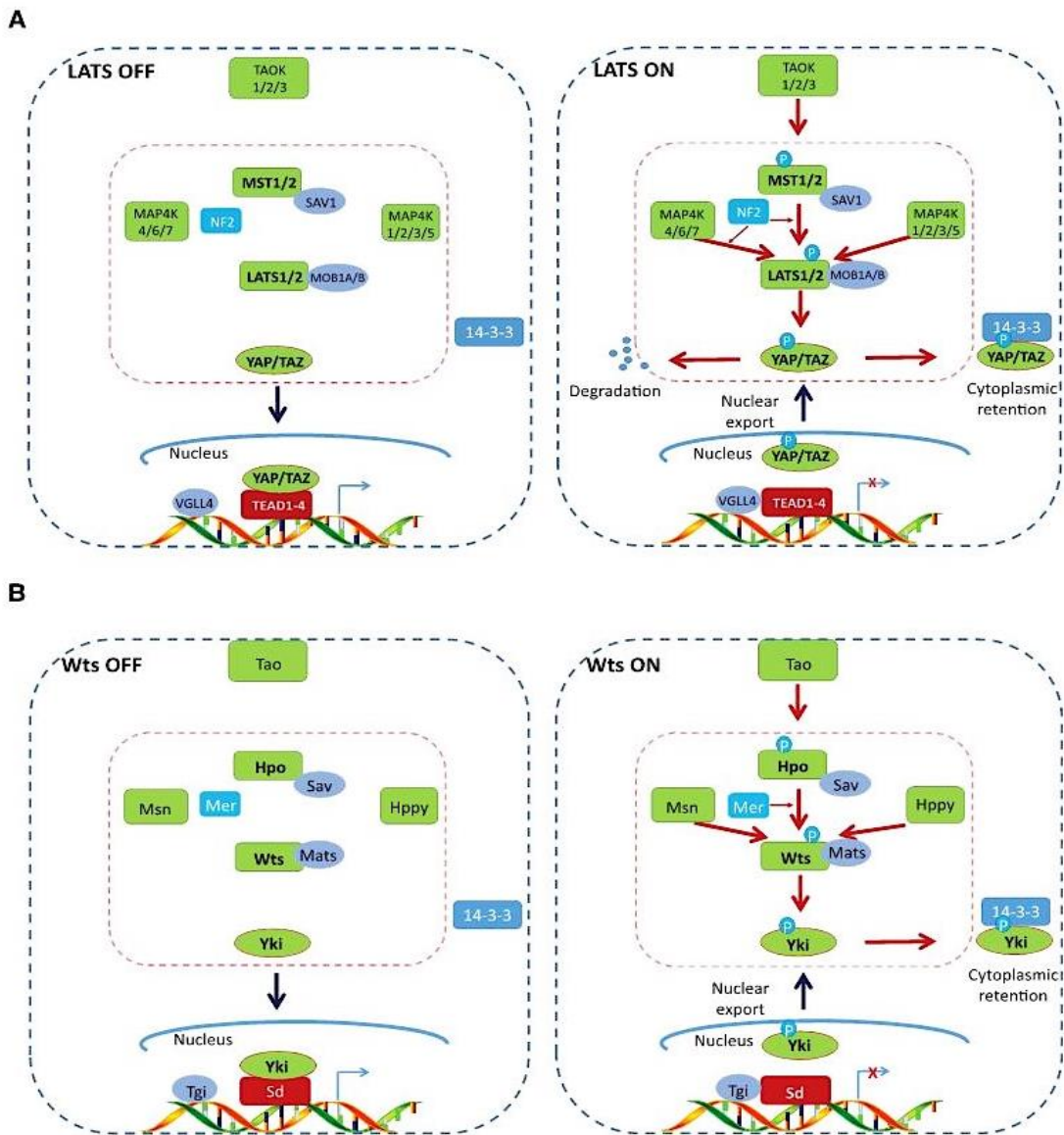


Şekil 23: Hippo yolağının farklı bileşenleri arasındaki etkileşimler (Luo, 2010)

2.6.3. Hippo Sinyalizasyonunun Memelilerde Çekirdek Kinaz Kaskadı

Hippo sinyal yolağının memelilerdeki çekirdeğini, memeli Ste-20 benzeri kinazlar 1/2 (MST1/2, Drosophila Hippo'nun [Hpo]) homologları), büyük tümör supresörü 1/2 (LATS1/2, Drosophila Warts homologları [Wts])'yi fosforilasyona uğratarak aktive eden bir

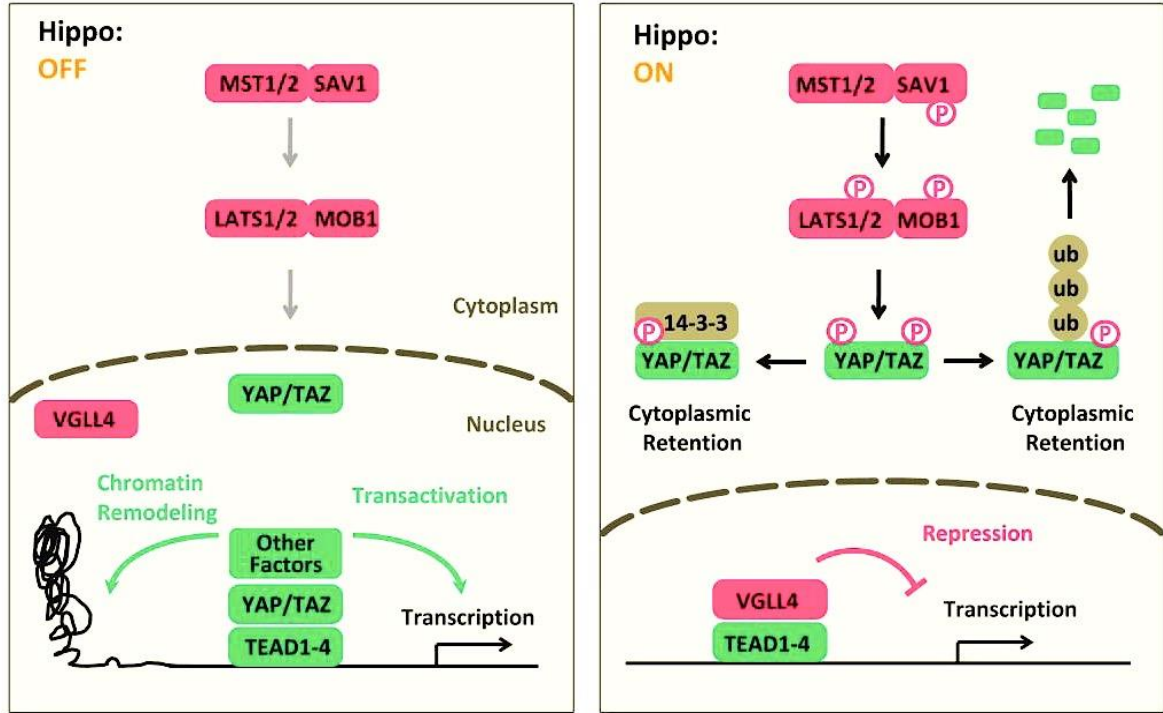
kinaz basamağı oluşturmaktadır. Bu kinaz kaskadı Yes ile ilişkili protein (YAP) ve transkripsiyonel ko-aktivatör PDZ bağlanma motifli (TAZ; *Drosophila* Yorkie'nin iki homologu [Yki]) olan iki transkripsiyonel koaktivatörün faaliyetlerini sınırlamaktır. YAP ve TAZ aktif olduklarında, TEAD transkripsiyon faktörü ailesini (*Drosophila* Scalloped [Sd] homologları) bağlamak için çekirdeğe yer değiştirirler ve hücre çoğalması, hayatta kalma ve göç ile ilgili geniş bir gen yelpazesinin ekspresyonunu indüklerler. Mekanik olarak, Hippo kinaz kaskadı, MST1/2'nin aktivasyon halkasını fosforile eden ve dolayısıyla MST1/2 aktivasyonuna yol açan TAO kinazlar (TAOK 1/2/3) tarafından başlatılabilir (Şekil 24) (Boggiano ve ark, 2011).



Şekil 24: *Drosophila* ve Memelilerde Hippo sinyal yolağı. A) Memeli Hippo yolağı, B) *Drosophila* Hippo yolağı (Meng ve ark, 2016)

Aynı zamanda aktivasyon halkası fosforilasyonun MST 1/2 dimerizasyonu ile arttırılmaktadır. Bu nedenle, MST 1/2 aktivasyonunun dimerizasyon ile başlatılabileceği ve upstream kinazlar gerektirmediği düşünülmektedir. Aktif MST 1/2, iki iskele proteini olan SAV1'i (Protein Salvador homolog 1, Drosophila Salvador [Sav] homologu) ve MOB1A/B'yi (Mob kinaz aktivatör 1A/B, Drosophila Mats homologları) fosforilasyona uğrattır ve bu LATS1/2'nin fosforilasyonunda MST1/2'ye yardımcı olmaktadır (Şekil 25) (Praskova ve ark 2008). Bu aktivasyonda diğer önemli unsur ise NF2/Merlin'dir. Doğrudan LATS 1/2 ile ilişki kurar ve MST 1/2-SAV1 kompleksi tarafından LATS 1/2 fosforilasyonunu kolaylaştırır. LATS 1/2 daha sonra otoposforilasyona tutularak aktive edilir ve bunun ardından YAP ve TAZ'ı fosforile ederek etkisiz hale getirir. MST 1/2'ye paralel olarak, MAP4K (mitojen ile aktifleştirilmiş protein kinaz kinaz kinaz), MAP4K 1/2/3/5 (Drosophila Happyhour [Hppy] homologları) ve MAP4K 4/6/7 (Drosophila Misshapen'in homologları [Msn]), LATS1/2'yi hidrofobik motifleri ile doğrudan fosforile ederek LATS 1/2 aktivasyonu sağlamaktadır (Meng ve ark, 2016). HEK293A hücrelerinde, MAP4K 4/6/7'in üçlü nakavtı, YAP/TAZ'ın fosforilasyonunu MST 1/2 çift nakavtına göre serum yoksunluğu altında daha dramatik biçimde azaltmaktadır bu belirli koşullar altında Hippo yolağının düzenlenmesinde MAP4K'lerin MST'ye göre daha belirgin bir rol oynayabileceğini göstermektedir. Bununla birlikte, kontakt inhibisyon, enerji stresi, serum yoksunluğu gibi LATS-aktive edici sinyallere yanıt olarak YAP fosforilasyonunu ortadan kaldırmak için hem MST1/2 hem de MAP4K'lerin silinmesi gereklidir. Bu nedenle, MST1/2 ve MAP4K'lar, LATS1/2 düzenlenmesinde rollere sahiptir. YAP ve TAZ'ın fosforilasyonu, YAP ve TAZ'ın 14-3-3 ile bağlanmasına ve 14-3-3'ün YAP/TAZ'ın sitoplazmik sekestrasyonuna neden olmaktadır. Ayrıca LATS ile indüklenen fosforilasyon, YAP/TAZ'in Kazein kinaz 1δ / ε ile fosforilasyonunu ve SCF E3 ubiquitin ligazının alımını tetikleyen YAP/TAZ ubiquitasyon aracılı bozunmasına yol açar (Zhao ve ark, 2010). Buna ek olarak, YAP proteini de otoposforilasyon ile bozunabilmektedir (Meng ve ark, 2016). YAP ve TAZ, transkripsiyonel ko-aktivatörlerdir ve DNA bağlama alanlarına sahip değildirler. Aksine, bu dizi-spesifik transkripsiyon faktörleri çekirdeğe transloke olduklarında TEAD1-4 ile etkileşim aracılığıyla gen ifadesini düzenlerler (Zhao ve ark, 2008). TEAD1-4 aynı zamanda çekirdekte VGLL4'e (Vestigial Like Family Member 4) bağlanabilmektedir ve bu nedenle transkripsiyonel baskılayıcı olarakta işlev görmektedir. YAP/TAZ ve TEAD1-4 arasındaki etkileşim, VGLL4'ü TEAD1-4'ten ayırmaktadır, böylece doku büyümesini arttırmak ve apoptozu inhibe etmek için TEAD aracılı gen transkripsiyonunu aktive etmektedir. fare modellerinde MST 1/2, SAV1, MOB1A/B, NF2 veya LATS 1/2 delesyonu veya YAP aşırı

ekspresyonu, TEAD hedef gen ekspresyonunun sergilenmesine bunun neticesinde progenitör hücrelerin çoğalması ve doku büyümesine neden olmaktadır (Zhou ve ark, 2009)



Şekil 25: Yap/Taz'ın çekirdek kinaz kaskadına yanıtı (Yu ve ark, 2015)

2.6.4. Memeli Hippo Kinaz Kaskadının Upstream Düzenleyicileri

Dachs hariç, memeli genomu, Hippo yolağının drosophilada bildirilen tüm upstream düzenleyicileri için homologlarını içerir. Bunlar, iki Kibra homoloğu (KIBRA/WWC1 ve WWC2), iki Ex homoloğu (FRMD6/Ex1 ve FRMD1/Ex2), bir Mer homoloğu (NF2/Mer), bir Ft homoloğu (Fat4/Fat-j), iki Ds homoloğu (Dchs1 ve Dchs2), bir Fj homoloğu (Fjx1), iki Lft homoloğu (Lix1 ve Lix1- benzeri) ve üç Crb homoloğu (Crb1, Crb2 ve Crb3) dur (Tablo 1) (Pan, 2010).

Drosophilada karşılığı olan ve Hippo sinyalizasyonunun upstream regülatörleri olarak dahil edilmiş olan memeli genleri arasında NF2/Mer en yoğun şekilde incelenmiş olanıdır. Mer/NF2 yaklaşık yirmi yıl önce mutasyonunun sinir sistemi ile ilişkili benign schwannomalar ve diğer Schwann hücre kaynaklı tümörlerin gelişimi ile karakterize edilen otozomal dominant bir bozukluk olan Nörofibromatozise neden olan bir tümör baskılayıcı olarak keşfedilmiştir (Rouleau ve ark, 1993). O zamandan beri, NF2/Mer, memeli

hücrelerinde Ras, Rac, STAT veya PI3K sinyalizasyonunun yanı sıra EGFR gibi membran reseptörlerinin endositozu/degradasyonu veya nükleusta E3 ubiquitin ligaz CRL4^{DCAF1}'in inhibisyonu gibi efektör yollar ve hücre işlevlerinin geniş bir yelpazesine bağlıdır (Li ve ark, 2010). Yine NF2 işlevinin özellikle önemli bir özelliği hücre yüzeyi reseptörlerinin (örneğin hiyalüronik asit reseptörü CD44) veya sıkı bağlantıların aracılık ettiği temas inhibisyonunda belirgin bir rol oynamasıdır. Yine Nf2'nin inaktivasyonunun hepatoselüler karsinoma (HCC) ve safra kanalı tümörlerine yol açtığı gösterilmiştir (Zhang ve ark, 2010). Mst1/2 ve Sav1 gibi çekirdek Hippo yolağı bileşenlerinin mutasyonları, benzer çift tümör fenotiplerini ortaya çıkarmaktadır (Yu ve ark, 2010; Lu ve ark, 2010). YAP'ın kaybı, hepatositlerin ve safra epitelyal hücrelerinin kaybına yol açarken, YAP'ın heterozigot delesyonu, tek başına bir fenotipik bulguya yol açmamaktadır. Bu bulgular, fizyolojik olarak memelilerin Hippo sinyal yolağının upstream basamağına NF2/Mer yerleştiren güçlü genetik kanıt sağlamaktadır (Zhang ve ark, 2010).

Drosophila Kibra-Ex-Mer kompleksinin bazı bileşenlerinin aşırı eksprese edilmiş insan homologları, birbirleriyle fiziksel olarak veya Hippo yolağı bileşenleri ile etkileşime girerek Lats1/2 fosforilasyonu ve memeli hücre kültürlerinde YAP aktivitesini inhibe etmektedirler (Zhao ve ark, 2007).

Sadece Fat4 benzer sitoplazmik kuyruğu ile diğer dört memeli atipikal kadherin arasından *Drosophila* Ft homologudur. Fat4, düzlemsel hücre polaritesi ile sinir tüpünün uzamasının rolü sıra Fat4 mutantları yönlendirilmiş hücre bölünmesi kaybıyla karakterize kistik böbrek hastalığını geliştirmektedir (Saburi ve ark, 2008). Aynı şekilde, memeli apikobazal polaritesinde Crb familyası proteinlerinin önemi ve patofizyolojisi, insan Crb1'deki mutasyonların, retinitis pigmentosa ve Leber konjenital amaurosis gibi erken başlangıçlı retinal dejeneratif hastalıklara yol açtığı gerçeği ile gösterilmiştir. Fakat bu Crb eksik fenotipleri Hippo sinyali ile ilgili değildir. İlginç olarak, Fat4 ve Crb3, meme kanserlerinde potansiyel tümör baskılayıcı olarak yer almaktadır, bu da belirli dokularda bu proteinler arasında olası bir çapraz-ilişkiyi düşündürmektedir (Pan, 2010).

Tablo 1: Drosophila ve insanda hippo sinyalizasyonunun bileşenleri

<i>Drosophila</i>	<i>İnsan</i>	<i>Korunmuş Motifler ve Alanlar</i>
Çekirdek kaskad		
Hippo	Mst 1-2	Ste20 Ser/Thr Kinaz ve SARAH Alanı
Salvador	Sav1/ WW45	WW ve SARAH Alanı
Warts	Lats1-2	NDR Ser/Thr Kinaz Alanı, PPXY Motifi
Mats	MOBK1A-B	Mob1/phocein alanı
Yorkie	YAP, TAZ	WW ve TEAD-bağlanma alanı
Scalloped	TEAD1-4	TEA/ATTS ve Yki/YAP-bağlanma alanı
<i>Upstream apikal kompleksler</i>		
Kibra	KIBRA/WWC1, WWC2	WW ve C2 alanı
Expanded	FRMD6/Ex1, FRMD1/Ex2	FERM alanı
Merlin	NF2/Merlin	FERM alanı
<i>Fat efektörleri ve regülatörleri</i>		
Fat	Fat4/fat-j	EGF- benzeri, Laminin G ve Kaderin Tekrar Alanı
Dachsous	Dchs1-2	Kaderin tekrar alanı
Four-jointed	Fjx1	Golgi Ser/Trh Kinaz
Dachs	?	Miyozin Motor Alanı
Disc overgrown	Ck1δ, CK1ε	Ser/Trh Kinaz Alanı
Approximated	2DHHC14	DHHC Çinko Parmak Alanı
Lowfat	Lix1, Lix1L	Bilinmeyen Korunmuş Alan
<i>Apikal-Bazal polarite</i>		
Crumbs	Crb1-3	EGF- benzeri, Laminin G Alanı, PDZ ve FERM-Bağlanma Motifi
Lgl	Lgl1-2	LLGL2 Alanı
aPKC	aPKCλ, aPKCζ	PKC Kinaz, PB1 ve C1 Alanı
<i>Diğer düzenleyiciler</i>		
dRASSF	RASSF1-6	Ras ilişkili ve SARA alanı
dSTRIPAK PP2A	STRIPAK PP2A	PP2A Ser/Thr fosfataz kompleksi
dJuba	Ajuba, LIMD1, WTIP	LIM Alanı

2.6.5. Hippo Kinaz Kaskadının Aktivasyon Mekanizmaları

LATS1/2, Protein kinaz A/G/C (AGC) ailesinin bir alt grubu olan, NDR (nükleer Dbf2 ile ilişkili) kinaz ailesine aittir. NDR ailesinin diğer iki üyesi NDR1 (STK38) ve NDR2 (STK38L)dir. Hippo yolağı etkileşiminin birkaç yeni çalışmasında Hippo yolağında NDR1/2'yi içine almaktadır. NDR1/2, bağırsak epitelinde YAP kaynaklı tümör genезisi inhibe etmek için belki bir YAP kinazı olarak işlev görebilir (Wang ve ark, 2014; Zhang ve ark, 2015). NDR1/2 ve LATS1/2'nin benzer fosforilasyon motiflerinde paylaşmaktadır. Bununla birlikte, LATS1/2'nin delesyonunu içeren birçok koşulda YAP fosforilasyonu ortadan kalkar ve YAP'ın nükleer lokalizasyonu meydana gelir dolayısıyla Hippo yolağının

düzenlemesinde NDR1/2'nin kesin rolü tanımlanmamıştır (Meng ve ark, 2016). NDR Kinaz ailesi, Aktivasyon halkası içinde korunan bir Ser/Thr kalıntısıyla aktivasyon için hidrofobik motif düzenleyici bölgenin fosforilasyonuna ihtiyaç duymaktadır. Hidrofobik motifin fosforilasyonu, upstream basamaktaki Ste20 benzeri kinazlar aracılığı ile gerçekleşir: LATS1/2 ve NDR1/2 için MST1/2 ve NDR1/2 için MST3 bu kinazlardır (Tang ve ark, 2015). Son yıllardaki araştırmalar, Ste20 ailesinin bir üyesi olan MAP4K'lerin LATS1/2'yi hidrofobik motifinden fosforile edebildiğini göstermiştir. Hidrofobik motifin Ste20 benzeri kinaz aracılı fosforilasyonu, aktivasyon halkasında LATS otoposforilasyonunu teşvik eder, bu nedenle kinaz aktivitesinde bir artışa neden olur. İlginç bir şekilde, MOB proteinleri arasındaki etkileşim (insan genomu altı MOB'u kodlar: MOB1A/B, MOB2 ve MOB3A/B/C) ve kinazların N-terminal düzenleyici alanı, NDR ailesi kinazların ortak bir özelliğidir, ancak LATS1/2 ve NDR1/2'nin MOB proteinlerinin farklı alt gruplarını kullandığı görülmektedir. MOB1A/B hem LATS1/2 hem de NDR1/2 ile ilişkililikten; MOB2, NDR1/2 ile inhibitör etkileşime aracılık etmektedir, ancak LATS1/2 ile etkileşime girmemektedir (Kohler ve ark, 2010). Yeni yapılan çalışmalar MOB1'in LATS1/2 fosforilasyonundaki rollerine ve ardışık bir fosforilasyon olarak MST1/2'nin aktivasyonuna yeni moleküler kavrayışlar getirmektedir. MST2, kendi bağlayıcı kinaz alanı ile SARA alanı arasında oto-fosforilasyonu MOB1'i de içine alabilen bir fosfor tutma motifi göstermektedir. MOB1-fosfoMST2 kompleksinin yapısı, MOB1'in fosforile MST2'ye bağlanması ile MOB1'i kendine özgü otoinhibitör konformasyonundan kurtararak MOB1'i LATS1'e erişilebilir hale gelmesini sağladığını göstermektedir. Daha sonra LATS1, MOB1-fosfoMST2 kompleksine bağlanarak MST2-MOB1-LATS1 üçlü kompleksi oluşturmaktadır ve böylece MOB1'in N-terminal kuyruğunda (T35 ve T12) ve LATS1'in hidrofobik motifinde (T1079) MST2 tarafından fosforilasyon arttırılmaktadır. LATS1'deki T1079'un MST2 tarafından fosforilasyonu LATS1 aktivasyonuna doğrudan katkıda bulunurken, MOB1'in fosforilasyonu aslında MST2'den fosforile LATS1 ve MOB1'in ayrışmasını tetiklemektedir. Bu çalışmalar MST1/2 ile LATS1/2 aktivasyonunun moleküler mekanizması ile bu süreçte MOB1'in kritik rolü üzerine yapısal bilgiler vermektedir (Meng ve ark, 2016).

2.6.6. LATS Aktive Edici Kinazlar Olan MST1 / 2 ve MAP4K'ların Düzenlenmesi

LATS1/2'ye bağlı fosforilasyon, memelilerde YAP/TAZ düzenlemesinde en önemli olay olarak görünmektedir. Bunun nedeni Hippo yolağının bilinen birçok düzenleyici

sinyallerine yanıt olarak LATS1/2 nakavt hücrelerin birçoğunda YAP/TAZ fosforilasyonu ortadan kalkmaktadır (Meng ve ark, 2016). MST1/2 ve MAP4K'lerin, LATS1/2'yi fosforile edip aktifleştirdikleri ve LATS1/2 hidrofobik motif fosforilasyonunu ve aktivasyonunu ortadan kaldırmak için ise hem MST1/2 hem de MAP4K'lerin ortadan kaldırılması gerektiği gösterilmiştir (Zheng ve ark, 2015; Meng ve ark, 2015). TAOK1/2/3 transfosforilasyonu ve MST'in dimerizasyonu yoluyla otofosforilasyonu ile MST1/2 aktivasyon halkasının tamamen aktif hale gelmesi sağlanır (Praskova ve ark, 2004). Yine AKT, ABL ve mTOR gibi birkaç başka kinazda MST1/2'yi birden fazla bölgeden fosforile edebilir ve MST1/2'nin kinaz aktivitesini farklı mekanizmalarla modüle edebilmektedir (Yuan ve ark, 2010). PP2A'nın çekirdeği olan STRIPAK kompleksi ise MST1/2 ile etkileşime girerek MST1/2 defosforilasyonuna katkıda bulunmaktadır. STRIPAK'ın etkileşiminin veya aktivitesinin Hippo yolağını kontrol ettiği bilinen sinyallerle düzenlenip düzenlenmediği halen belirsizliğini korumaktadır (Couzens ve ark, 2013).

MOB1 ile etkileşime ek olarak, MST1/2, SAV1 ve RASSF'ler ile de doğrudan etkileşime girer. SAV1 ayrıca MST1/2'nin bir substratıdır ve MST1/2 fosforilasyonu ile stabilize edilmiştir ve esas olarak MST1/2'yi LATS1/2'ye bağlamak için bir iskele proteini olarak çalışmaktadır fakat SAV1'in doğrudan MST1/2 kinaz aktivitesini etkileyip etkilemediği gösterilmemiştir (Callus ve ark, 2006).

RASSF'lerin MST1/2 düzenlemesindeki fonksiyonel rolü MST1/2'nin durumuna bağlı olarak olumlu ya da olumsuz olabilmektedir. Bununla birlikte, RASSF'lerin MST1/2 dimerizasyonunu bozduğu ve otofosforilasyonunu önlediği gösterilirken aynı zamanda RASSF'lerin önceden aktive edilmiş MST1/2 ile etkileşimi, MST1/2 defosforilasyonunu önlediği ve bu nedenle MST1/2 kinaz aktivitesini sürdürülebilir halde tuttuğu da gösterilmiştir (Praskova, 2004; Guo ve ark. 2011).

MAP4K'ların düzenlenmesi ise kapsamlı olarak hala daha incelenmemiştir. MAP4K'lerin yanı sıra MST1/2, Fas-aracılı apoptoz ile Caspase 3/6/7 tarafından parçalanabilmektedir. JNK yolağı (MEKK1-MKK4/7-JNK1/2) ve p38 yolağı (MAP3K-MKK3/6-p38MAPK) da bu parçalanmayı aktif hale getirebilmektedir. Bununla birlikte, parçalanmış MAP4K'lar ve özellikle MST1/2, sargı bobini ve SARA alanları gibi SAV1 veya LATS1/2 ile etkileşimleri için gerekli olan bazı alanları kaybederler (Dan ve ark, 2001). MAP4K1/4/6 da dahil olmak üzere birkaç MAP4K, Src homoloji 2 (SH2) ve SH3 alanlarını içeren bir bağdaştırıcı protein olan NCK1 (katalitik olmayan tirozin kinaz adaptör

proteini bölgesi 1) ile etkileşime girmektedir. NCK1, sitoplazmada bulunur ve reseptör tirozin kinazlar ile Rho-GTPase aktivasyonu ve aktin hücre iskeleti düzenlenmesiyle Ras-GTPaz aktivasyonuna katılır. Hippo yolağının düzenlenmesinde Rho-GTPases ve aktin hücre iskeletinin önemli rolü göz önüne alındığında, hücre iskeleti ve mekanik iletimi sinyallerinin MAP4K'ler vasıtasıyla LATS1/2'ye iletildiği düşünülmektedir (Buvall ve ark, 2013).

2.6.7. YAP / TAZ Transkripsiyonel Programları ve İşlevsel Çıktıları

Drosophila ve fare modelleri üzerine yapılan çalışmalar YAP/Yki'nin özellikle gastrointestinal dokulardaki doku öncü hücrelerinin kendini yenileme ve çoğalmasında rolü olduğunu tespit etmiştir. Daha önce yapılan transgenik fare çalışmaları, çarpıcı fenotipler göstermiş, gelişim ve karsinogenezisde hippo yolağının rolünü ortaya koymuş olsa da, doku spesifik delesyon ve indüklenmiş aşırı ifade ile çok daha saf hale getirilmiş transgenik fare modelleri son birkaç yılda üretilmiştir. Bu fare modeli çalışmaları, Hippo yol bileşenlerinin bireysel olarak doku büyümesi, hücre farklılaşması, hücre rekabeti ve malign transformasyona fizyolojik katkısının daha detaylı karakterizasyonlarına olanak tanımıştır (Barry ve ark, 2013). Hippo yolağının önemli bir fonksiyonunun, hücrenin sessizliğini korumak için farklılaşmış hücrelerde YAP ve TAZ'ın inaktivasyonu olduğu düşünülmektedir (Zhou ve ark, 2009). Doku hasar gördükten sonra, Hippo yolu baskılanır ve YAP ve TAZ, progenitör hücrenin kendini yenilemesi ve doku onarımı için harekete geçirmektedir. İn vitro kültürlenmiş hücrelerin yaralanması YAP'ı aktive eder ve nükleer YAP, yara iyileşmesini desteklemek için hücre göçünü ve çoğalmasını yönlendirir (Zhao ve ark, 2007). Hem temel hem de klinik kanser araştırmaları, hücre apoptozunun baskılanması ve hücre proliferasyonunun teşvik edilmesi yoluyla YAP ve TAZ'ın kanser inisiyasyonunda ve gelişiminde rolü olduğunu belirtmiştir. Yine YAP ve TAZ, bir takım kanserlerin yanı sıra diğer bazı hastalıklar için de terapötik hedefler olarak kabul edilmiştir (Yu ve ark, 2014). YAP ve TAZ'ın işlevinin çoğunlukla TEAD1-4 aracılı olduğu düşünülmektedir çünkü YAP ve TAZ doğrudan DNA'ya bağlanamazlar ve TEAD1-4'ün transkripsiyonel koaktivatörleri gibi davranırlar, bunun yanı sıra YAP ve TAZ'ın diğer birkaç transkripsiyon faktörü ile ilişkili olduğu da bildirilmiştir (Zhao ve ark, 2008). Birçok gen YAP ve/veya TAZ ile kompleks oluşturan TEAD tarafından transkripsiyonel olarak etkinleştirilir (Zhu ve ark, 2015). Mekanik olarak, YAP ve TAZ, SWI/SNF kromatin yeniden şekillendirme kompleksinin bileşenlerini veya NCOA6 histon metil transferaz kompleksini tekrar oluşturarak TEAD transkripsiyonel aktivitesini uyarmaktadır (Skibinski ve ark, 2014). Yine

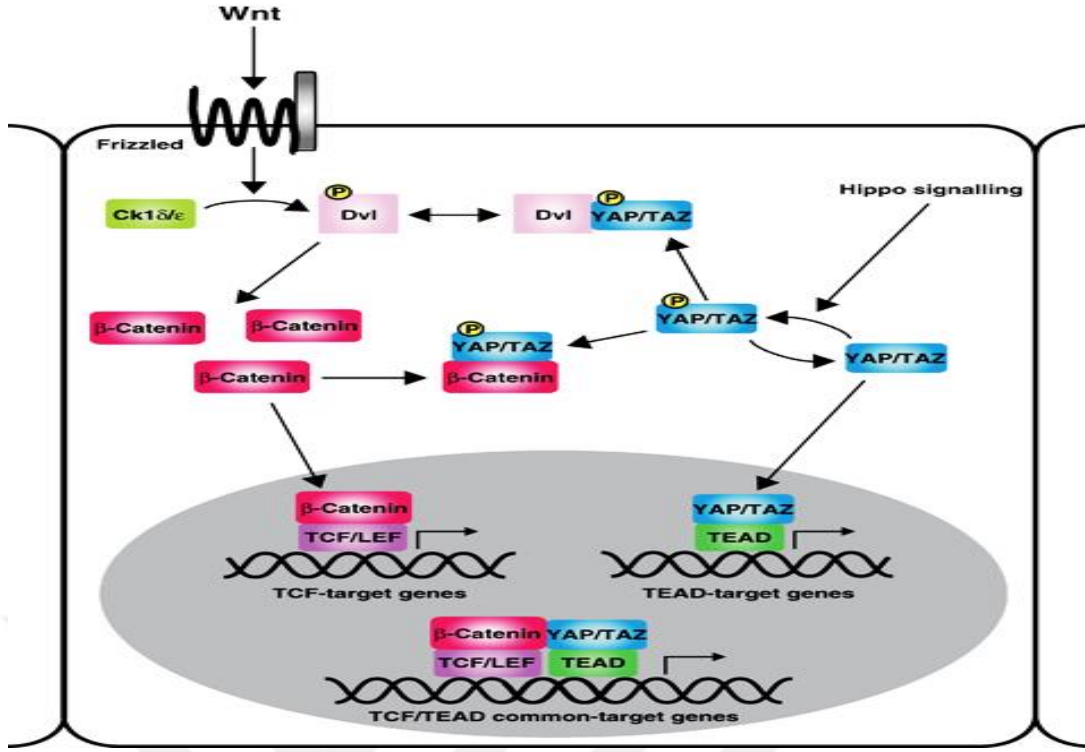
YAP/TAZ-TEAD kompleksi, DDIT4, Trail veya $\Delta Np63$ gibi ek hedef genler için NuRD histon deasetilat kompleksini çağırarak transkripsiyonel çekirdek baskılayıcı olarak da faaliyet gösterebilmektedir (Kim ve ark, 2015). Bu nedenle nükleer YAP/TAZ ya gen ifadesini indükleyebilir ya da baskılayabilir. YAP/TAZ'ın genom çapındaki eylemlerini aydınlatma konusundaki çalışmalar, YAP ve TAZ'ın transkripsiyonel düzenlemedeki bazı özelliklerini göstermiştir. *Drosophila*'da Yki, transkripsiyonel aktivasyona aracılık etmek için promotor bölgelere bağlanırken benzer şekilde YAP/TAZ'ın transkripsiyonel fonksiyonları TEAD'lerin hedef genlerin hızlandırıcılarına bağlanması ile ilişkilendirilmiştir (Lian ve ark, 2010). Motif analiz çalışmaları YAP/TAZ'ın esas olarak TEAD ile DNA'yı bağlamak için etkileşime girdiğini doğrulamıştır (Zhao ve ark, 2008). AP-1 transkripsiyon faktörleri, YAP bağlayıcı bölgelerde önemli ölçüde zenginleştirilmiş haldedir, bu motif YAP/TAZ-TEAD'in hedef genleri sinerjik olarak aktive etmek için AP-1 ile işbirliği yaptığını düşündürmektedir. AP-1, lözin fermuar proteininin JUN ve FOS ailelerinden oluşan heterodimerik bir protein kompleksidir. TEAD'ler AP-1 ile etkileşime aracılık etmektedirler. YAP/TAZ, AP-1 ile bir araya gelerek transkripsiyon başlatmak, transkripsiyon uzamasını arttırmak ve böylece hedef gen ekspresyonunu arttırmak için ek regülatörleride çağırabilmektedir. YAP/TAZ/TEAD aracılı transkripsiyonda AP-1'in rolünü destekleyen YAP/TAZ indüklü MCF10A meme epitel hücresi büyümesi AP-1 ile artarken AP-1'e bağlı deri tümör genезisi YAP/TAZ azalması ile durdurulabilir (Zanconato, 2015).

2.7. Hippo Sinyalizasyonu ve Wnt Sinyalizasyonu Arasındaki İlişki

Wnt ile Hippo Sinyalizasyonu yolağı arasındaki ters ilişki ilk kez 2010 yılında gösterilmiştir. Varelas ve arkadaşları TAZ'ın Ck1E ile Dvl arasındaki bağlantıyı engelleyerek Wnt3a ile indüklenmiş Dvl2 fosforilasyonu engellediğini göstermiştir ve böylece Wnt/ β -katenin sinyalizasyonu inhibisyona uğramaktadır (Varelas ve ark, 2010). Ayrıca MST veya LATS'ın ektopik ekspresyonu ve kontrol ettiği TAZ'ın sitoplazmik lokalizasyonu ile Wnt3a inhibisyonu gösterilmiştir. Endojen Wnt/katenin sinyalizasyonunun Hippo sinyalizasyon yolağının aktivasyonu ile inhibe edildiği gösterilse de bunu hangi yoldan gerçekleştirdiği açıklanmamıştır. *In vivo* durumda da TAZ knock out'lu sıçanların böbreklerinde az miktarda artmış katenin miktarı saptanmıştır (Makita ve ark, 2008). Ayrıca Hippo sinyalizasyonunun Wnt katenin sinyalizasyonu üzerine olan inhibitör etkisi kalp spesifik Salvador knock out fareleri ile gösterilmiştir. Artmış kalp büyüklüğü, artmış kardiyomiyosit proliferasyonu ve nükleer β -katenin miktarı Sav knock outlarında

saptanmıştır Mikroanaliz sonuçları kalp gelişiminde görevli genlerin ekspresyona uğradığını ve antiapoptatik aktivitenin β -katenine bağlı olarak arttığı saptanmıştır (Heallen ve ark, 2011). Piccolo ve arkadaşları ise YAP/TAZ seviyelerinin B-katenin ile düzenlendiğini gösteren bir mekanizma tanımlamışlardır. TAZ'ın Wnt/ β -katenin sinyalizasyonunun ayrılmaz bir mediyatörü olduğu fikri kışkırtıcı görünse de, TAZ düzeyinin, APC, Axin ve GSK3 β oluşan β -catenin yıkım kompleksinde düzenlendiği gösterilmiştir (Şekil 26). Wnt sinyalinin yokluğunda, GSK3 β ile fosforile edilmiş β -katenin, TAZ'ın β -TrCP E3 ligaz kompleksiyle ilişkisi için bir iskele görevi görmektedir. Bununla birlikte, Wnt sinyali varlığında, β -katenin fosforilasyonunun bloke edilmesi, yıkım kompleksinden hem β -katenin hem de TAZ'ın kaçmasına ve daha sonra β -katenin/Tcf ve TAZ/TEAD komplekslerinin aracılık ettiği hedef genlerin ekspresyonunu arttırmaya neden olmaktadır. Bu sonuçlardan ışığında aynı grup, YAP/TAZ'ın, β -TrCP'nin β -katenini yıkım kompleksine almasına ve ardından β -katenin degradasyonu için gerekli olduğunu göstermiştir (Azzolin ve ark, 2012). Genel olarak, bu veriler Hippo sinyal transkripsiyon faktörleri YAP ve TAZ'ın, β -katenin yıkım kompleksinin integral bileşenleri olduğunu ve Wnt yanıtlarının orkestrasyonunu sağladığını göstermektedir.

Bu TAZ'ın Wnt B kateninin mediyatörü olarak tanımlandığı bir düşünceye dayalıdır. Wnt sinyalizasyonu yokluğunda, B katenin GSK3 ile fosforillenerek TAZ ve TrCP E3 ligaz kompleksi için iskele yapısı sağlar. Wnt varlığında ise, B katenin fosforilasyonunun engellenmesi, hem B katenin hem de TAZ'ın yıkıcı komplekslerden kaçmasına imkan tanımaktadır. Bu sonuçların ışığında, YAP/TAZ'ın ve TrCP'nin B katenin parçalayıcı kompleksin esaslı elemanları olduğunu göstermektedir. Sonuç olarak, Hippo sinyalizasyonunun transkripsiyon faktörleri olan YAP ve TAZ'ın B katenin yıkım kompleksinin parçası olan integral elemanlar olduğu ve Wnt cevaplarında kontrol ettikleri saptanmıştır (Kim ve Jho, 2014).



Şekil 26: Wnt ve hippo sinyalizasyon ilişkisi (Imajo ve ark, 2012)

2.8. Hippo Sinyalini Aktivatör Olarak Hedefleyen Verteporfin

Hippo sinyalizasyonunda en önemli down-stream efektörü olan Yes-associated protein (YAP) Hippo yolağında ki Lats1/2 tarafından fosforilasyona uğrayarak sitozolik sekestrasyon ve ardından proteozom aracılı bozunmaya uğramaktadır. Hippo sinyalizasyonunun inaktivasyonu ise YAP'ın sitozolden çekirdeğe doğru yer değiştirmesine ve TEAD 'in aracılık ettiği transkripsiyonel ko-aktivatör olarak işlev görmesine ve böylece birçok gelişimsel genlerin yanı sıra tümör baskılayıcıların ekspresyonunu inhibe ederken onkogenik genlerin de transkripsiyonunu arttırmasına izin vermektedir (Wang ve ark, 2015).

Günümüzde kullanılan fotodinamik terapi (PDT), oksijen ortamında bir fotosensitizer ve ışığın etkileşimini kullanarak yapılan bir kanser tedavisidir. 1993 yılında resmi olarak ilk kez Kanada'da uygulanmaya başlanmıştır. Verteporfin ise FDA tarafından onaylanan ikinci nesil bir fotosensitizerdir. 2000 yılında, yaşla ilişkili maküla dejenerasyonunun tedavisi için kullanılmaya başlanmış ve ilk çalışmalar fotodinamik tedavi yoluyla hücre öldürmeye odaklanmıştır (Henney, 2000).

Verteporfin (VP), aromatik heterosiklik içeren modifiye dört pirol biriminden oluşan porfirin ailesine aittir. Verteporfinin kullanıldığı fotodinamik terapi (PDT), sensitizörün bir emme bandına tekabül eden 693 nm'lik bir dalga boyundaki bir ışınlama ile takip eden bir fotosensitize edici maddenin uygulanmasını içeren, klinik olarak onaylanmış, minimal invaziv bir terapötik yöntemdir. Yaşa bağlı maküler dejenerasyonda (AMD), lipozomal VP (Visudyne ticari adı), anormal kan damarlarında birikir ve buraya 693 nm'de reaktif oksijen radikaller üreten termal olmayan lazer uygulanarak aktivasyonu sağlanır. Bu, endotelde lokal hasarın yanı sıra damarların potansiyel eliminasyonuna da neden olur. Birçok hastada klinik olarak dünya çapında kullanılmaktadır ve bu sayede birçok hastada görme duyusunun korunması sağlanmaktadır. VP, test edilmiş olsa da birçok insan kanseri için ışık temelli tedavi yöntemi olarak henüz onaylanmamıştır. Vp içeren PDT, insan kanserlerinde sadece vaskülatüründe değil aynı zamanda doğrudan kanser hücreleri üzerinde apoptoz ya da otofajinin bir uyarıcısı olarak da etki gösterebilmektedir (Brodowska ve ark, 2014).

Bununla birlikte örneğin otofagozomu ve otofajiyi inhibe etmek için Verteporfinin ışık aktivasyonundan bağımsız aktivite sergilediği de gösterilmiştir. Son zamanlarda ise Verteporfinin YAP aktivitesini baskılayarak hepatoselüler karsinoma hücrelerinin ve retinoblastoma hücrelerinin proliferasyonunu inhibe ettiği öne sürülmektedir. Yine başka bir çalışmada VP'nin ışık aktivasyonu olmadan kanser hücrelerinin büyümesi üzerinde direkt bir inhibitör etkiye sahip olduğu ve bunu YAP-TEAD kompleksinin bozarak ve YAP kaynaklı onkogenlerin transkripsiyonun engellenmesi sonucu yaptığı gösterilmiştir (Donohue ve ark, 2011).

Verteporfin, otofaji de dahil olmak üzere tümör patofizyolojisi ile ilişkili fonksiyonları değiştirebileceğine ve bir fotosensitizer etkisinden bağımsız olarak inhibisyona neden olabileceğine dair kanıtlar vardır. Verteporfinin nükleer YAP düzeylerini düşürdüğünü ve sitozolik 14-3-3 σ 'yu arttırarak YAP'ı sitoplazmada yakaladığı yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. 14-3-3, yedi üyeden (β , γ , ϵ , ζ , η , σ ve τ (ayrıca θ olarak adlandırılır) oluşan 28-33 kDa'lık asidik proteinlerden oluşan oldukça korunmuş bir ailedir ve otofaji, apoptoz, hücre döngüsü, DNA hasar cevabı ve transkripsiyonel regülasyon gibi birçok kritik olayı düzenlemektedirler. 14-3-3 proteinleri otofajiyi düzenlediğinden bu durumun otofajiye karşı Verteporfin'in 14-3-3 aile üyelerini indüklemeye üzerindeki ikinci bir özellik olabileceği düşünülmektedir. 14-3-3 proteinlerinin başlıca aktivitesi sitozol içerisindeki fosforile proteinlerin tutulması ve ardından proteazomda bozunma için

hedefleme olduğu varsayılmaktadır. TAZ da (YAP'ın bir homologu) YAP gibi 14-3-3 tarafından sitoplazmada tutulmaktadır ve transkripsiyonel aktivasyonu durdurulmaktadır (Wang ve ark, 2015; Liu-Chittenden ve ark, 2012).

2.9. Hippo Sinyalini İnhibitör Olarak Hedefleyen C2 Ceramide

Hippo yolağının aktivasyonu için MST1/2'nin aktivasyonu ve YAP/TAZ aracılı gen ifadesinin inhibe edilmesi gereklidir. Hippo sinyalizasyonunda anahtar olay MST1/2 kinaz aktivasyon mekanizmasıdır. MST1/2 esnek bir bağlayıcı ile ayrılmış olan bir N-terminal kinaz alanı ve SARAH alanı içeren bir C-terminaline sahiptir. MST1 ve MST2, her biri SARAH alanı boyunca yapısal bir homodimer oluşturabilir ve kinaz aktivasyonu, aktivasyon halkasının trans-otofosforilasyonu ile gerçekleştirilir. MST1/2'in homodimerler oluşturarak otofosforilasyona uğramasına rağmen, Hippo yolağı kapalı olduğu zaman MST 1/2 moleküllerinin büyük çoğunluğu fosforile edilmemiş olarak kalır ve MST1/2 bu aktivasyonunun fosfatazlar tarafından antagonize edildiği düşünülmektedir. Son çalışmalar, Hippo aktivitesinin, *Drosophila*'da striatinle etkileşen fosfataz ve kinaz (STRIPAK) adı verilen çoklu altbirim protein fosfataz 2A (PP2A) kompleksi tarafından negatif olarak düzenlendiğini göstermektedir. Yapılan çalışmalar STRIPAK'ın MST aktivasyonu baskıladığını göstermiştir (Bae ve ark, 2017). Ayrıca MST1/2 defosforilasyonunun RASSF1A tarafından engellendiği RASSF1A'nın, fosfatazların rolüne karşı koyarak aktif MST 1/2 oluşumunu teşvik ettiğide PP2A'in inhibisyonu rolünü düşündürmektedir. Ser/thr protein fosfataz inhibitörü olan Okadaik asit ile yapılmış başka bir çalışmada in vitro olarak MST 1/2 'in aktivasyonunun arttığı gözlemlenmiştir Bunun sonucunda MST 1/2 'in PP2A tarafından defosforilasyona uğratıldığı kabul edilmiştir (Riberio ve ark, 2010; Hata ve ark, 2013).

Protein fosfataz 2A (PP2A), tüm ökaryotlarda bulunan, bir dizi hücrel süreçleri düzenleyen çok işlevli bir serin/treonin fosfatazdır. Bir yapısal A alt birimi ve heterotrimerik PP2A holoenzimleri oluşturmak üzere düzenleyici B tipi altbirimler ile kompleks oluşturan katalitik bir C alt biriminden oluşan bir çekirdek heterodimerden oluşmaktadır. B tipi alt birim PP2A'yı spesifik sinyal komplekslerine ve subselüler lokasyonlara yönlendirirken C alt birimi farklı substratlar yönündeki aktiviteyi düzenlemektedir (Dobrowsky ve ark, 1993).

Seramidler, N-açillenmiş ve bir yağ asidine bağlanmış bir sfingosin omurgasından oluşan sfingolipid sınıfına üyelerler. Seramid, 3-keto-dihidrosfingosin oluşturmak üzere

asetil-CoA ve serin kullanan serin palmitoiltransferaz (SPT) ile başlayan bir dizi adımla de novo olarak üretilmektedir. Bu ürün, dihidrosferidoz desaturaz tarafından desaturasyon reaksiyonu ile seramid oluşturmak üzere seramid senteziyle (SERS1-6) açılmış dihidrosfingosini üretmek üzere dihidrosfingosin desaturaz (DES) ile oluşturulmaktadır. Seramidin sentez yollarından biri sfingomiyelinlerin sfingomiyelinazlar tarafından parçalanmasıdır. Diğeri ise seramid sentaz işlevini içeren kurtarma yoluyla sfingozin-1-fosfat (S1P) nin defosforilasyonu ile üretilen sfingozinden doğrudan kaynaklanmaktadır. Seramid'in PP2A'yı aktive ettiği gösterilmiştir. Aynı zamanda sfingolipidlerin PP2A inhibitörlerine de bağlanarak PP2A'yı rahatlatdığı yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Mukhopadhyay ve ark, 2009; Chalfant ve ark, 2004; Chalfant ve ark, 1999).



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Deney Hayvanlarının Temini

Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları ünitesinden Yaklaşık 12-14 haftalık, ortalama 30-40 gr ağırlığında daha önce hiç gebeliğe bırakılmamış olan Balb/c cinsi 32 adet dişi ve 10 adet erkek olmak üzere fareler alınarak çalışma başlatılmıştır. Deney süresince bütün fareler bağıl nem oranı %40-60, optimal ısı (22C°) ve 12 saat aydınlık-12 saat karanlık ortam sağlanacak şekilde kafeslerde barındırılmışlardır. Deney sürecinde su ve pelet yem ihtiyaçları ad-libitum olarak karşılanmıştır. Çalışmaya öncesi ise Adnan Menderes Üniversitesi HADYEK kurulundan etik kurul onayı alınmıştır (Etik kurul no:64583101/2015/108).

3.2. Deney Hayvanlarının Gruplandırılması

10.5 ve 18.5 günlük fareler rastgele 4 gruba (n=4) ayrılmıştır. Fareler gebe kalmaları için iki dişi bir erkek olmak üzere kafeslere yerleştirilmiştir. Sabah ve Akşam olmak üzere günde iki kez vajinal plak kontrolü yapılmış ve plak gözlemlenen farelerin, gebeliğin 0.5'inci gününde (dpc:0.5) olduğu kabul edilerek gruplandırmalar yapılmıştır. Tüm dişilerin gebe kalmasının ardından erkek fareler deney hayvanları ünitesine geri teslim edilmiştir. 10.5 günlük embriyolar elde edilmiş olsa da histokimyasal işlemler öncesi soğuk zincirleri bozulduğundan deneye tabi tutulamamışlardır.

Grup I (Kontrol grubu E18.5, n=4): Deney süresince sadece gebelik takibi yapılacak olan ve E18.5 gününde fetusların elde edileceği grup.

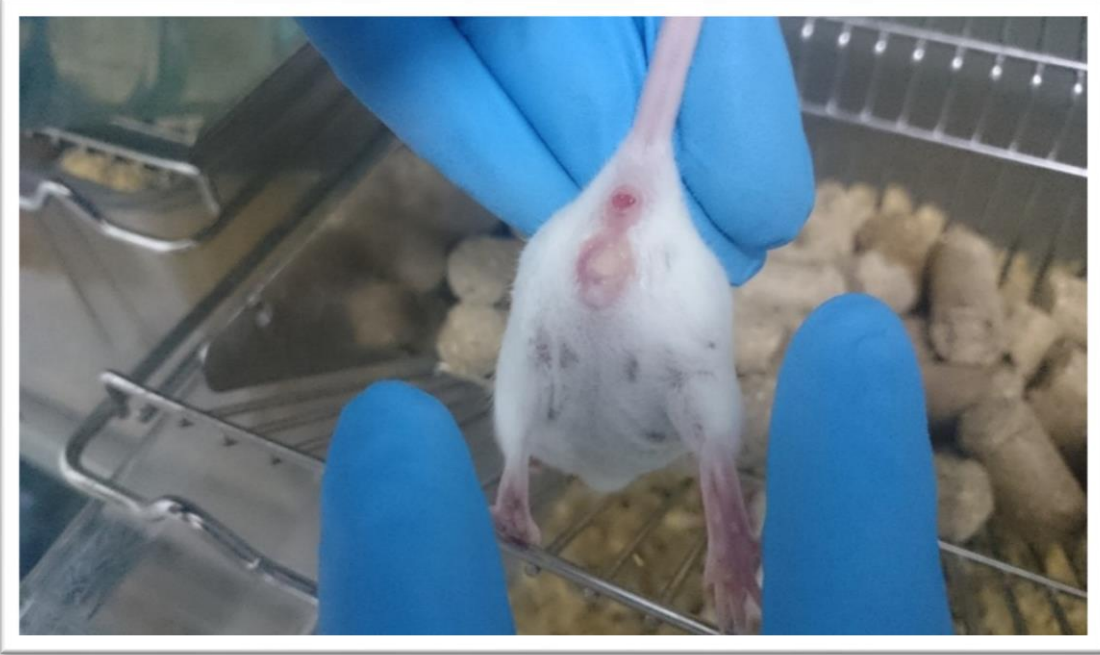
Grup II (DMSO E18.5 n=4): Gebeliğin ilk günü itibari ile hergün İlaçların çözündüğü Dimetil Sülfoksit uygulanıp E18.5 günde fetusların elde edileceği grup.

Grup III (Verteporfin E18.5, n=4): Gebeliğin ilk günü itibari ile hergün verteporfin uygulanıp E18.5 günde fetusların elde edileceği grup

Grup IV (C2 ceramide E18.5, n=4): Gebeliğin ilk günü itibari ile hergün c2 ceramide uygulanıp E18.5 günde fetusların elde edileceği grup



Resim 1: Gruplandırılan gebe farelerin takibi



Resim 2: Vajinal plağın tespiti

3.3. İlaçların Uygulanması

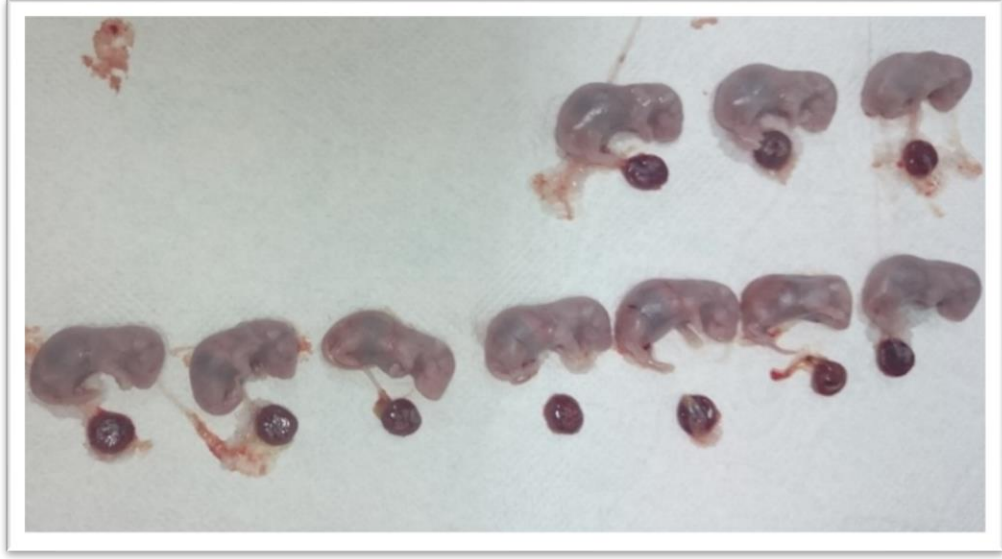
Gebeliğin ilk günü itibari ile grup III, DİMETİL SÜLFOKSİT (DMSO) içinde çözdürülmüş Verteporfin (Sigma-aldrich, SML0534), 1 mg/kg şeklinde gebeliğin sonlandırılacağı tarihe kadar günde tek doz şeklinde intraperitoneal olarak uygulanmıştır. Grup IV'e DMSO içinde çözdürülmüş C2 ceramide (N-Acetyl-D-sphingosine) (Sigma-aldrich, A7191) günde 10 µg tek doz şeklinde gebeliğin sonlandırılacağı tarihe kadar intraperitoneal olarak uygulanmıştır. Grup I (Kontrol, NT) gruplarına hiçbir ajan uygulanmazken, grup II DMSO gruplarına 1 ml DMSO'un 37 ml PBS içinde olan karışımından günde 0.3 ml intraperitoneal olarak gebeliğin sonlandırılacağı tarihe kadar verilmiştir.

3.4. Deneyin Sonlandırılması

E10.5 gününde sakrifiye edilecek olan gebe denekler eter anestezisi altında sakrifiye edilmişlerdir. Anneden alınan embriyolar soğuk Phosphate buffered saline içine alınarak disseksiyon mikroskobu altında ekstaembriyonik membranlarından ayrılarak artan alkol serilerinden geçirilerek dehidrate edilip immüno Floresans görüntülüne için soğuk zincire kaldırılmıştır. E18.5 günün kalp dokuları alınacak fetuslar için anneye eter anestezisi altında iken %40'lık formaldehit ile perfüzyon uygulanarak fetuslar çıkarılmıştır. Çıkarılan fetusların ağırlıkları hassas terazide ölçüldükten sonra torakslarına kesi açılarak kalpleri çıkarılarak histokimyasal işlemler öncesi fiksasyonlarının sağlanması için %10'luk formaldehite konulmuştur.



Resim 3: Fetusların anneden çıkarılması



Resim 4: E18.5 ait fetuslar



Resim 5: E10,5 Embriyoların diseksiyon mikroskobu altında ekstraembriyonik membranlarından ayrılması ve diseksiyon sonrası görünümü

3.5. Doku Takibi

E18.5 kalp Dokuları yapılacak olan histokimyasal boyamalar ve immünohistokimya için takip edilmiştir. Fiksasyonun ardından E18.5 güne ait kalp dokuları akarsu altında bir

gece bırakılarak fikasyon maddesinden uzaklaştırılmaları sağlanmıştır. Yıkama işleminin ardından manuel olarak aşağıdaki tabloda verilen takip işlemi uygulanmıştır.

Tablo 2: Doku takibi işlemi

<i>Kimyasallar</i>	<i>Süre</i>
<i>%70'lik Alkol</i>	1 Saat
<i>%80'lik Alkol</i>	1 Saat
<i>%96'lik Alkol</i>	1 Saat
<i>%100'lük Alkol</i>	1 Saat
<i>Ksilol</i>	1 Saat
<i>Ksilol (Son 15 Dakika 55°C Etüvde)</i>	1 Saat
<i>Parafin (Etüvde 65 °C)</i>	1 Saat
<i>Parafin (Etüvde 65 °C)</i>	1 Saat
<i>Parafine Gömme</i>	

Her gruptan rastgele 7 blok alınarak kalp dokuları transvers düzlemde yaklaşık 5 µm kalınlığında kesitler şeklinde alınmıştır. Kesitler immünohistokimya, PAS, Trikrom ve Hematoksilen-Eozin boyama için lamlara alınarak boyama işlemlerine geçilmiştir.

3.6. Histokimyasal Boyamalar

Hematoksilen- eozin boyama için bir gece önceden 45°C etüvde bırakılan dokulara ertesi gün yapılan işlemler tabloda verilmiştir.

Tablo 3: Hematoksilen-Eozin boyama prosedürü

<i>Kimyasallar</i>	<i>Süre</i>
<i>Ksilol</i>	5 dk
<i>Ksilol</i>	5 dk
<i>%100'lük alkol</i>	2 dk
<i>%80'lik alkol</i>	2 dk
<i>Distile su</i>	5 dk
<i>Harris' Hematoksilen (Merck)</i>	5 dk
<i>Akar su altında yıkama</i>	1 dk
<i>Eozin (Sigma-aldrich)</i>	1 dk
<i>%80'lik alkol</i>	2 dk
<i>%100'lük alkol</i>	2 dk
<i>Ksilol</i>	5 dk
<i>Ksilol</i>	5 dk
<i>Entellan ile kapatma</i>	

Bir gece önceden 45°C etüvde bırakılan dokulara Masson Trikrom boyama (Bio-Optica, 04-010802) için yapılan süreçler aşağıda ki tabloda verilmiştir.

Tablo 4: Trikrom boyama prosedürü

<i>Kimyasallar</i>	<i>Süre</i>
<i>Ksilol</i>	8 dk
<i>%96'lık alkol</i>	2 dk
<i>%80'lik alkol</i>	2 dk
<i>Distile su</i>	10 dk
<i>Weigert hematoksilin</i>	3 dk
<i>Akarsu altında yıkama</i>	4 dk
<i>Distile su</i>	15 sn
<i>Trikrom solüsyonu (Bio-optica)</i>	20 dk
<i>%0.2'lik asetik asit</i>	30 sn
<i>%95'lik alkol</i>	2 dk
<i>%100'lük alkol</i>	2 dk
<i>Ksilol</i>	8 dk
<i>Entellan ile kapatma</i>	

Bir gece önceden 45°C etüvde bırakılan dokulara Pas Boyama tabloda verilen süreçler ile uygulanmıştır.

Tablo 5: PAS boyama prosedürü

<i>Kimyasallar</i>	<i>Süre</i>
<i>Ksilol</i>	6 dk
<i>%100'lük alkol</i>	3 dk
<i>%96'lık alkol</i>	3 dk
<i>Periyodik asit (Merck)</i>	10 dk
<i>Distile su</i>	1 dk
<i>Schiff Solüsyonu (Sigma-Aldrich)</i>	10 dk
<i>Akarsu altında yıkama</i>	5 dk
<i>Distile su</i>	5 dk
<i>Harris' Hematoksilin (Merck)</i>	1 dk
<i>Distile su</i>	1 dk
<i>%96'lık alkol</i>	3 dk
<i>%100'lük alkol</i>	3 dk
<i>Ksilol</i>	5 dk
<i>Entellan ile kapatma</i>	

Histokimyasal boyama sonucu tüm preparatların değerlendirilmesi Nikon Eclipse E100 mikroskopta ve XCAM 1050 microHD High Frame Rate Slow Motion Camera System ile gerçekleştirildi.

3.7. İmmünohistokimya

Gata 4 (Bioss, bs-1778), Yap (Cell signaling, 14074S), β Catenin (Cell signaling, 8480S) antikorlarının immünohistokimyasal boyaması için Polilizinli lamlara alınan kesitler bir gece önceden 55°C'ye ayarlanan etüve bırakıldı. Target Retrieval solüsyon (Dako) ile mikrodalga fırında 7 dk boyunca kaynatılarak 20 dk oda sıcaklığında soğumaya bırakılan kesitlerde Antijenler ortaya çıkarıldı. Dokular sonrasında 5 dakika distile suda bekletilerek boyama Chamberina alındı. Etrafları Pap-pen ile çizildi. Sonrasında Histostain Plus 3rd Gen IHC Detection Kit (Novex) uygulandı.

Tablo 6: İmmünohistokimya prosedürü

1	<i>PBS Solüsyonu ile 5 dk yıkama yapıldı.</i>
2	<i>Solüsyon A (peroxidase quenching sol.) ile 6 dk bekletildi.</i>
3	<i>PBS solüsyonu ile 5 dk yıkama yapıldı.</i>
4	<i>Kesitler üzerine B solüsyonu (Blocking sol.) damlatılarak 30 dk bekletildi.</i>
5	<i>Blok solüsyonunu yıkama yapmadan uzaklaştırıldı ve uygun şekilde dilüsyonu yapılmış primer antikorlar (Gata 4 için 1:300, Yap için 1:200, β catenin için 1:100 PBS için dilüsyon oranları kullanılmıştır) damlatılarak kapalı nemli kutuda +4 °C'de overnight bekletildi.</i>
6	<i>PBS solüsyonu ile iki kez 5 dk yıkama yapıldı.</i>
7	<i>Primer antikor ile uyumlu biyotinlenmiş sekonder antikor (Solüsyon C) damlatılarak, kapalı nemli kutuda 30 dakika oda ısısında bekletildi</i>
8	<i>PBS solüsyonu ile 5 dk yıkama yapıldı.</i>
9	<i>Solüsyon D (streptavidin-peroxidase conjugate) damlatılarak, kapalı nemli kutuda 15 dk oda ısısında bekletildi</i>
10	<i>PBS solüsyonu ile 2 kez 5 dk yıkama yapıldı.</i>
11	<i>1 damla DAB chromogen (Solüsyon E2) 1ml DAB substrate buffer içine (Solüsyon E1) damlatıldı ve karıştırıldı, hazırlanan DAB dokular üzerine damlatılarak renk alana kadar bekletildi (Genel olarak bekleme süresi 1-5 dk olmuştur).</i>
12	<i>Akan çeşme suyu altında 1 dk yıkama yapıldı.</i>
13	<i>Çekirdek boyanması için Mayer'in hematoksileni dokular üzerine damlatılarak 430 sn bekletildi.</i>
14	<i>Akan çeşme suyu altında en az 5 dk boyunca dokular renk alana kadar yıkama yapıldı.</i>
15	<i>Sırasıyla %80, %96 ve %100'lük etil alkolde 2 dakika bekletildi</i>
16	<i>Kesitler 2 kez 5'er dakika ksilende tutulup Entellan ile kapatıldı.</i>

3.8. İstatistiksel Analiz

3.8.1. Fetus Ağırlıkları

Kontrol ve deney gruplarına ait E18.5 fetus ağırlıkları açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olup olmadığını belirlemek için One Way ANOVA testi uygulandı ve $p < 0.05$ olan değerler istatistiksel olarak anlamlı olarak kabul edildi.

3.8.2. İmmünohistokimyasal Değerlendirme

Dokular semikantitatif bir skorlama ile değerlendirildiler; 0: boyanma yok, 1: az boyanma, 2: orta düzeyde boyanma, 3: yoğun boyanma.

Gruplar arasında, immünohistokimyasal boyama ile gösterilmiş olan belirteçler açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olup olmadığını belirlemek için Kruskal-Wallis testi uygulandı ve $p < 0.05$ olan değerler istatistiksel olarak anlamlı olarak kabul edildi.

4.BULGULAR

4.1. Fetus Ağırlıkları

SPSS 21 istatistik programı kullanılarak yapılan One Way ANOVA testi ile sonuçlar için mean \pm standart deviation (ortalama \pm standart sapma) değerleri Tablo 7’de verilmiştir.

Tablo 7: Ağırlık ölçüm sonuçları

Örnekler	Mean \pm standart deviation
NT	1.33 \pm 0.059
DMSO	1.36 \pm 0.058
C ₂ ceramide	1.33 \pm 0.057
Verteporfin	1.20 \pm 0.086

Gruplar arası ağırlık değişimleri incelendiğinde NT grubuna, DMSO grubuna ve seramid grubuna kıyasla Verteporfin grubunda ağırlığın anlamlı olarak azaldığı gözlemlendi (sırasıyla p değerleri; p<0.01, p<0.01 ve p<0.01).

4.2. İmmünohistokimyasal Değerlendirmeler

İmmünohistokimyasal skorlamalar atriyum ve ventrikülde (endokard, myokard, endokard) ayrı ayrı yapılmıştır. Skorlamayı istatistiksel olarak değerlendirmek için Kruskal Wallis testi kullanılmıştır.

4.2.1. Gata-4 Değerlendirme

İmmünohistokimyasal skorlamalar atriyum ve ventrikülde (endokard, myokard, endokard) ayrı ayrı yapılmıştır. Skorlamayı istatistiksel olarak değerlendirmek için Kruskal Wallis testi kullanılmıştır. Atriyum ve ventriküllere ait sonuçlar için median (ortalama)(minimum-maximum) değerleri Tablo 8-11’de verilmiştir.

Tablo 8: Gata-4 atriyum skor sonuçları

Örnekler	Median (min.-max.)
NT	3 (1-3)
DMSO	2 (2-3)
Seramid	3 (2-3)
Verteporfin	1 (1-2)

Tablo 9: Gata-4 ventrikül epikard skor sonuçları

Örnekler	Median (min.-max.)
NT	3 (2-3)
DMSO	3 (2-3)
C ₂ Ceramid	3 (2-3)
Verteporfin	1 (1-2)

Tablo 10: Gata-4 ventrikül myokard skor sonuçları

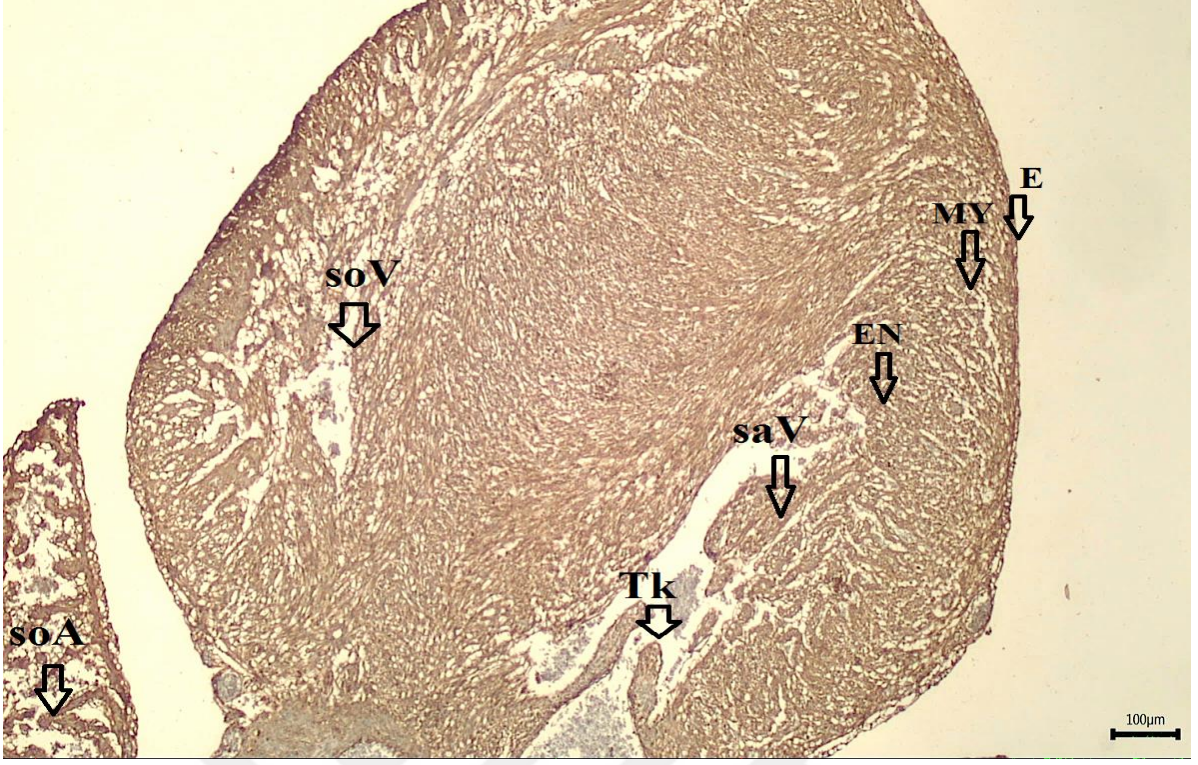
Örnekler	Median (min.-max.)
NT	2 (2-3)
DMSO	1 (1-3)
C ₂ Ceramid	2 (0-3)
Verteporfin	1 (0-1)

Tablo 11: Gata-4 ventrikül endokard skor sonuçları

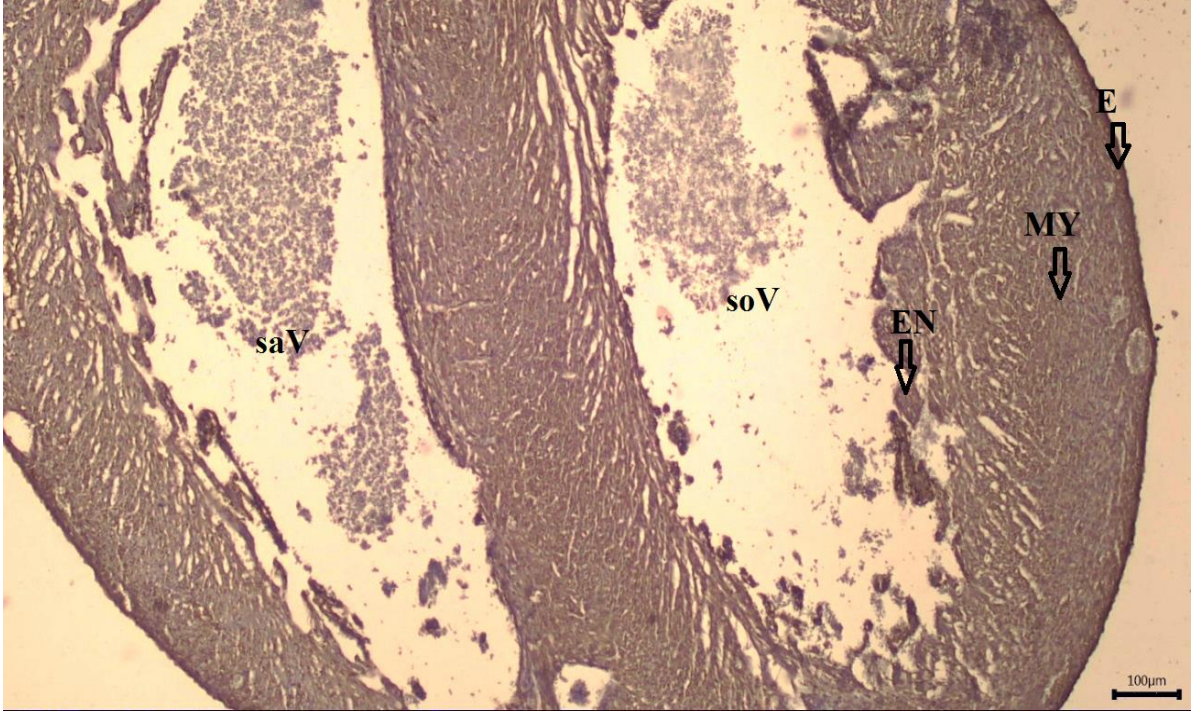
Örnekler	Median (min.-max.)
NT	3 (3-3)
DMSO	2 (2-3)
Seramid	2 (1-3)
Verteporfin	1 (0-1)

İmmunhistokimyasal skorların Kruskal Wallis testi ile analiz edilmesi sonrasında;

- 1) *Atriyum* için gruplar arasında anlamlı bir fark gözlenmiştir (p=0.032)*,
- 2) *Ventrikül epikard* için gruplar arasında anlamlı bir fark gözlenmiştir (p=0.012)*,
- 3) *Ventrikül myokard* için gruplar arasında anlamlı bir fark gözlenmiştir (p=0.039)*,
- 4) *Ventrikül endokard* için gruplar arasında anlamlı bir fark gözlenmiştir (p=0.003)*.



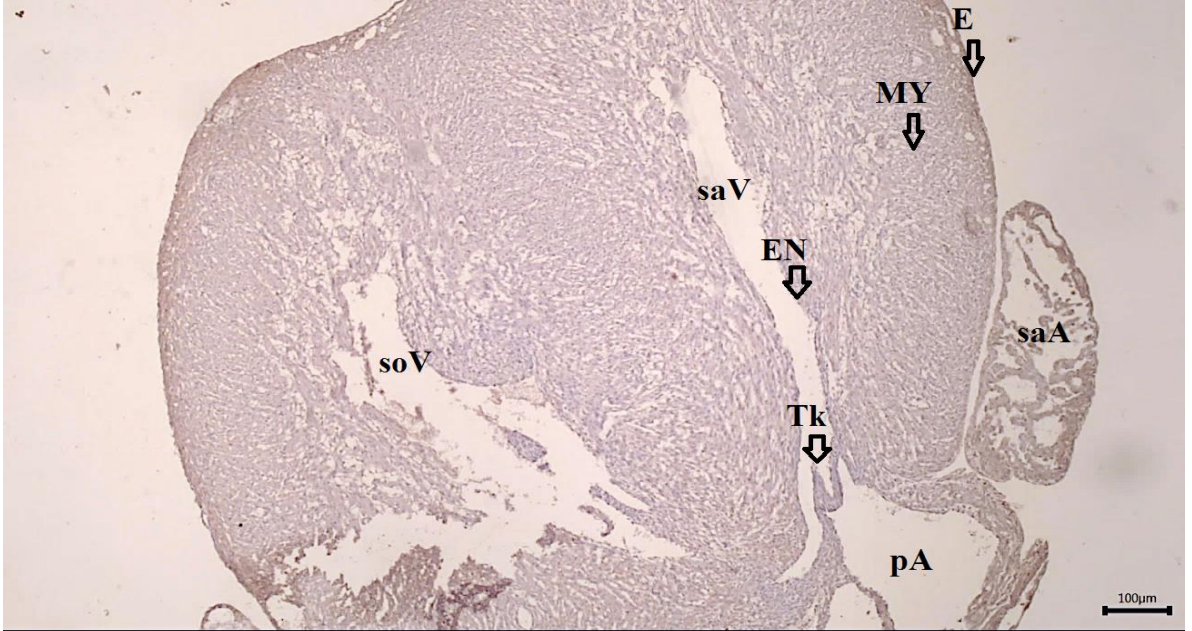
Resim 6: Gata-4, NT grubu, x40 büyütme (soV, sol ventrikül; soA, Sol atriyum; saV, Sağ ventrikül, Tk, Triküspit kapak; EN, Endokardiyum; MY, Miyokardiyum; E, Epikard)



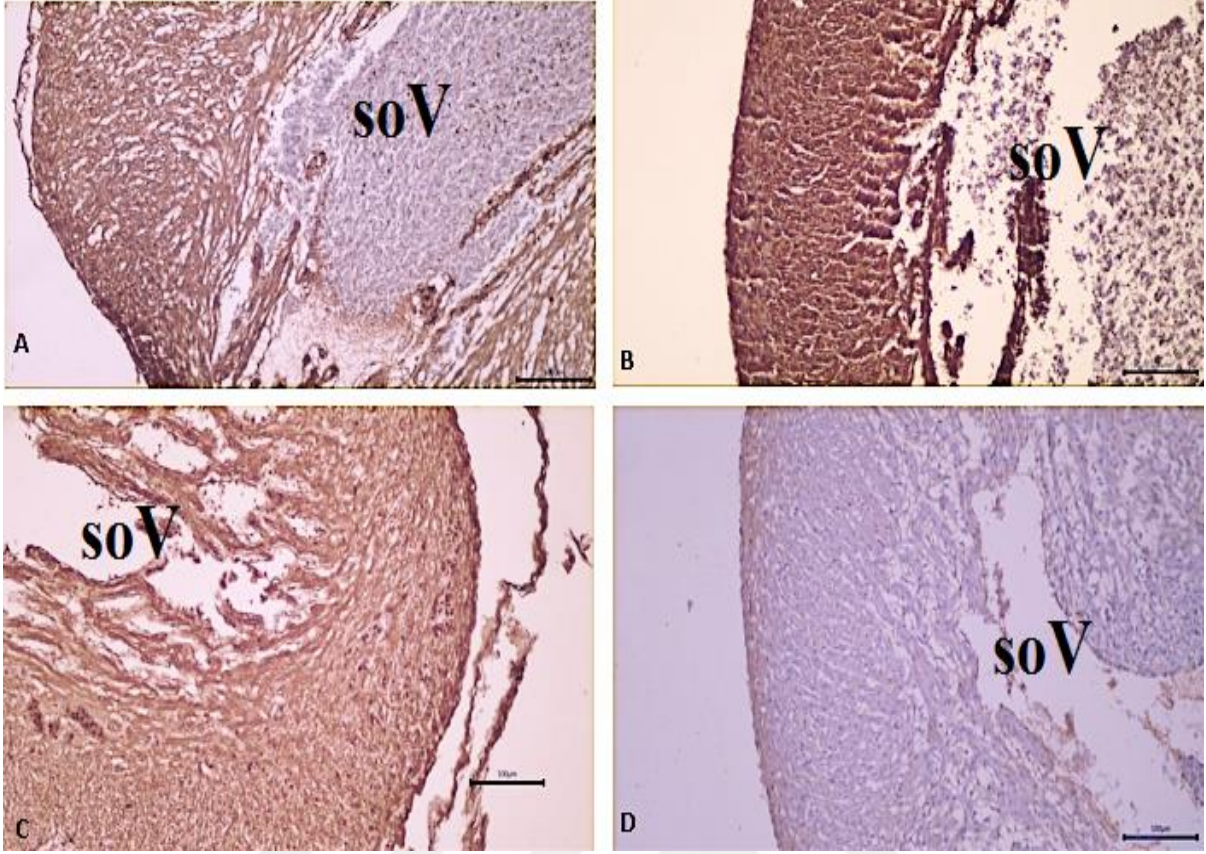
Resim 7: Gata-4, DMSO grubu, x40 büyütme (soV, sol ventrikül; saV; Sağ ventrikül; EN, Endokardiyum; MY, Miyokardiyum; E, Epikard)



Resim 8: Gata-4, C2 Ceramide grubu, x40 büyütme (soV, sol ventrikül; saV; Sağ ventrikül; EN, Endokardiyum; MY, Miyokardiyum; E, Epikard)



Resim 9: Gata-4, Verteporfin grubu, x40 büyütme (soV, sol ventrikül; saA, Sağ atriyum; saV, Sağ ventrikül, Tk, Triküspit kapak; EN, Endokardiyum; MY, Miyokardiyum; E, Epikard; pA, Pulmoner Arter)



Resim 10: Gata-4, x100 büyütme. (A, NT Grubu; B, DMSO Grubu; C, Ceramide grubu; D, Verteporfin Grubu) (soV, Sol Ventrikül)

4.2.2. β -Catenin değerlendirme

İmmunhistokimyasal skorlamalar atriyum ve ventrikülde (endokard, myokard, endokard) ayrı ayrı yapılmıştır. Skorlamayı istatistiksel olarak değerlendirmek için Kruskal Wallis testi kullanılmıştır. Atriyum ve ventriküllere ait sonuçlar için median (ortalama)(minimum-maximum) değerleri Tablo 12-15'te verilmiştir.

Tablo 12: β -catenin atriyum skor sonuçları

Örnekler	Median (min.-max.)
NT	1 (0-2)
DMSO	1 (1-3)
C ₂ Ceramide	2 (1-3)
Verteporfin	1 (0-2)

Tablo 13: β -catenin ventrikül epikard skor sonuçları

Örnekler	Median (min.-max.)
NT	1 (1-3)
DMSO	2 (0-3)
C ₂ Ceramide	3 (2-3)
Verteporfin	1 (0-2)

Tablo 14: β -catenin ventrikül myokard skor sonuçları

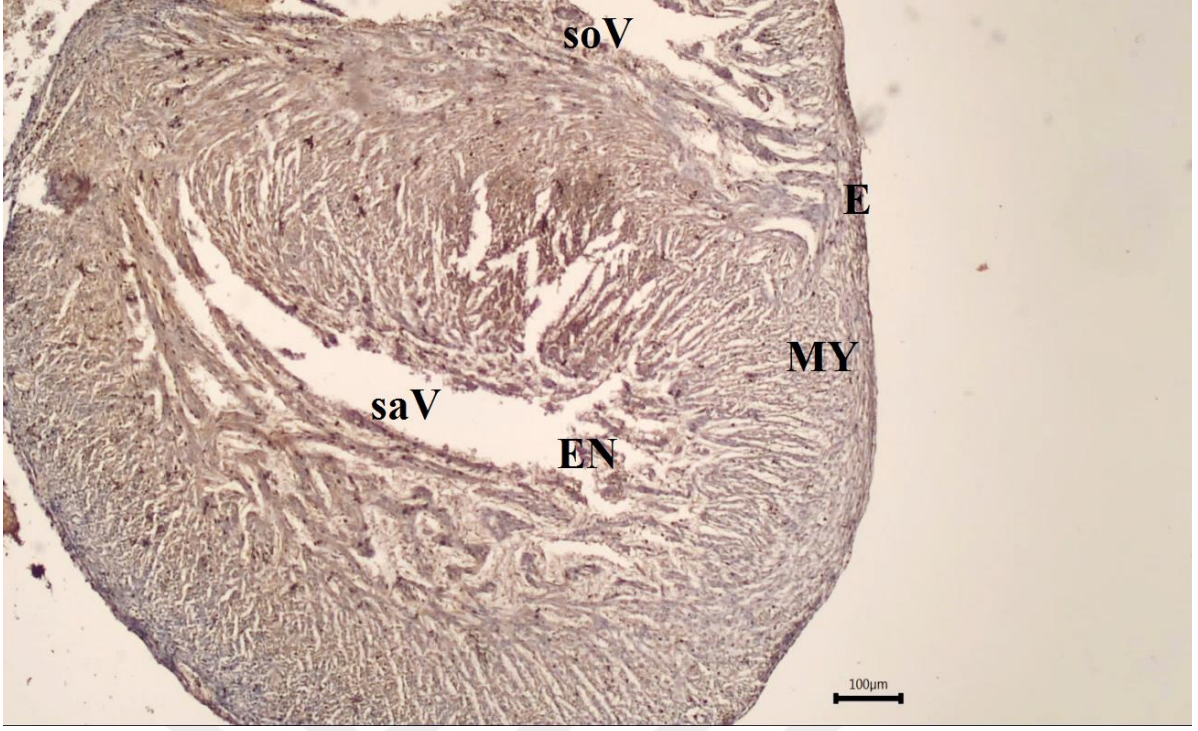
Örnekler	Median (min.-max.)
NT	1 (0-2)
DMSO	1 (0-2)
C ₂ Ceramide	1 (1-2)
Verteporfin	0 (0-0)

Tablo 15: β -catenin ventrikül endokard skor sonuçları

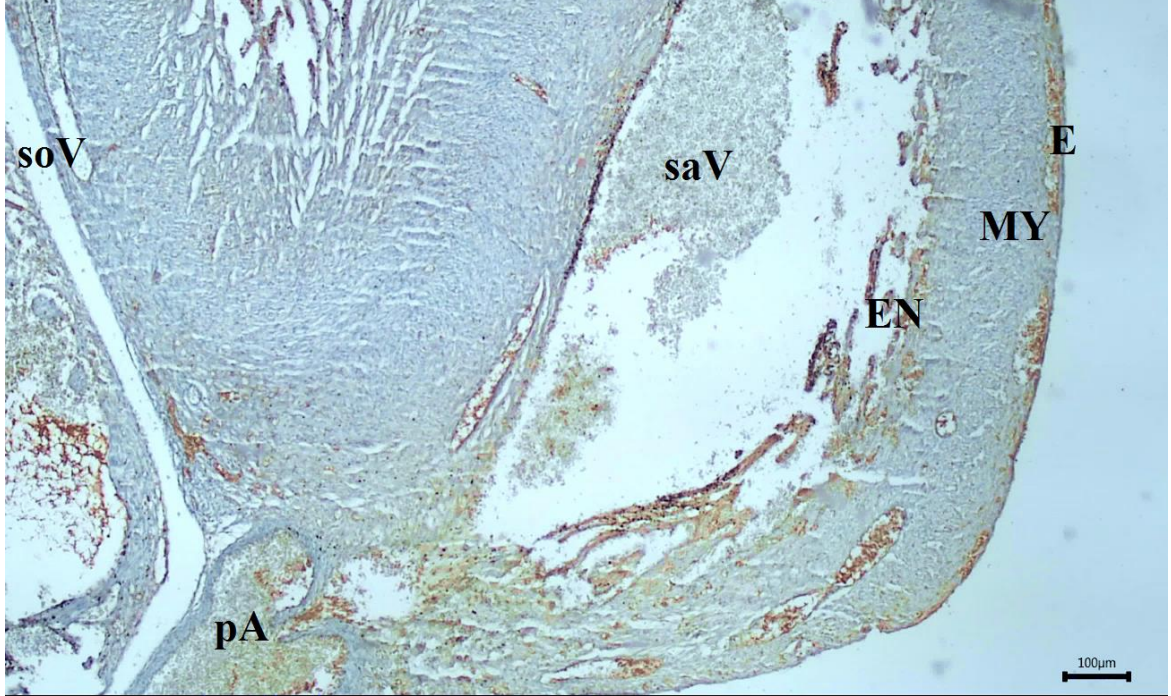
Örnekler	Median (min.-max.)
NT	1 (1-2)
DMSO	1 (0-2)
C ₂ Ceramide	2 (1-3)
Verteporfin	0 (0-1)

İmmunhistokimyasal skorların Kruskal Wallis testi ile analiz edilmesi sonrasında;

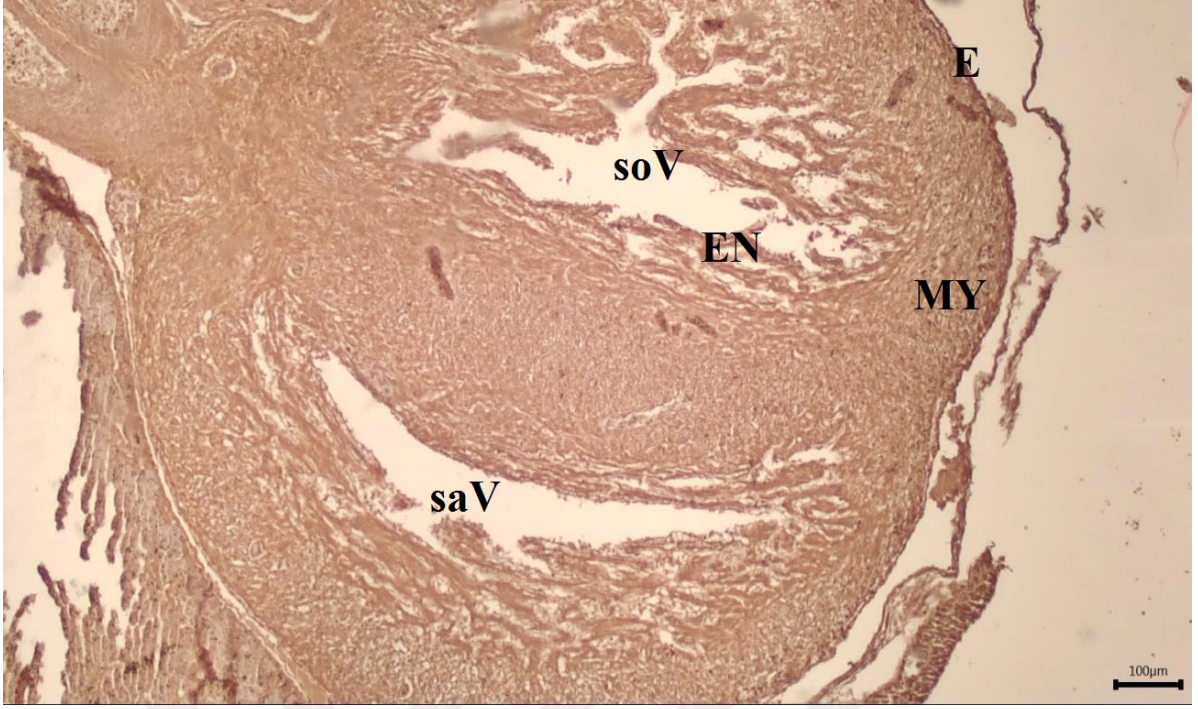
- 1) *Atriyum* için gruplar arasında anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($p=0.115$),
- 2) *Ventrikül epikard* için gruplar arasında anlamlı bir fark gözlenmiştir ($p=0.031$)*,
- 3) *Ventrikül myokard* için gruplar arasında anlamlı bir fark gözlenmiştir ($p=0.044$)*,
- 4) *Ventrikül endokard* için gruplar arasında anlamlı bir fark gözlenmiştir ($p=0.009$)*.



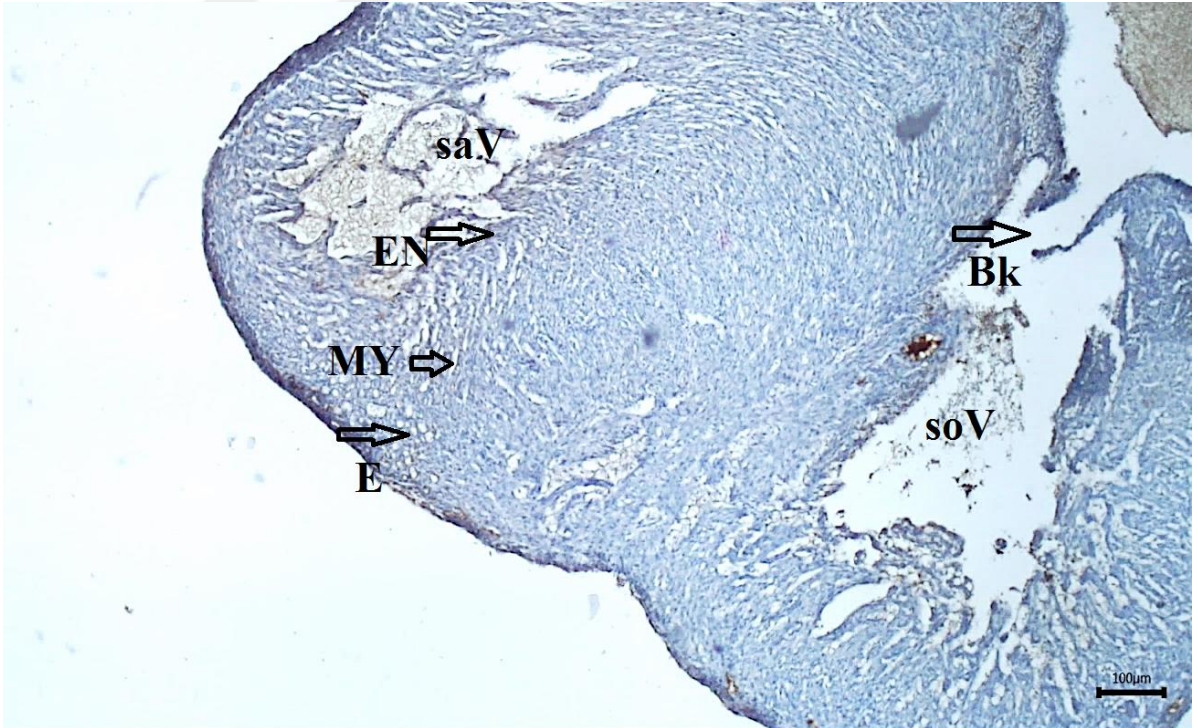
Resim 11: β -Catenin, NT grubu, x40 büyütme (soV, sol ventrikül; saV; Sağ ventrikül; EN, Endokardiyum; MY, Miyokardiyum; E, Epikard)



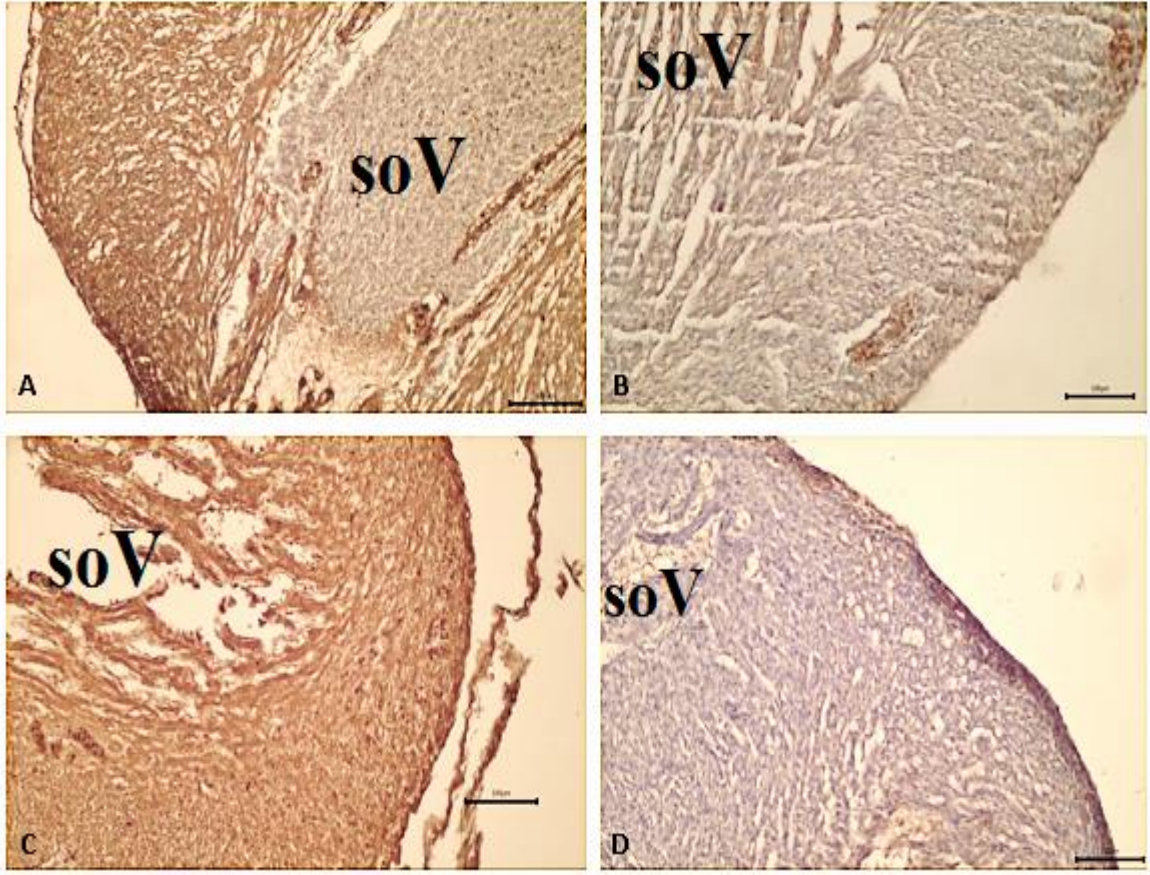
Resim 12: β -Catenin, DMSO grubu, x40 büyütme (soV, sol ventrikül; saV; Sağ ventrikül; EN, Endokardiyum; MY, Miyokardiyum; E, Epikard; pA, Pulmoner Arter)



Resim 13: β -Catenin, C2 Ceramide, ihc boyama, x40 büyütme (soV, sol ventrikül; saV; Sağ ventrikül; EN, Endokardiyum; MY, Miyokardiyum; E, Epikard)



Resim 14: β -Catenin, Verteporfin grubu, ihc boyama, x40 büyütme (soV, sol ventrikül; saV; Sağ ventrikül; EN, Endokardiyum; MY, Miyokardiyum; E, Epikard; Bk, Biküspit kapak)



Resim 15: β -catenin, ihc boyama, x100 büyütme. (A, NT Grubu; B, DMSO Grubu; C, Ceramide grubu; D, Verteporfin Grubu) (soV, Sol Vntrikül)

4.2.3. YAP Değerlendirme

İmmunohistokimyasal skorlamalar atriyum ve ventrikülde (endokard, myokard, endokard) ayrı ayrı yapılmıştır. Skorlamayı istatistiksel olarak değerlendirmek için Kruskal Wallis testi kullanılmıştır. Atriyum ve ventriküllere ait sonuçlar için median (ortalama)(minimum-maximum) değerleri Tablo 16-19'da verilmiştir.

Tablo 16: YAP atriyum skor sonuçları

Örnekler	Median (min.-max.)
NT	2 (2-3)
DMSO	2 (1-2)
C ₂ Ceramid	1 (1-2)
Verteporfin	0 (0-1)

Tablo 17: YAP ventrikül epikard skor sonuçları

Örnekler	Median (min.-max.)
NT	2 (2-3)
DMSO	2 (2-3)
C ₂ Ceramid	1 (0-2)
Verteporfin	0 (0-1)

Tablo 18: YAP ventrikül myokard skor sonuçları

Örnekler	Median (min.-max.)
NT	1 (0-3)
DMSO	0 (0-2)
C ₂ Ceramid	1 (0-2)
Verteporfin	0 (0-0)

Tablo 19: YAP ventrikül endokard skor sonuçları

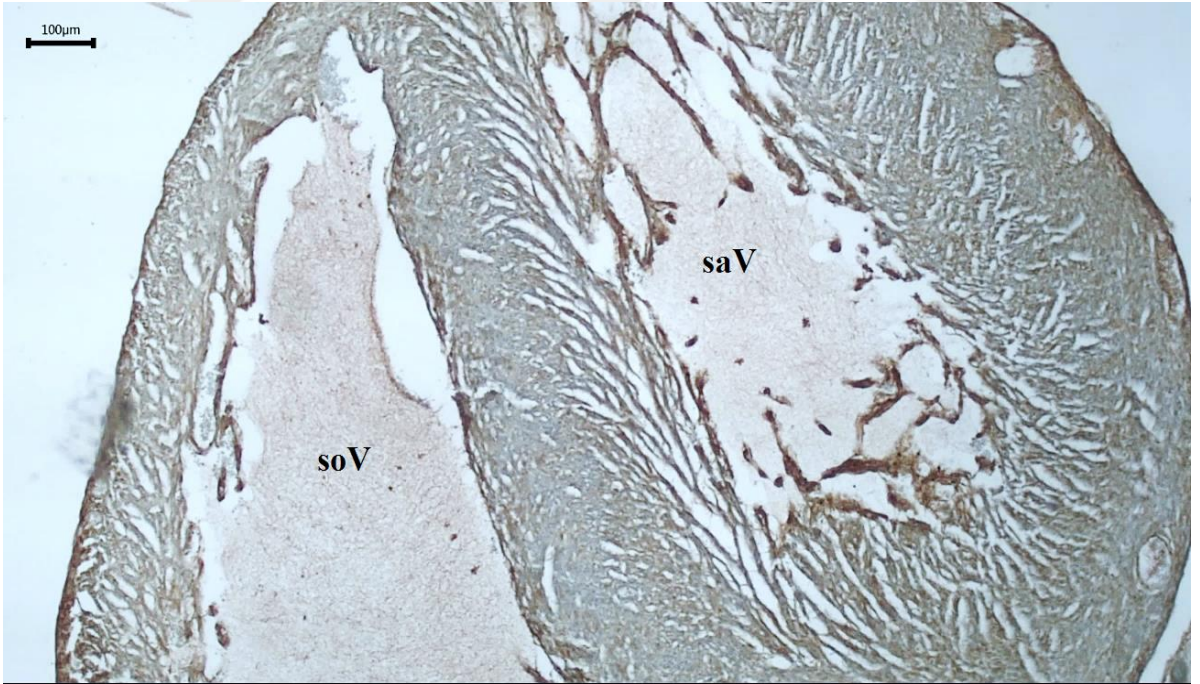
Örnekler	Median (min.-max.)
NT	2 (2-3)
DMSO	2 (1-3)
C ₂ Ceramid	2 (1-2)
Verteporfin	0 (0-0)

İmmunhistokimyasal skorların Kruskal Wallis testi ile analiz edilmesi sonrasında;

- 1) *Atriyum* için gruplar arasında anlamlı bir fark gözlenmiştir (p=0.003)*,
- 2) *Ventrikül epikard* için gruplar arasında anlamlı bir fark gözlenmiştir (p=0.003)*,
- 3) *Ventrikül myokard* için gruplar arasında anlamlı bir fark gözlenmemiştir (p=0.155),
- 4) *Ventrikül endokard* için gruplar arasında anlamlı bir fark gözlenmiştir (p=0.004)*.



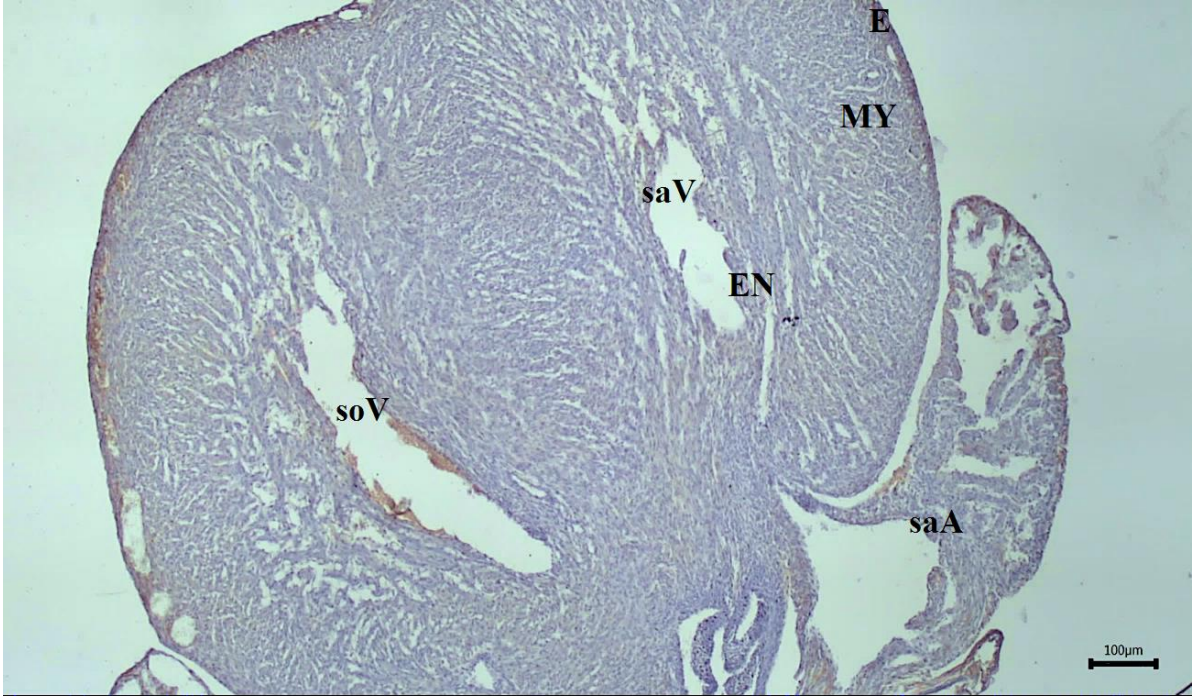
Resim 16: YAP, NT grubu, x40 büyütme (saV; Sağ ventrikül; saA, Sağ atriyum; EN, Endokardiyum; MY, Miyokardiyum; E, Epikard; Tk, triküs pit kapak)



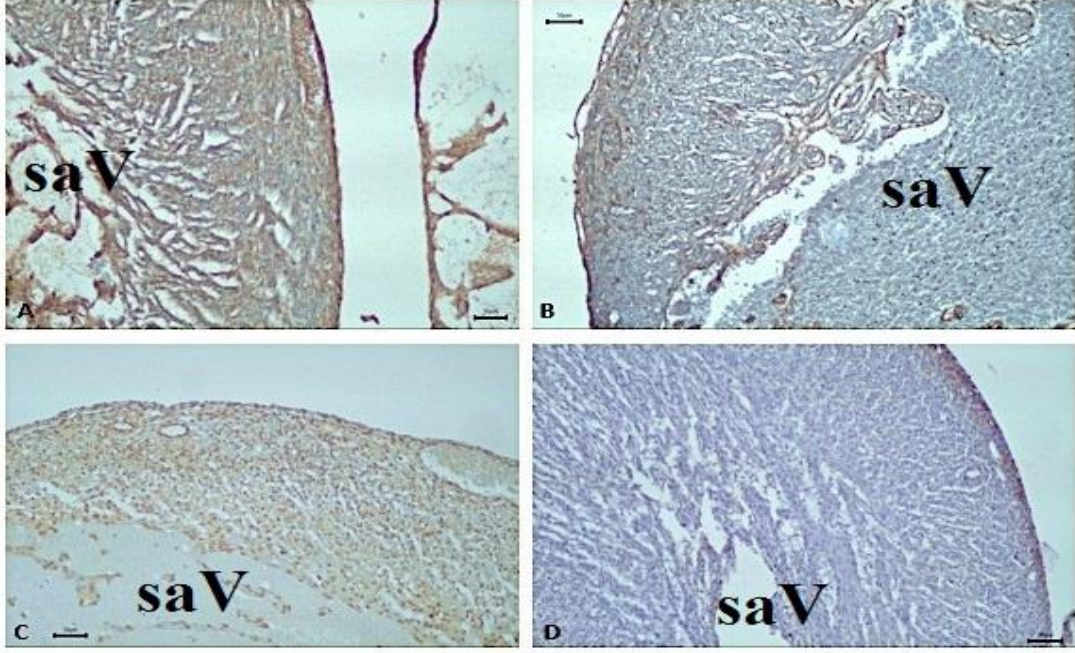
Resim 17: YAP, DMSO grubu, x40 büyütme (soV, sol ventrikül; saV, sağ ventrikül)



Resim 18: YAP, C2 Ceramide grubu, x40 büyütme (saV; Sağ ventrikül; EN, Endokardiyum; MY, Miyokardiyum; E, Epikard)



Resim 19: YAP, Verteporfin grubu, x40 büyütme (saV; Sağ ventrikül; saA, sağ atriyum; soV, sol ventrikül; EN, Endokardiyum; MY, Miyokardiyum; E, Epikard)

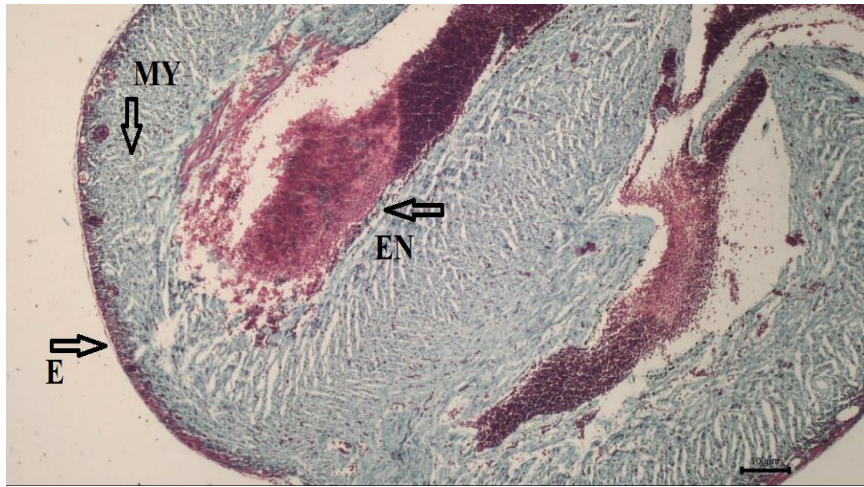


Resim 20: YAP, x100 büyütme. (A, NT Grubu; B, DMSO Grubu; C, Ceramide grubu; D, Verteporfin Grubu) (saV, Sağ ventrikül)

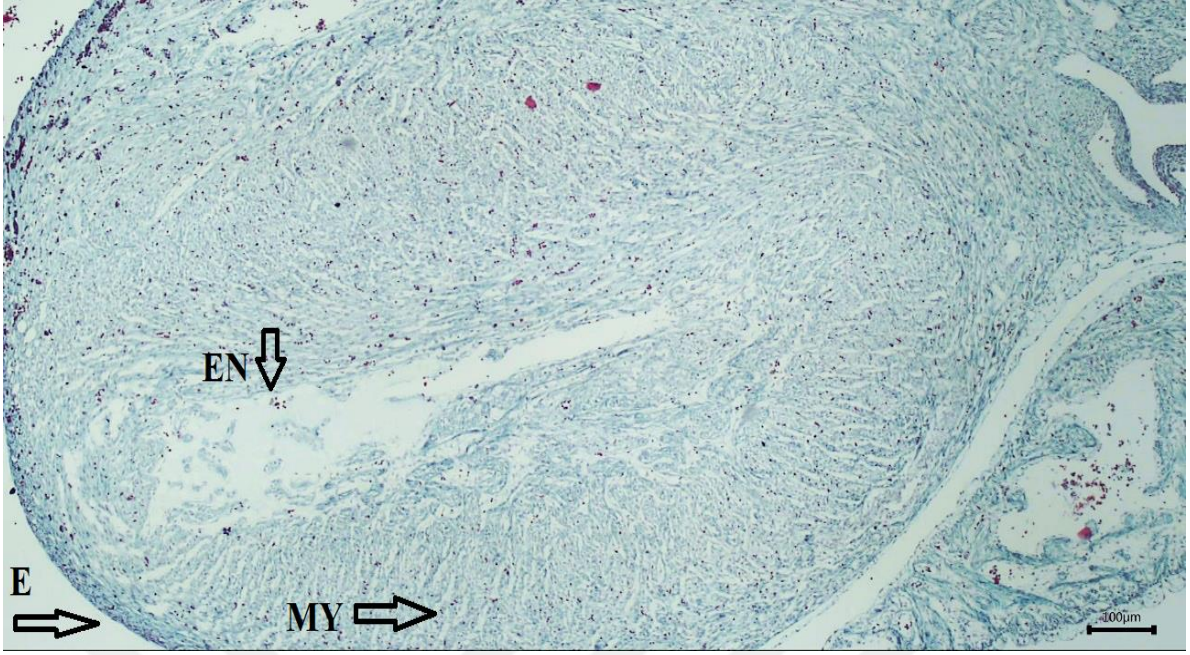
4.3. Histokimyasal Boyamaların Değerlendirilmesi

4.3.1. Trikrom Boyamanın Değerlendirilmesi

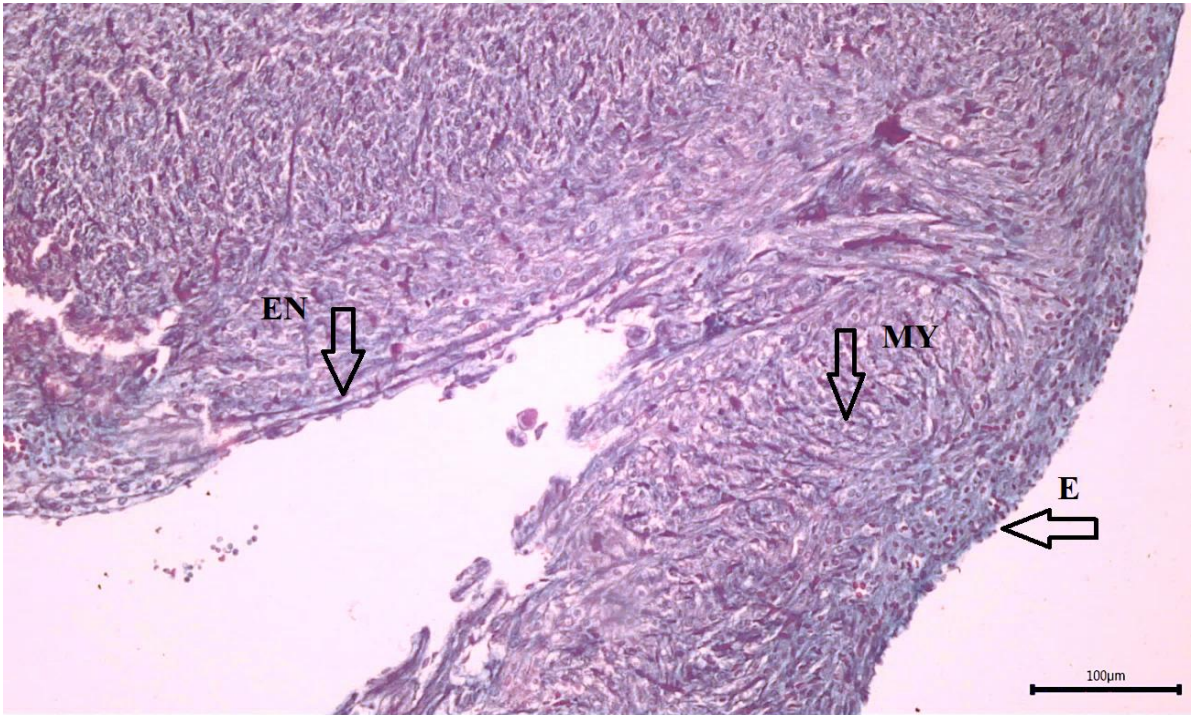
Trikrom boyama ile kalp dokusunun genel yapısına bakılmıştır, özellikle Ceramide ve Verteporfin grubunda farklılık gözlemlenmiştir. Verteporfin gruplarında epikard çok zayıf boyanırken, ceramide gruplarında yoğun bir boyama görülmüştür.



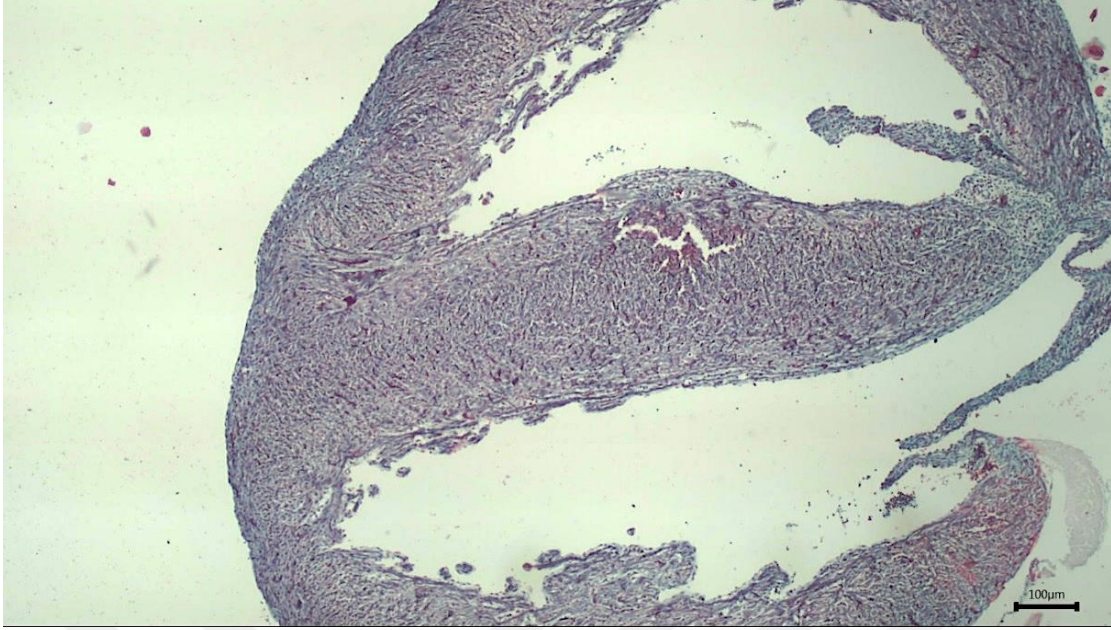
Resim 21: Trikrom boyama, NT grubu, x40 büyütme (E, Epikard; MY, Miyokard; EN, Endokard)



Resim 22: Trikrom boyama, Verteporfin grubu, x40 büyütme (E, Epikard; MY, Miyokard; EN, Endokard)



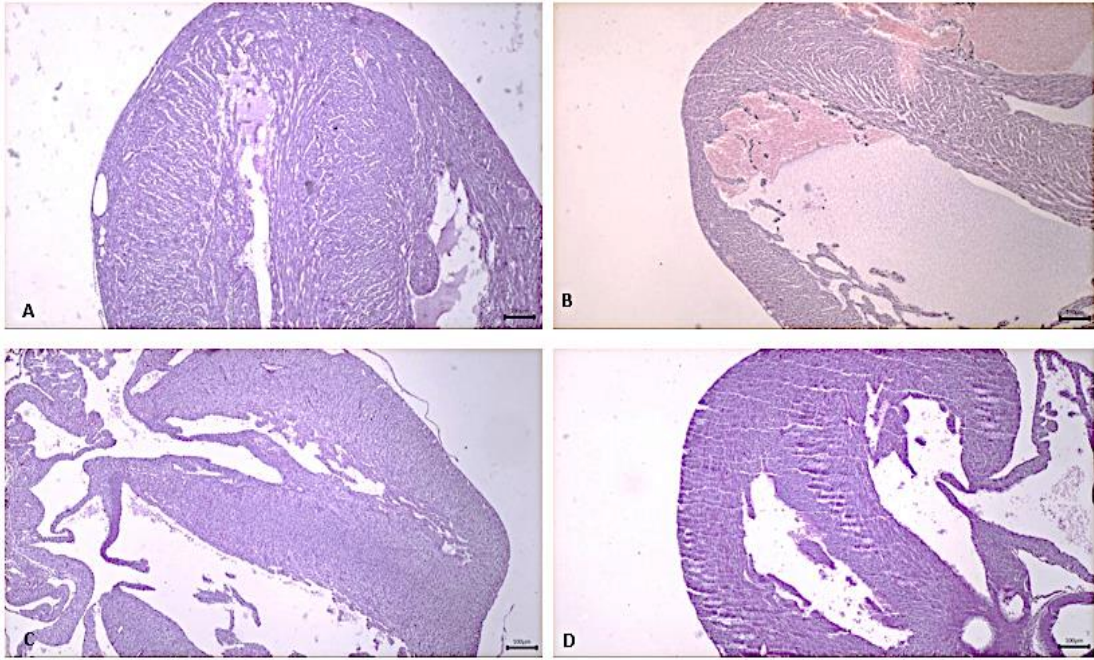
Resim 23: Trikrom boyama, C2 Ceramide Grubu, x100 (E, Epikard; MY, Miyokard; EN, Endokard)



Resim 24: Trikróm boyama, C2 Ceramide grubu, x40 büyütme

4.3.2. PAS Boyamanın Değerlendirmesi

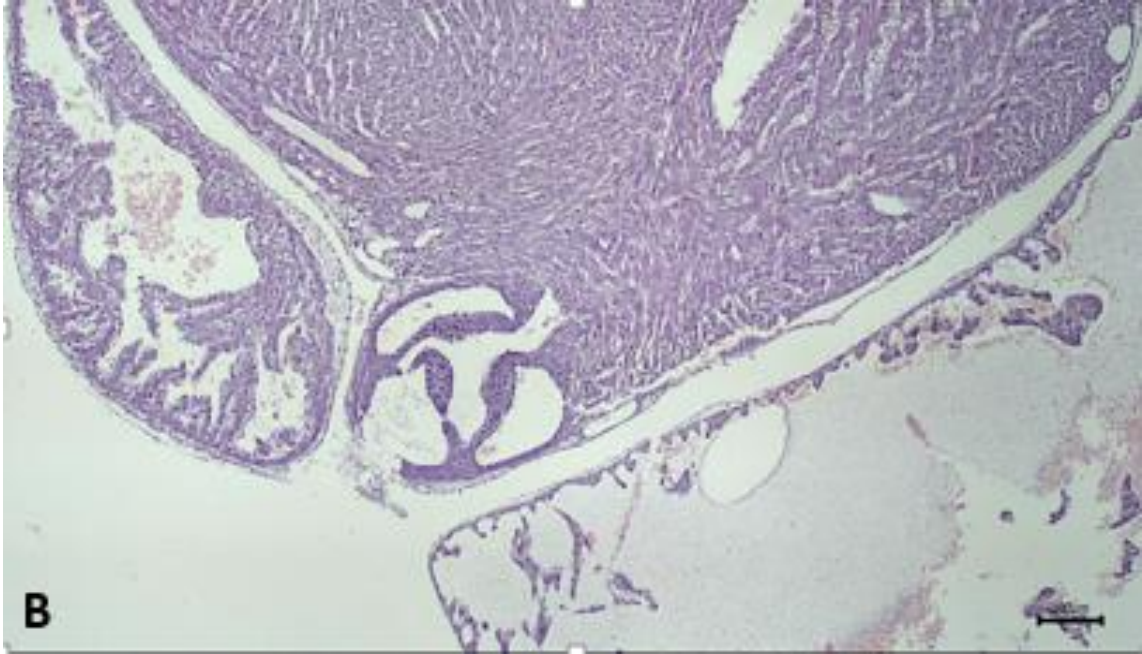
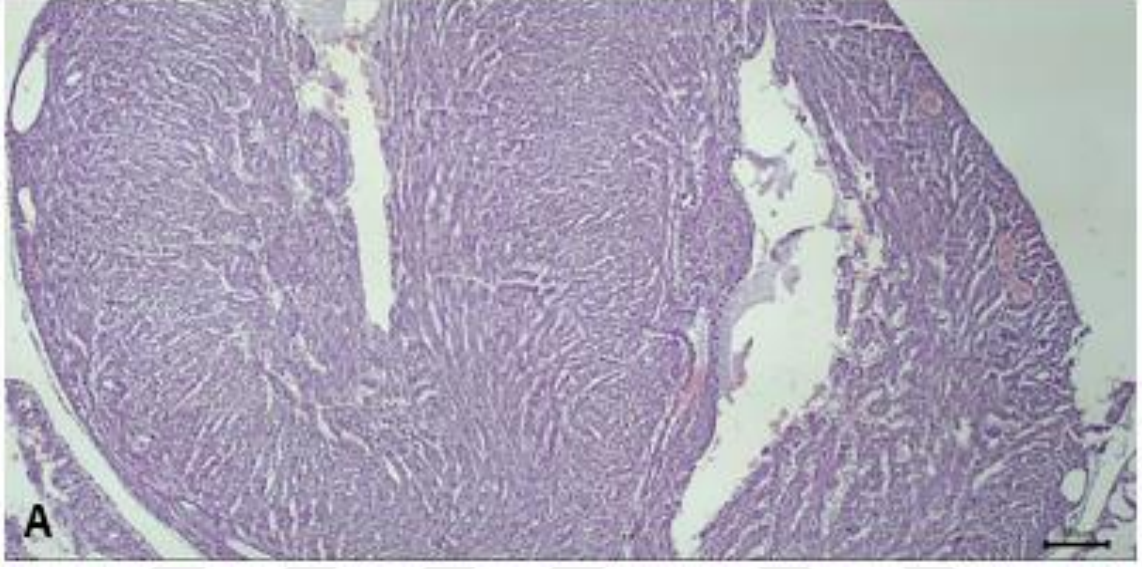
Pas boyama sonucunda ise verteporfin gruplarında boyama şiddeti biraz daha fazla gözlemlenmiştir.



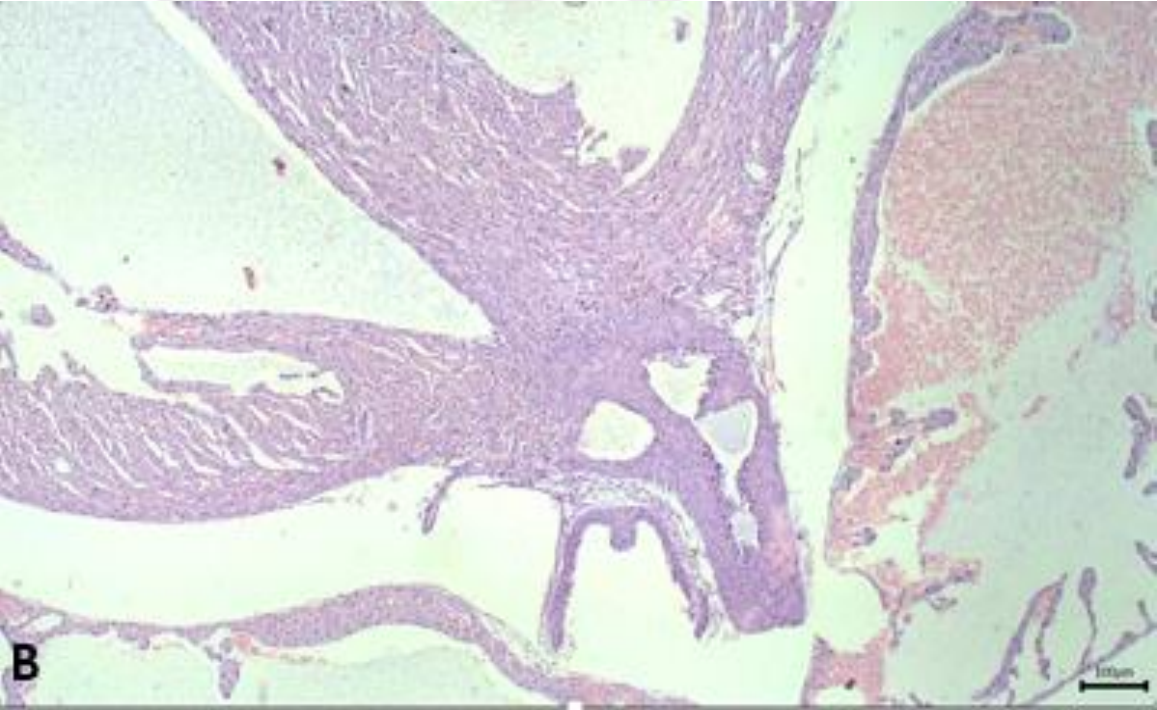
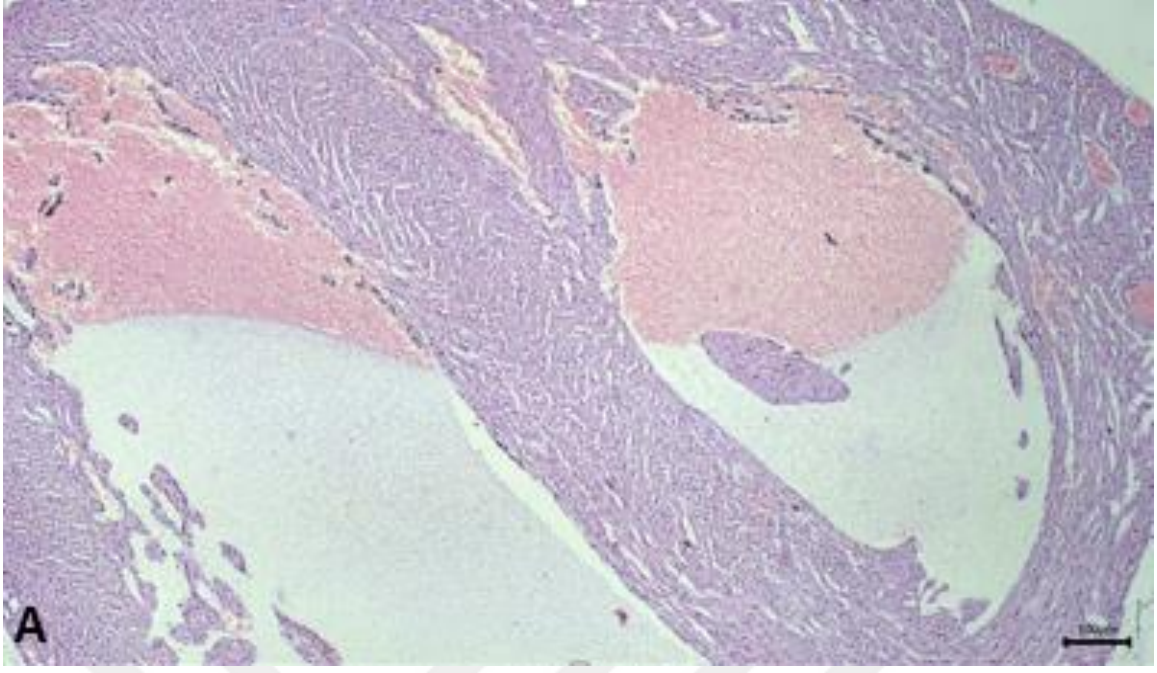
Resim 25: Pas boyama, x40 büyütme (A, NT Grubu; B, DMSO Grubu; C, Ceramide grubu; D, Verteporfin Grubu).

4.3.3. Hematoksilen-Eozin Değerlendirilmesi

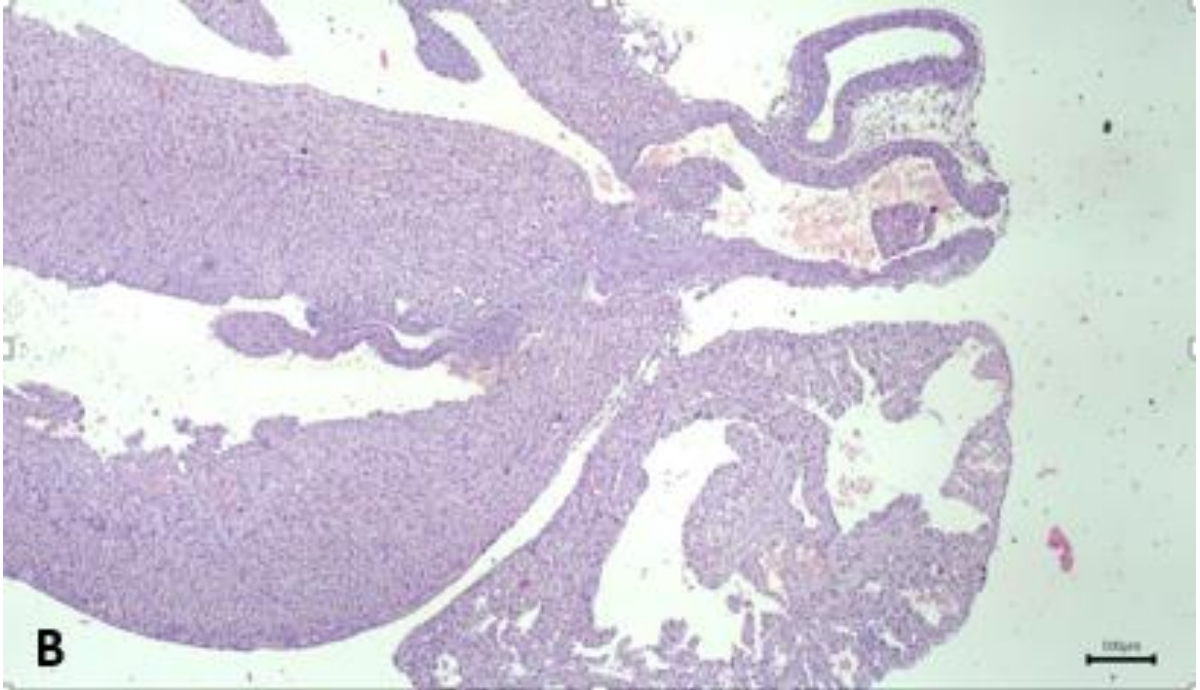
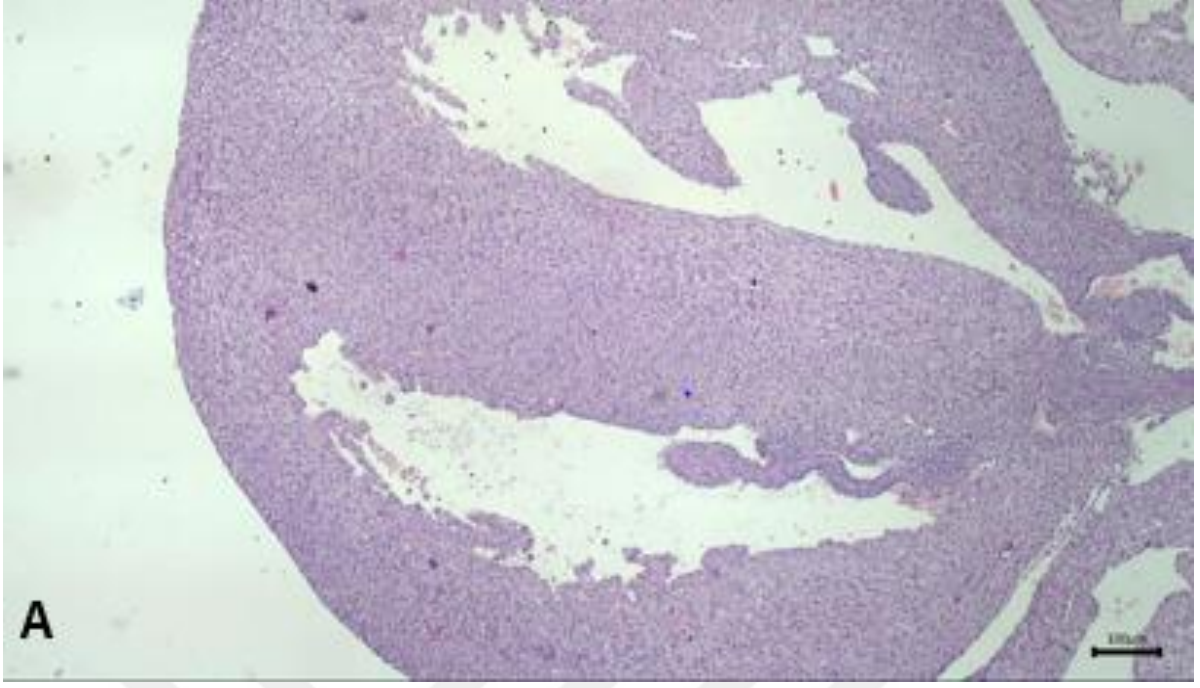
Hematoksilen-Eozin boyama ile morfolojik değerlendirme yapılmıştır. Sonucunda tüm gruplar arası ventriküller ve atriyumlar olağan görülmüştür. Epikard miyokard ve endokard olağandır. C₂ ceramide gruplarında fibriller dallanmalarda azalma görülmüştür.



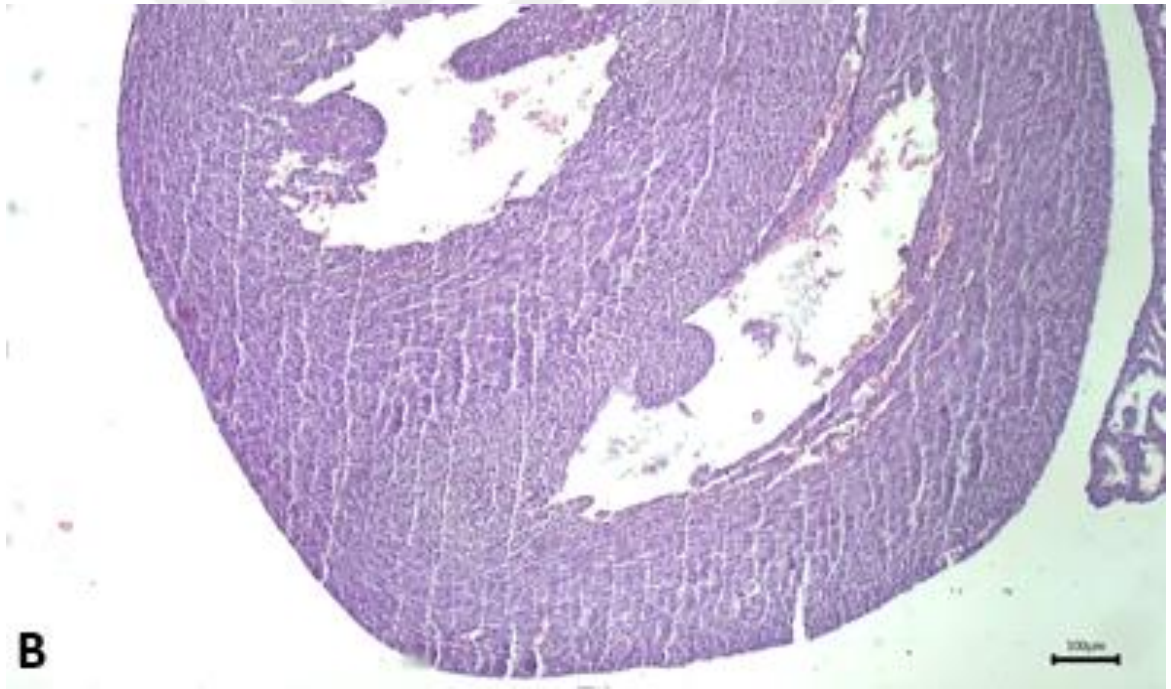
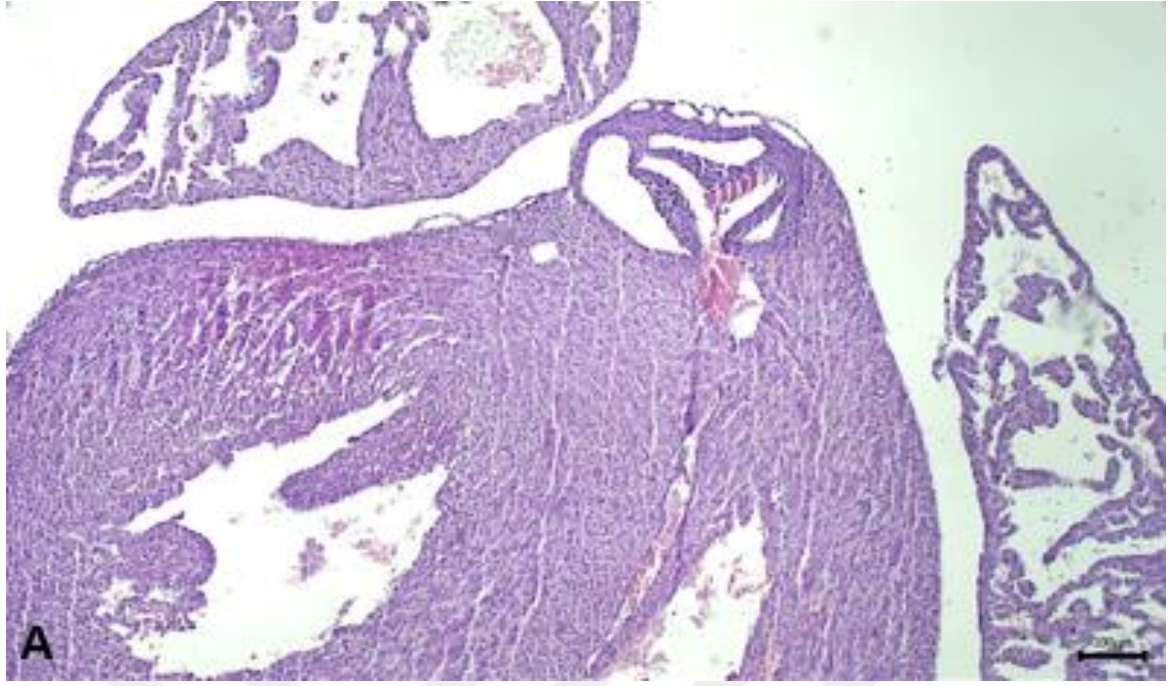
Resim 26: NT Grubu, HE Boyama, x40 büyütme



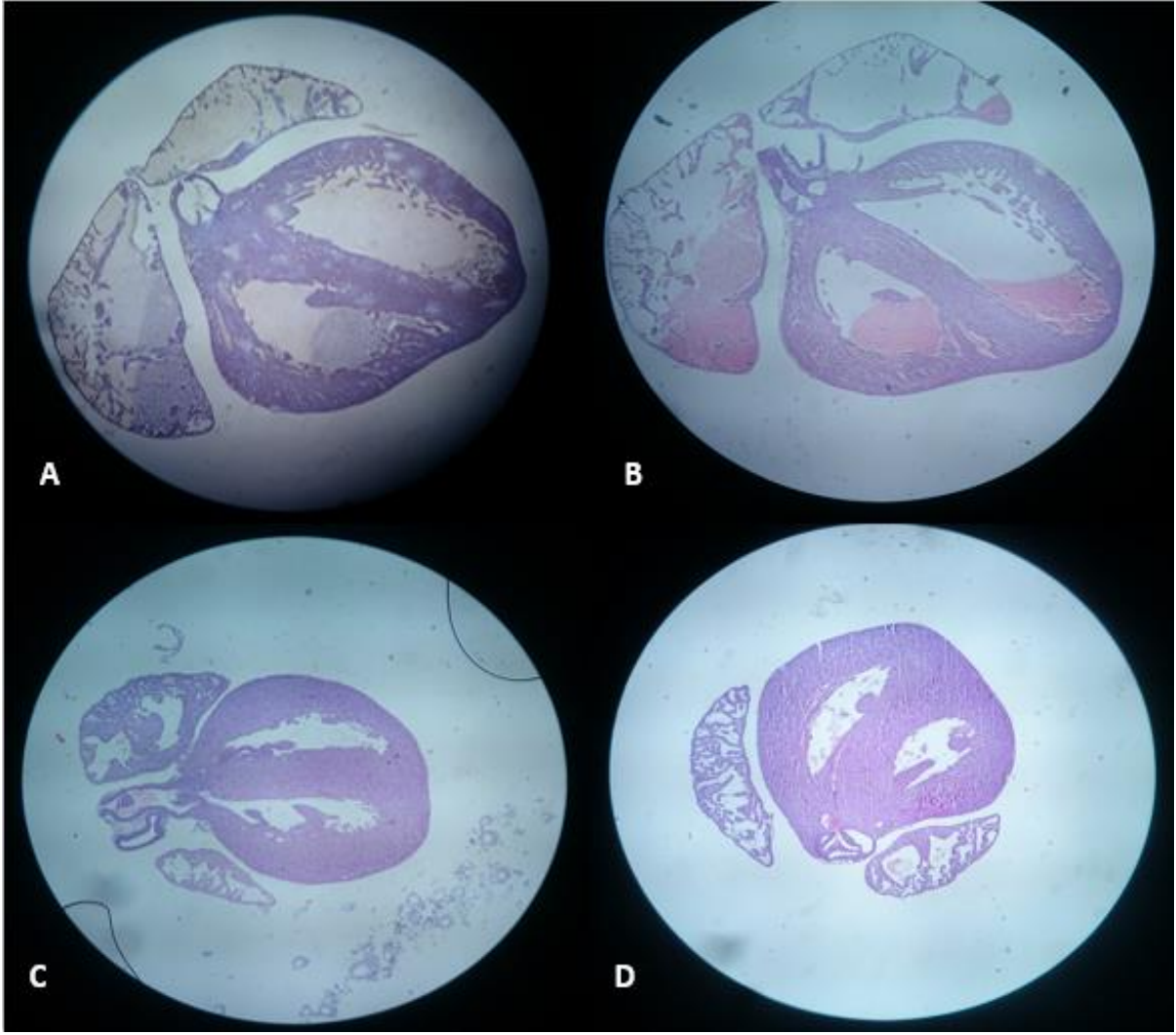
Resim 27: DMSO grubu, HE boyama, x40 büyütme



Resim 28: C2 Ceramide grubu, HE boyama, x40 büyütme



Resim 29: Verteporfin Grubu, HE Boyama, x40 büyütme



Resim 30: Tüm gruplar arası (A, NT; B, DMSO; C, C2 Ceramide; D, Verteporfin) genel görünüş, HE, objektiften dijital büyütme

5. TARTIŞMA

20. yüzyıl boyunca, kardiyak gelişim sırasında ortaya çıkan olaylarla ilgili bilgi, çelişkili tanımlamalarla ifade edilmekteydi. Elde edilen tüm bilgilerin temelini embriyonik materyalin doğrudan incelenmesi veya konjenital olarak hatalı biçimlendirilmiş kalbin yapısından yapılan çıkarımlarla desteklenen yorumlar oluşturmaktaydı. Bu süreçler kalp oluşumu sırasında ortaya çıkan kardiyak malformasyonların morfogenezinin analizine yardımcı olmuş olsa da özellikle son on yılda kalp gelişiminin moleküler mekanizması önem kazanmıştır (Moorman ve ark, 2003). Kalp, erken gastrulasyon sırasında oluşan iki bilateral kalp bölgesinden gelişmektedir. Son yıllarda ise kardiyak mezodermi belirleyen sinyal yolları ortaya çıkmış ve kapsamlı bir şekilde analiz edilmiştir. Buna ek olarak, kardiyak morfogenezin ve sitodiferansiyonun farklı yönlerini düzenleyen bir dizi transkripsiyon faktörü de model organizmalarda tanımlanmış ve karakterize edilmiştir. Kalp gelişiminin genetik kontrolünün karmaşıklığını anlamak önem arz etmektedir. Yaklaşık 100 canlı doğan infantın 1 tanesinde konjenital kalp malformasyonu görülmekte ve ölümcül konjenital malformasyon insidansının da % 5-10 arasında değiştiği tahmin edilmektedir (Hoffman, 1995). Dolayısıyla, moleküler düzeyde kalp gelişimini anlamak uzun vadede de konjenital malformasyonların klinik yönetimi üzerinde etkili ve alternatif tedaviler için yardımcı olabilecektir (Band, 2003).

Hippo yolağı, hücre çoğalmasını inhibe ederek ve apoptozu teşvik ederek, kök/progenitor hücrelerin kaderlerini düzenleyen ve bazı durumlarda hücre boyutunu sınırlayan, organ boyut kontrolünde gelişimsel bir rol oynayan bir sinyal kaskadıdır (Meng ve ark, 2016).

Drosophila ile çalışan araştırmacılar drosophilada fenotipik olarak başın orantısız aşırı büyümesiyle karakterize edilen bir dizi mutanti hippo sinyal yolağında tanımladılar. Bu mutasyonların organın normal boyutuna ulaştığında durmayan anormal hızlı hücresel çoğalmanın yanısıra apoptoz ile hücresel çıkarmadaki eksikliğe neden olduğunu da bulmuşlardır. Böylece hem hücre çoğalmasının durdurulması hem de apoptozun teşvik edilmesi Hippo yolağının temeli olmuştur (Pan, 2010).

Yaptığımız çalışmada Verteporfin kullanarak YAP-TEAD etkileşimini bozarak hippo sinyal yolağının aktivasyonunu sağlayıp TEAD aracılı transkripsiyonun

inhibisyonunu sağladı. Wang ve ark. (2016)'na göre, Verteporfin YAP'ın 14-3-3 protein aracılı sitoplazmik tutulumuna ve bozunmasına neden olmaktadır. İmmünohistokimya sonuçlarımıza göre Verteporfin grubunda YAP belirteci önemli ölçüde azalmıştır. Riberio ve ark. (2010)'na göre dSTRIPAK PP2A kompleksi ise MST kinazın fosforilasyonu tersine çevirerek defosforilasyonu sağlamaktadır. Böylece YAP nükleusa girerek hedef genlerin ifadesine izin vermektedir. C2 Ceramide aracılığı ile de PP2A aktivasyonu sağlayarak Hippo yolağının inaktivasyonunu ve böylece YAP hedef genlerin ifadesi artmaktaydı. Bununla uyumlu olarak Hippo yolağında C2 Ceramide grubuna baktığımızda YAP ifadesinde bir artış olduğunu immünohistokimya sonuçları neticesinde gözlemledik.

Verteporfin grubuna baktığımızda diğer gruplar ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak fetal ağırlık düşük çıkmıştır. Bu durum YAP'ın organ boyutunda ki rolü ile uyumlu olmaktadır. Zanconato ve ark. (2015)'na göre YAP/TAZ'ın DNA'ya bağlandığı TEAD faktörleri, TEAD ve AP-1 motiflerini barındıran bileşik cis düzenleyici elementlerde kromatin ile aktivatör protein-1 birlikte bağlanmaktadır. YAP/TAZ/TEAD ve AP-1, doğrudan S-faz girişinin ve mitozun kontrolünde yer alan hedef genleri sinerjistik olarak aktive eden bir kompleks oluşturarak onkogenik büyümeninde dahil olduğu proliferasyonu sağlamaktadır. Zhao ve ark. (2007)'na göre YAP aynı zamanda Cyclin E ile etkileşerek hücre siklusundada görev almaktadır. Çalışmamızda YAP ifadesini baskılanması bazı doku ve organların YAP aracılı hücre sikluslarında ki aksaklıklara neden olarak proliferasyonda azalma ve neticesinde düşük doğum ağırlığına sebep olmuş olabilir. Yine gözlemsel olarak baktığımızda YAP ifadesinin baskılandığı kalp dokuları diğer gruplar ile kıyaslandığında daha küçük görülmüştür.

Ceramide grubunda diğer gruplara oranla anlamlı fark çıkmaması p53 gibi tümör baskılayıcı bir düzenleyicinin etkileşimi ile olduğu varsayılabilir. Genom bütünlüğünün sağlanmasında merkezi rolü ve arızalı genomları barındıran hücrelerin ortadan kaldırılması bakımından p53 genomun koruyucusudur. Birkaç yıl önce ise Hippo yolağının kilit bir bileşeni olan LATS2'nin, mitotik hasara ve onkogen aktivasyona yanıt olarak p53'ün stabilizasyonuna ve aktivasyonuna katkıda bulunduğu keşfedilmiştir (Aylon ve Oren, 2016). Bu yüzden p53 aracılı stabilite ceramide gruplarında verilen dozunda çok düşük miktarda olması nedeniyle LATS aracılığıyla sağlanmış olabilir.

Araştırmalar bu yolağın kardiomyosit çoğalması ve kalp büyüklüğünün düzenlenmesinde de önemli bir rol oynadığını göstermektedir. Hippo yolağının

inaktivasyonu veya onun aşağı akış efektörünün aktivasyonunun (YAP) kardiyak rejenerasyonu geliştirdiği belirtilmiştir. Buna ek olarak, YAP'ın birçok transkripsiyonel mekanizma yoluyla kardiyomiyosit kaderini düzenlediği gösterilmiştir (Zhou ve ark, 2015).

Çinko-parmak transkripsiyon faktörleri olan GATA ailesi kalp oluşumunda önemli bir gen ailesi olmaktadır. *Drosophila*'da, kardiyogenezin ortaya çıkması için tek bir GATA geni olan *Pannier* gereklidir (Gajewski ve diğerleri, 1999). *Pannier* kardiyak kimlik geni olarak işlev görmektedir. Zorlu ekspresyonu dorsal mezodermin diğer türevlerinin kardiyak hücre kaderleri ile sonuçlanmaktadır. Memelilerde de GATA-4, kalpte ifade edilmektedir. GATA-4'ten yoksun fare embriyolarında bilateral kalp tüpleri (*cardia bifida*) ve azaltılmış sayıda kardiyak miyosit bulunur (Kuo ve ark, 1997). Yine GATA-4, gelişmekte olan fare kardiyak hücrelerinde eksprese edilen en erken transkripsiyon faktörlerinden birisidir. Spesifik olarak GATA-4, prekardiyak mezoderimde, kalp borusunun oluşumu ve bükülmesi sırasında endokard ve miyokarda ifade edilir. Hayat boyuncada kalp miyositlerinde bol miktarda GATA-4 ekspresyonu devam eder (Heikinheimo ve ark, 1994). İmmünohistokimya sonuçlarına göre çalışmamızda Verteporfin ile YAP inhibisyonu sağladığımız gruplarda hem ventriküllerde hem atriyumlarda GATA-4 ifadesinin de azaldığını gözlemledik. Bu durumda YAP ve GATA-4 arasında bir etkileşim olduğunu düşündük. Pagliari ve ark (2014)'na göre YAP/TAZ, kardiyak progenitor hücrelerinin gelişimsel kaderine katılırlar ve gen susturma ile inhibisyonları kardiyak ve endotelial nesil arasında anahtar rol oynamaktadır. YAP/TAZ proteini ile GATA-4, Tbx-5 gibi kardiyak-spesifik transkripsiyon faktörleri arasındaki etkileşim meydana gelebilir. Bu bağlanma, kompleksin kardiyak progenitor hücrelerin spesifik yanıtları tetiklemesine neden olmaktadır. Bu açıdan sonuçlarımızın ile bu çalışma uyumlu olabileceğini düşündük. Yine çalışmamızdaki Ceramide uygulayarak YAP ifadesinin arttırıldığı grupta Verteporfin sonuçlarına zıt olarak yüksek GATA-4 ifadesi gösterilmiştir. Grepin ve ark (1997)'na göre aşırı artmış GATA-4 ifadesi embriyonik kök hücrelerde kardiyak farklılaşmaya neden olmaktadır.

Kalp, birincil kalp bölgesi (FHF) ve ikincil kalp alanı (SHF) olarak adlandırılan iki farklı mezoderm bölgesinden kaynaklanmaktadır. Daha sonra iki bölge basit kardiyak tüpü oluşturmak için orta hatta göç ederek birleşir. SHF öncülleri, sağ ventrikül ve atriyumun yanı sıra giriş yollarının oluşumunda büyüyen ve septasyona uğrayan kalbede katkıda bulunurlar. Moleküler seviyede, FHF ve SHF öncülleri arasındaki ayrımlar tam olarak

anlaşılammamıştır Bununla birlikte, son veriler SHF progenitörlerin diferansiyasyonu ve proliferasyonunda Wnt/ β -katenin sinyalizasyonunun rolüne işaret etmektedir. Wnt/ β -katenin yolağının kardiyak gelişimindeki aktivitesi, birkaç LEF/TCF transgenik hattın kullanılması sonucu keşfedildi. Özellikle perikarda aktivite gözlemlenmesine rağmen, endokardiyal yastıklar, komşu kardiyak mezoderm ve gelişmekte olan ventriküler miyokarda az bir aktivitede gözlenmiştir (Kelly ve ark, 2001). Bu bilgiler doğrultusunda biz de tüm deney gruplarımızda β -katenin ifadesini gözlemledik. Verteporfin grubunda YAP'ın baskılanması ve sitozolde tutulması sonucu ise β -katenin ifadesinde azaldığını gözlemlerken Ceramide gruplarında β -katenin ifadesinin arttığını gözlemledik. Bu sonuçlar bize Hippo sinyali ve Wnt sinyalizasyonu arasında ki muhtemel etkileşimi göstermiştir. Hyun Woo Park ve ark (2015)'a göre meme epitel hücre hattının Wnt3a ile uyarılarak β -katenin sinyalini uyarması hem TAZ hem de β -katenin ifadesini arttırmaktadır. Yine Wnt5a veya Wnt3a'nın çeşitli kültür hücrelerine uygulanması veya L hücreleri (Wnt3a'nın stabil şekilde ekspresyonu sağlanan hücreler) defosforile edilmiş YAP/TAZ birikimine neden olmaktadır. Heallen ve ark (2011)'ının yaptığı çalışmada gelişmekte olan kalpte Salvador geni susturulması sonrası yükselmiş Wnt/ β -katenin sinyali ile birlikte kardiyomegali sergilenmiştir. β -kateninin heterozigot silinmesi sonucunda ise kardiyomiyosit çoğalması ve kalp boyutu sınırlanmıştır. YAP aktivitesi kardiyak organ boyutunu kontrol ederken Wnt/ β -katenin yolunun gerekli olduğu böylece gösterilmiştir. Bizim çalışmamızla uyumlu olarak ceramide grubunda arttırdığımız YAP/TAZ ifadesi β -katenin ifadesini de arttırmıştır. Park ve ark (2015)'na göre fosforile YAP/TAZ in vivo ve in vitro olarak Wnt/ β -katenin sinyalizasyonunu inhibe etmektedir. Bu inhibisyon sitozolik YAP/TAZ tarafından Dvl2 veya β -katenin bağlanması ve baskılanması yoluyla sağlanmaktadır. Verteporfin grubunda sitozolik YAP'ın artması olası β -katenin tutulumuna neden olarak yıkım kompleksinin aktivasyonu sağlayarak β -kateninin düzeyini azaltmış olabileceğini düşünmekteyiz. Azzolin ve ark (2012)'na göre YAP/TAZ ve Wnt/ β -katenin tarafından yönetilen biyolojik süreçler arasındaki örtüşme bulunmaktadır ve bu faktörlerin birbirlerinin faaliyetlerini etkileyebileceği düşünülmektedir. Fosforile β -katenin, TAZ'ın β -TrCP'ye sunum faktörü olarak görev yaparak TAZ bozunmasını teşvik etmektedir. Aynı mekanizma muhtemelen YAP'ın da β -katenin ile ilişkili olmasına ve bozunmasına neden olmaktadır.

Heallen ve ark (2012) MST1/2 ve Lats1/2 genlerini susturdıkları fare modellerinde miyokardiyum kalınlığında ve kalp boyutunda değişiklik görmüşlerdir. Çalışmamızda miyokardiyum kalınlığını ve kalp boyutlarını değerlendirmemiş olmamıza

karşın trikrom boyama sonucu gruplar arasında epikard kalınlığında bir değişim olabileceğini göstermektedir. Von Gise ve ark (2012) alışmasında ise Hippo yolağının kardiyomiyosit çoğalmasının düzenlenmesindeki fonksiyonu, aktif YAPf koşullu transgenik (cTG) farelerin embriyolarında gözlemlenen dramatik miyokard aşırı büyümesi ve kardiyomegali oluşumu ile desteklenmiştir. Özellikle sürekli YAP ifadesi fetal kalplerdeki trabeküler miyokarda özellikle ventriküllerde neredeyse tamamen kapanma ile sonuçlanmaktadır. Kardiyomiyosit çoğalması genellikle farklılaşmaya bağlıdır. Trabeküler ve kompakt kardiyomiyositlerin farklı gen ifade programları vardır. Trabeküler miyokarda ifade edilen ve trabelkler miyokard işaretçisi Nppa (natriüretik peptit A) dır. Aktif YAP transgenik farelerde Nppa düzeyide aşırı artmıştır; bu yükselmiş ifade Nppa'nın YAP tarafından regüle edildiğini ve kardiyomiyosit çoğalmasının, bozulmuş Nppa ifadesi ile ilişkili olduğunu düşündürmektedir. Ceramide gruplarında ise indklediğimiz YAP ekspresyonu kardiyomiyopatiye sonrası artmış kollajen miktarına neden olmuş olabilir. Marijianowski ve ark (1995) e göre miyopatilerde intramyokardiyal fibrillerde artış gözükmektedir.

PAS boyaması ise bilindiği gibi glikojen, glikoprotein ve msin gibi mukopolisakkaritleri göstermek için kullanılmaktadır. Hüresel enerji stresi bozulması ise metabolik hastalıklara neden olmaktadır. Bilindiği üzere kalp en çok enerjiye ihtiyaç duyan organlardan biridir. Çalışmamızda Verteporfin grubunda PAS boyamasını diğer gruplara göre daha yoğun bulunması YAP'ın glikoz metabolizmasında rolü olduğunu dşndrtmştr. Wang ve ark (2015)'a göre YAP glikoz metabolizmasında yer alan genlerin de düzenleyicisidir ve YAP'ın sürekli ifade edilmesi GLUT3 sentezini arttırmaktadır. Böylece hücrede glikolizis meydana gelmektedir. Glikoz ve glikojen miktarlarını ölçmemiş olmamıza karşın Verteporfin gruplarında YAP aktivasyonunu baskılamamız muhtemel enerji metabolizmasının azalmasına, glikoz birikimine ve bunun artmış PAS boyanma yoğunluğuna neden olduğunu düşündük.

İlerleyen çalışmalarda terapotik ajanların direkt hedefli olarak seçilmesi, birden fazla kalp spesifik gene bakılması ve PCR gibi yöntemlerle gen düzeylerinin hesaplanması Hippo yolağının kalp üzerinde değerlendirilmesine daha çok açıklık getirip daha çok fikir sunacaktır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada kalp gelişimi sırasında Hippo yolağı sinyalinin etkisine bakmayı amaçladık. Yaptığımız çalışmanın sonunda Hippo yolağı aktivatörü ve inhibitörü kullandığımız gruplarda anlamlı farklılıklar saptandı. Verteporfin ile Hippo yolağı efektörü olan YAP'ın baskılandığı fetüs gruplarının ağırlıklarında anlamlı bir düşüş meydana gelmiştir. Hippo sinyal yolağı doku büyümesindeki rolü ile bilinmektedir ve YAP'ın baskılanması neticesinde bu sonuçların ortaya çıkmıştır. İmmünohistokimyasal değerlendirmede ise özellikle kalp dokusunda ifade edilen GATA-4 geninin ifadesinin kontrol grubuna oranla aktivatör grupta azaldığını, inhibitör grupta ise arttığını gözlemledik. Bu gibi genlerin ifadesi üzerinde Hippo sinyalizasyonunun etkisinin olması, kalp gelişimi veya kardiyak miyopatilerde Hippo sinyalizasyonunda terapötik bir hedef olmasının sağlanması yeni tedavilerin oluşturulmasının kapısını açacaktır. Ayrıca gruplar arası β -katenin seviyesinin farklı olması, kalp dokusunun gelişiminde Wnt ve Hippo sinyalleri arası etkileşiminin bir rolü olduğunu göstermektedir. Belirtildiği gibi Hippo sinyalizasyonu birden çok mekanizma ile kontrol edilmektedir ve oldukça karmaşık bir ağa sahiptir. Bu nedenle ilerleyen çalışmalarda sinyali kontrol eden birden çok mekanizmanın hedef odaklı olması ayrıca kalbe spesifik farklı genlerin seçilerek sinyal yolağı ile ilişkili olarak bunların düzeylerinin belirtilmesi daha doğru bir yaklaşım olacaktır. Her iki sinyal yolağının etkisinin birbirine nasıl olduğunun belirlenip açıklığa kavuşturulması da önem arz etmektedir. Bu yüzden genetik çerçeveye sahip çalışmalar bu gibi mekanizmaların aydınlatılmasında daha büyük rol oynamaktadır. Aynı zamanda çalışma sırasında erken dönem embriolarımızın deneyde başarısız olup değerlendirilememesi yine çalışmamızda bir takım eksikliklere neden olarak kalp gelişimin etkisini tam olarak değerlendirmemizde negatif bir etken olmuştur. Başka çalışmalarda erken dönem kalp gelişimlerinin de değerlendirilmesi anahtar rol oynayacaktır.

KAYNAKLAR

- Altınok B.** Akut myeloid lösemide wnt sinyal yolağındaki genlerin DNA mikroarray analizi ile tanımlanması. Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü. Doktora Tezi.2011
- Aoki K, Taketo MM.** Adenomatous Polyposis Coli (APC): a multi- functional tumor suppressor gene, *J Cell Sci* 2007, 120(19), 3327-3335.
- Arıncı K, Elhan A.** Anatomi. Dolaşım sistemi içinde. 5.Baskı Ankara:Güneş Kitabevi, 2014.
- Aylon Y, Oren M.** The Hippo Pathway, p53 and Cholesterol. *Cell cycle* 2016, 15(17): 2248–2255.
- Azzolin L, Zanconato F, Bresolin S, Forcato M, Basso G, Biciato S, Cordenonsi M, Piccolo S.** Role of TAZ as mediator of Wnt signaling. *Cell* 2012, 151:1443-1456.
- Bae SJ, Kim M, Kim SH, Kwon YE, Lee JH, Kim J, Chung CH, Lee WJ, Seol JH.** NEDD4 controls intestinal stem cell homeostasis by regulating the Hippo signalling pathway. *Nat Commun* 2015, 6: 6314.
- Band T.** Heart development: molecular insights into cardiac specification and early morphogenesis. *Developmental Biology* 2203, 258 (2003) 1–19
- Barry ER, Morikawa T, Butler BL, Shrestha K, de la Rosa R, Yan KS, Fuchs CS, Magness ST, Smits R, Ogino S, et al.** Restriction of intestinal stem cell expansion and the regenerative response by YAP. *Nature* 2013, 493: 106–110.
- Benjamin Kloese, James A. DiNardo and Simon C. Body.** Cardiac Embryology and Molecular Mechanisms of Congenital Heart Disease – A Primer for Anesthesiologists. *Anesth Analg.* 2016 September; 123(3): 551–569.
- Bennett FC, Harvey KF.** Fat cadherin modulates organ size in *Drosophila* via the Salvador/Warts/Hippo signaling pathway. *Curr Biol* 2006, 16:2101–2110.
- Black BL, Olson EN.** Transcriptional control of muscle development by myocyte enhancer factor-2 (MEF2) proteins. *Annu Rev Cell Dev Biol.*1998, 14:167-96.

Boggiano JC, Vanderzalm PJ, Fehon RG. Tao-1 phosphorylates Hippo/MST kinases to regulate the Hippo-Salvador- Warts tumor suppressor pathway. *Dev Cell* 2011, 21: 888–895.

Brembeck FH, Rosario M, Birchmeier W. Balancing cell adhesion and Wnt signaling the key role of β -catenin. *Curr Opin Genet Dev* 2006, 16;51-59.

Brocardo M, Henderson BR. APC shuttling to the membrane, nucleus and beyond, *Trends Cell Biol* 2006, 18(12), 587-596.

Buckingham M, Meilhac S, Zaffran S. Building the mammalian heart from two sources of myocardial cells. *Nat Rev Genet* 2005, Nov;6(11):826-35.

Buvall L, Rashmi P, Lopez-Rivera E, Andreeva S, Weins A, Wallentin H, Greka A, Mundel P. Proteasomal degradation of Nck1 but not Nck2 regulates RhoA activation and actin dynamics. *Nat Commun* 2013, 4: 2863.

Callus BA, Verhagen AM, Vaux DL. Association of mammalian sterile twenty kinases, Mst1 and Mst2, with Salvador via C-terminal coiled-coil domains, leads to its stabilization and phosphorylation. *FEBS J* 2006, 273: 4264–4276.

Cankara N. Fetal dönem boyunca kalp gelişimi, Doktora Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi Sağlık bilimleri enstitüsü, Isparta, 2010

Chalfant CE, Kishikawa K, Mumby MC, Kamibayashi C, Bielawska A, Hannun YA. Long chain ceramides activate protein phosphatase-1 and protein phosphatase-2A. Activation is stereospecific and regulated by phosphatidic acid. *J Biol Chem* 1999, 274(29):20313–7.10.1074

Chalfant CE, Szulc Z, Roddy P, Bielawska A, Hannun YA. The structural requirements for ceramide activation of serine-threonine protein phosphatases. *J Lipid Res* 2004, 45(3):496–506.10.1194

Chao Wang, Xiaoyong Zhu, Weiwei Feng, Yinhua Yu, Kangjin Jeong, Wei Guo, Yiling Lu, Gordon B Mills. Verteporfin inhibits YAP function through up-regulating 14-3-3 σ sequestering YAP in the cytoplasm. *Am J Cancer Res* 2016, 6(1):27-37.

Chen X, Shevtsov SP, Hsich E, Cui L, Haq S, Aronovitz M, Kerkelä R, Molkentin JD, Liao R, Salomon RN, Patten R, Force T. The β -catenin/Tcell factor/lymphocyte enhancer factor signaling pathway is required for normal and stress induced cardiac hypertrophy, *Mol Cell Biol* 2006, vol. 26, no. 12, ss. 4462–4473.

Chen X, Yang J, Evans PM, Liu C. Wnt signaling: the good and the bad. *Acta Biochim Biophys Sin* 2009, 40(7), 577-594.

Chien-Jung Lin, Chieh-Yu Lin, Chen-Hao Chen, Bin Zhou, Ching-Pin Chang. Partitioning the heart: mechanisms of cardiac septation and valve development. *Development* 2012, 139: 3277-3299.

Cho E, Feng Y, Rauskolb C, Maitra S, Fehon R, Irvine KD. Delineation of a Fat tumor suppressor pathway. *Nat Genet* 2006, 38:1142–1150.

Coudreuse D, Korswagen HC. The making of Wnt: new insights into Wnt maturation, sorting and secretion. *Development* 2007, 134(1), 3-12.

Couzens AL, Knight JD, Kean MJ, Teo G, Weiss A, Dunham WH, Lin ZY, Bagshaw RD, Sicheri F, Pawson T, et al. Protein interaction network of the mammalian Hippo pathway reveals mechanisms of kinase-phosphatase interactions. *Sci Signal* 2013, 6: rs15.

Cripps RM, Olson EN. Twist is required for muscle template splitting during adult *Drosophila* myogenesis. *Dev Biol* 1998, Nov 1;203(1):106-15.

Dan I, Watanabe NM, Kusumi A. The Ste20 group kinases as regulators of MAP kinase cascades. *Trends Cell Biol* 2001, 11: 220–230.

Das Thakur M, Feng Y, Jagannathan R, Seppa MJ, Skeath JB, Longmore GD. Ajuba LIM proteins are negative regulators of the Hippo signaling pathway. *Curr Biol* 2010, 20:657–662.

Donohue E, Thomas A, Maurer N, Manisali I, Zeisser-Labouebe M, Zisman N, Anderson HJ, Ng SS, Webb M, Bally M and Roberge M. The autophagy inhibitor verteporfin moderately enhances the antitumor activity of gemcitabine in a pancreatic ductal adenocarcinoma model. *J Cancer* 2013, 4: 585-596.

Fananapazir K, Kaufman MH. Observations on the development of the aortico-pulmonary spiral septum in the mouse. *J Anat* 1988, 158:157–72.

Fishman MC, Olson EN. Parsing the heart: genetic modules for organ assembly. *Cell* 1997, Oct 17;91(2):153-6.

Gajewski K, Fossett N, Molkenin JD, Kim Y, Choi CY, Schulz RA. The zinc finger proteins Pannier and GATA4 function as cardiogenic factors in *Drosophila*. *Development* 1999, 126, 5679–5688.

Genevet A, Polesello C, Blight K, Robertson F, Collinson LM, Pichaud F, Tapon N. The Hippo pathway regulates apical-domain size independently of its growth-control function. *J Cell Sci* 2009, 122:2360–2370.

Grepin C, Nemer G, Nemer M. Enhanced cardiogenesis in embryonic stem cells overexpressing the GATA-4 transcription factor. *Development*.1997, Jun;124(12):2387-95.

Guo C, Tommasi S, Liu L, Yee JK, Dammann R, Pfeifer GP. RASSF1A is part of a complex similar to the *Drosophila* Hippo/Salvador/Lats tumor-suppressor network. *Curr Biol* 2007, 17:700–705.

Guo C, Zhang X, Pfeifer GP. The tumor suppressor RASSF1A prevents dephosphorylation of the mammalian STE20-like kinases MST1 and MST2. *J Biol Chem* 2011, 286: 6253–6261

Hashimoto-Partyka MK, Yuge M, Cho KW. Nodal signaling in *Xenopus* gastrulae is cell-autonomous and patterned by beta-catenin. *Dev Biol* 2003, 253:125–138.

Hata Y, Timalisina S, Maimaiti S. Okadaic Acid: A Tool to Study the Hippo Pathway *Mar Drugs* 2013 Mar; 11(3): 896–902.

Heallen T, Zhang M, Wang J, Bonilla-Claudio M, Klysik E, Johnson RL and Martin JF. Hippo pathway inhibits Wnt signaling to restrain cardiomyocyte proliferation and heart size. *Science* 2011, 332:458-461.

Heikinheimo M, Scandrett JM, Wilson DB. Localization of transcription factor GATA-4 to regions of the mouse embryo involved in cardiac development, *Dev Biol* 1994, 164 361 373.

- Henney JE.** From the Food and Drug Administration. *JAMA* 2000; 283: 2779.
- Hergovich A, Kohler RS, Schmitz D, Vichalkovski A, Cornils H, Hemmings BA.** The MST1 and hMOB1 tumor suppressors control human centrosome duplication by regulating NDR kinase phosphorylation. *Curr Biol* 2009, 19:1692–1702.
- Hergovich A, Schmitz D, Hemmings BA.** The human tumour suppressor LATS1 is activated by human MOB1 at the membrane. *Biochem Biophys Res Commun* 2006, 345: 50–58.
- Hermans KC, Blankesteyn WM.** Wnt Signaling in Cardiac Disease. *Compr Physiol* 2015, Jul 1;5(3):1183-209.
- Ho KC, Zhou Z, She YM, Chun A, Cyr TD, Yang X.** Itch E3 ubiquitin ligase regulates large tumor suppressor 1 stability. *Proc Natl Acad Sci* 2011, 108: 4870–4875.
- Ho LL, Wei X, Shimizu T, Lai ZC.** Mob as tumor suppressor is activated at the cell membrane to control tissue growth and organ size in *Drosophila*. *Dev Biol* 2010, 337:274–283.
- Hoffman JI.** Incidence of congenital heart disease. II. Prenatal incidence. *Pediatr Cardiol* 1995, 16:155–165.
- Holland ND, Venkatesh TV, Holland LZ, Jacobs DK, Bodmer R.** Amphioxus homeobox gene expressed in myocardial progenitors: insights into evolution of the vertebrate heart. *Dev Biol.* 2003 Mar 1;255(1):128-37.
- Huang J, Wu S, Barrera J, Matthews K, Pan D.** The Hippo signaling pathway coordinately regulates cell proliferation and apoptosis by inactivating Yorkie, the *Drosophila* homolog of YAP. *Cell* 2005, 122: 421–434.
- Hurlstone AF, Haramis AP, Wienholds E, Begthel H, Korving J, Van Eeden F, Cuppen E, Zivkovic D, Plasterk RH, Clevers H.** The Wnt/beta-catenin pathway regulates cardiac valve formation. *Nature* 2003, 425:633–637.
- Imajo M, Miyatake K, Iimura A, Miyamoto A, Nishida E.** A molecular mechanism that links Hippo signalling to the inhibition of Wnt/ β catenin signalling. *The EMBO Journal* 2012, 31:1109-1122.

İlyas M. Wnt signalling and the mechanistic basis of tumour development. *J Pathol* 2005, 205(2) ;130–144.

Katarzyna Brodowska, Ahmad Moujahed, Anna Marmalidou, Melissa Meyer zu Horste, Joanna Cichy, Joan W. Miller, Evangelos Gragoudas ve Demetrios G. Vavvas. The clinically used photosensitizer Verteporfin (VP) inhibits YAP-TEAD and human retinoblastoma cell growth in vitro without light activation. *Exp Eye Res.* 2014 July, 124: 67–73.

Kaufman MH, Bard JBL. The Anatomical Basis of the Mouse Development. Academic Press; San Diego, CA: 1999

Kaufman MH, Navaratnam V. Early differentiation of the heart in mouse embryos. *J Anat.* 1981 Sep, 133(Pt 2): 235–246.

Kelly RG, Brown NA, Buckingham ME. The arterial pole of the mouse heart forms from Fgf10-expressing cells in pharyngeal mesoderm. *Dev Cell.* 2001 Sep, 1(3):435-40.

Kestler HA, Kühl M. From individual Wnt pathways towards a Wnt signalling network. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2008, 363(1495), 1333-1347.

Kikuchi A, Kishida S, Yamamoto H. Regulation of Wnt signaling by protein-protein interaction and post-translational modifications. *Exp Mol Med* 2006, 38(1), 1-10.

Kim M, Kim T, Johnson RL, Lim DS. Transcriptional co-repressor function of the hippo pathway transducers YAP and TAZ. *Cell Rep* 2015, 11: 270–282.

Kioussi C, Briata P, Baek SH, Rose DW, Hamblet NS, Herman T, Ohgi KA, Lin C, Gleiberman A, Wang J, Brault V, Ruiz-Lozano P, Nguyen HD, Kemler R, Glass CK, Wynshaw-Boris A, Rosenfeld MG. Identification of a Wnt/D ν 1/ β -catenin Pitx2 pathway mediating cell type specific proliferation during development. *Cell* 2002, vol. 111, no. 5, ss. 673–685.

Kirby ML. Cardiac Development. Oxford University Press; New York: 2007.

Kisanuki YY, Hammer RE, Miyazaki J, Williams SC, Richardson JA, Yanagisawa M. Tie2-Cre transgenic mice: a new model for endothelial cell-lineage analysis in vivo. *Dev Biol* 2001, 230:230– 42.

Klaus A, Saga Y, Taketo M.M, Tzahor E, Birchmeier W. Distinct roles of Wnt/ β -catenin and bmp signaling during early cardiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U.S.A* 2007, vol. 104, no. 47, ss. 18531–18536.

Klaus, A. Birchmeier W. Developmental signaling in myocardial progenitor cells: a comprehensive view of Bmp and Wnt/ β -catenin signaling. *Pediatr Cardiol* 2009, vol. 30, ss. 609–616.

Kloesel B, DiNardo AJ, Simon CB. Cardiac Embryology and Molecular Mechanisms of Congenital Heart Disease – A Primer for Anesthesiologists. *Anesth Analg.* 2016 September, 123(3): 551–569.

Kohler RS, Schmitz D, Cornils H, Hemmings BA, Hergovich A. Differential NDR/LATS interactions with the human MOB family reveal a negative role for human MOB2 in the regulation of human NDR kinases. *Mol Cell Biol* 2010, 30: 4507–4520.

Kuran O. Sistematik anatomi. Dolaşım Sistemi İçinde, İstanbul: Filiz Kitabevi. 1983, s.209-224.

Kwon C, Arnold J, Hsiao EC, Taketo MM, Conklin BR, Srivastava D. Canonical Wnt signaling is a positive regulator of mammalian cardiac progenitors. *Proc Natl Acad Sci U.S.A* 2007, vol. 104, no. 26, ss. 10894–10899.

Larabell CA, Torres M, Rowning BA, Yost C, Miller JR, Wu M, Kimelman D, Moon RT. Establishment of the dorso-ventral axis in *Xenopus* embryos is presaged by early asymmetries in beta-catenin that are modulated by the Wnt signaling pathway. *J Cell Biol* 1997, 136:1123–1136.

Larsen W. Essentials of human embryology. (Based on first edition of human embryology published in 1993). Churchill Livingstone inc, New York, 1998.

Li W, You L, Cooper J, Schiavon G, Pepe-Caprio A, Zhou L, Ishii R, Giovannini M, Hanemann CO, Long SB, et al. Merlin/NF2 suppresses tumorigenesis by inhibiting the E3 ubiquitin ligase CRL4(DCAF1) in the nucleus. *Cell* 2010, 140:477–490.

Li Y, Zhou H, Li F, Chan SW, Lin Z, Wei Z, Yang Z, Guo F, Lim CJ, Xing W, et al. Angiotensin binding-induced activation of Merlin/NF2 in the Hippo pathway. *Cell Res* 2015, 25: 801–817.

Lian I, Kim J, Okazawa H, Zhao J, Zhao B, Yu J, Chinnaiyan A, Israel MA, Goldstein LS, Abujarour R, et al. The role of YAP transcription coactivator in regulating stem cell self-renewal and differentiation. *Genes Dev* 2010, 24: 1106–1118.

Lin Q, Schwarz J, Bucana C, Olson EN. Control of mouse cardiac morphogenesis and myogenesis by transcription factor MEF2C. *Science*. 1997 May 30, 276(5317):1404-7.

Ling C, Zheng Y, Yin F, Yu J, Huang J, Hong Y, Wu S, Pan D. The apical transmembrane protein Crumbs functions as a tumor suppressor that regulates Hippo signaling by binding to Expanded. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010, 107:10532–10537.

Liu Y, Asakura M, Inoue H, Nakamura T, Sano M, Niu Z et al. Sox17 is essential for the specification of cardiac mesoderm in embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007, 104:3859–3864.

Liu-Chittenden Y, Huang B, Shim JS, Chen Q, Lee S-J, Anders RA, Liu JO, Pan D. Genetic and pharmacological disruption of the TEAD-YAP complex suppresses the oncogenic activity of YAP. *Genes Dev*. 2012, 26:1300–1305.

Logan CY, Nusse R. The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2004, 20, 781-810.

Lu L, Li Y, Kim SM, Bossuyt W, Liu P, Qiu Q, Wang Y, Halder G, Finegold MJ, Lee JS, Johnson RL. Hippo signaling is a potent in vivo growth and tumor suppressor pathway in the mammalian liver. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010, 107:1437–1442.

Luo X. Snapshots of a hybrid transcription factor in the Hippo pathway. *Prot cell* 2010, 1(9): 811–819

Lustig B, Behrens JJ. The Wnt signaling pathway and its role in tumor development. *Cancer Res Clin Oncol* 2003, 129(4), 199-221.

Makita R, Uchijima Y, Nishiyama K, Amano T, Chen Q, Takeuchi T, Mitani A, Nagase T, Yatomi Y, Aburatani H, Nakagawa O, Small EV, Cobo-Stark P, Igarashi P,

Murakami M, Tominaga J, Sato T, Asano T, Kurihara Y, Kurihara H. Multiple renal cysts, urinary concentration defects, and pulmonary emphysematous changes in mice lacking TAZ. *Am J Physiol Renal Physiol* 2008, 294:F542-553.

Mangomi ME, Nargeot J. Genesis and regulation of the heart automaticity. *Physiol Rev.* 2008 Jul, 88(3):919-82.

Mao Y, Kucuk B, Irvine KD. Drosophila lowfat, a novel modulator of Fat signaling. *Development* 2009, 136:3223–3233.

Mao Y, Rauskolb C, Cho E, Hu WL, Hayter H, Minihan G, Katz FN, Irvine KD. Dachs: an unconventional myosin that functions downstream of Fat to regulate growth, affinity and gene expression in Drosophila. *Development.* 2006, 133:2539–2551.

Marijianowski MM, Teeling P, Mann J, Becker AE. Dilated cardiomyopathy is associated with an increase in the type I/type III collagen ratio: A quantitative assessment. *J Am Coll Cardiol* 1995, May;25(6):1263-72.

McCartney BM, Kulikaukas RM, LaJeunesse DR, Fehon RG. The neurofibromatosis-2 homologue, Merlin, and the tumor suppressor expanded function together in Drosophila to regulate cell proliferation and differentiation. *Development* 2000, 127:1315–1324.

McGuire MA, de Bakker JM, Vermeulen JT, Moorman AF, Loh P, Thibault B, Vermeulen JL, Becker AE, Janse MJ. Atrioventricular junctional tissue. Discrepancy between histological and electrophysiological characteristics. *Circulation.* 1996, 94:571–577.

Meng Z, Moroishi T, Mottier-Pavie V, Plouffe SW, Hansen CG, Hong AW, Park HW, Mo JS, Lu W, Lu S, et al. MAP4K family kinases act in parallel to MST1/2 to activate LATS1/2 in the Hippo pathway. *Nat Commun* 2015, 6: 8357.

Minseong K, Eek-hoon J. Cross-talk between Wnt/ β -catenin and Hippo signaling pathways: a brief review. *BMB Rep* 2014, 47(10): 540-545.

Moore KL, Persaud TVN, Torchia MG. Klinik yönleriyle insan embriyolojisi. 10. Baskı, Hakkı Dalkılıç, Nobel tıp kitabevleri, İstanbul, 2016.s 2839-335

Moorman A, Webb S, Brown NA, Lamers W, Anderson RH. Development of the heart: (1) formation of the cardiac chambers and arterial trunks. *Heart* 2003, Jul; 89(7): 806-814.

Morton JB, Sanders P, Das A, Vohra JK, Sparks PB, Kalman JM. Focal atrial tachycardia arising from the tricuspid annulus: electrophysiologic and electrocardiographic characteristics. *J Cardiovasc Electrophysiol.* 2001, 12:653–659.

Naito AT, Akazawa H, Takano H, Minamino T, Nagai T, Aburatani H, Komuro I. Phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway plays a critical role in early cardiomyogenesis by regulating canonical Wnt signaling. *Circ Res* 2005, 97:144–151.

Naito AT, Shiojima I, Akazawa H. Developmental stage specific biphasic roles of Wnt/ β -catenin signaling in cardiomyogenesis and hematopoiesis. *Proc Natl Acad Sci U.S.A* 2006, vol.103, no.52, ss. 19812–19817.

Netter F. *Atlas of Human Anatomy.* 3th Edt, Philadelphia: Saunders, 2006.

Olson EN, Srivastava D. Molecular pathways controlling heart development. *Science.* 1996 May 3;272(5262):671-6.

Olson EN. Heart Gene Regulatory Networks in the Evolution and Development of the heart *Science* 313, 1922, 2006

Pan D. The Hippo signaling pathway in development and cancer. *Dev Cell* 2010, 49:1e505.

Park HY, Kim YC, Yu B, Moroishi T, Mo JS, Plouffe SW, Meng Z, Lin KC, Yu FX, Alexander CM, Wang C, Guan KL. Alternative Wnt Signaling Activates YAP/TAZ. *Cell* 2015, 162(4): 780–794.

Perez-Pomares JM, Macias D, Garcia-Garrido L, Munoz-Chapuli R. Contribution of the primitive epicardium to the subepicardial mesenchyme in hamster and chick embryos. *Dev Dyn* 1997, 210:96–105

Piven OO, Palchevska OL, Lukash LL. The wnt/beta catenin signaling in embryonic cardiogenesis, postnatal development and myocardium reconstruction. *Tsitol Genet* 2014, Sep Oct;48(5):72-83.

Polesello C, Tapon N. Salvador-warts-hippo signaling promotes *Drosophila* posterior follicle cell maturation downstream of notch. *Curr Biol* 2007, 17:1864–1870.

Povelones M, Nusse R. The role of the cysteine-rich domain of Frizzled in Wingless-Armadillo signaling. *EMBO J* 2005, 24(19), 3493-3503.

Praskova M, Khoklatchev A, Ortiz-Vega S, Avruch J. Regulation of the MST1 kinase by autophosphorylation, by the growth inhibitory proteins, RASSF1 and NORE1, and by Ras. *Biochem J* 2004, 381: 453–462.

Praskova M, Xia F, Avruch J. MOBKL1A/MOBKL1B phosphorylation by MST1 and MST2 inhibits cell proliferation. *Curr Biol* 2008, 18: 311–321.

Prunier C, Hocevar BA, Howe PH. Wnt signaling: Physiology and Pathology. *Growth Factor* 2004, 22 (3) ;141-150.

Reddy BVVG, Irvine KD. The Fat and Warts signaling pathways: new insights into their regulation, mechanism and conservation. *Development* 2008, 135, 2827-2838.

Ribeiro PS, Josué F, Wepf A, Wehr MC, Rinner O, Kelly G, Tapon N, Gstaiger M. Combined functional genomic and proteomic approaches identify a PP2A complex as a negative regulator of Hippo signaling. *Mol Cell* 2010, 39:521–534.

Riley PR, Gertsenstein M, Dawson K, Cross JC. Early exclusion of hand1-deficient cells from distinct regions of the left ventricular myocardium in chimeric mouse embryos. *Dev Biol* 2000, Nov 1;227(1):156-68.

Rogulja D, Rauskolb C, Irvine KD. Morphogen control of wing growth through the Fat signaling pathway. *Dev Cell* 2008, 15:309–321.

Ross MH, Pawlina W. (Eds) *Histoloji Konu Anlatımı ve Atlas*. In: Baykal B. dolaşım Sistem. 6.Baskı Ankara: Palme Yayıncılık; 2014.

Rouleau GA, Merel P, Lutchman M, Sanson M, Zucman J, Marineau C, Hoang-Xuan K, Demczuk S, Desmaze C, Plougastel B, et al. Alteration in a new gene encoding a putative membraneorganizing protein causes neuro-fibromatosis type 2. *Nature* 1993, 363:515–521.

Saburi S, Hester I, Fischer E, Pontoglio M, Eremina V, Gessler M, Quaggin SE, Harrison R, Mount R, McNeill H. Loss of Fat4 disrupts PCP signaling and oriented cell division and leads to cystic kidney disease. *Nat Genet* 2008, 40:1010–1015.

Sadler TW. Medikal Embriyoloji 12. Baskı, A. Can Başaklar, Palme yayıncılık, 2011.ss 165-200

Simões-Costa MS, Vasconcelos M, Sampaio AC, Cravo RM, Linhares VL, Hochgreb T, Yan CY, Davidson B, Xavier-Neto J. The evolutionary origin of cardiac chambers. *Dev Biol.* 2005 Jan 1;277(1):1-15.

Simon MA, Xu A, Ishikawa HO, Irvine KD. Modulation of fat: dachsous binding by the cadherin domain kinase four-jointed. *Curr Biol* 2010, 20:811–817

Snell RS. Toraks II Göğüs Boşluğu İçinde: *Klinik Anatomi.* Yıldırım M (çev.ed.), Klinik Anatomi. 6. Baskı, İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 2004

Sorrentino RP, Gajewski KM, Schulz RA. GATA factors in Drosophila heart and blood cell development. *Semin Cell Dev Biol.* 2005 Feb, 16(1):107-16.

Srivastava D, Olson EN. A genetic blueprint for cardiac development. *Nature* 2000, Sep 14;407(6801):221-6.

Sun S, Reddy BV, Irvine KD. Localization of Hippo signalling complexes and Warts activation in vivo. *Nat Commun.* 2015, 6: 8402.

Tang F, Gill J, Ficht X, Barthlott T, Cornils H, Schmitz-Rohmer D, Hynx D, Zhou D, Zhang L, Xue G, et al. The kinases NDR1/2 act downstream of the Hippo homolog MST1 to mediate both egress of thymocytes from the thymus and lymphocyte motility. *Sci Signal* 2015, 8:ra100.

Tanır HG, Demirezen Ş. Wnt Sinyal Yolunun Biyolojisi ve Bu Yolda Görev Alan Biyomoleküller. *Türkiye Klinikleri J Med Sci* 2009, 29(5):1292-7.

TANIR HG. Wnt/ β -katenin sinyal yolu aktivitesinin sitolojik ve immünohistokimyasal yöntemlerle saptanması. Hacettepe Üniversitesi, Fen fakültesi, yüksek lisans tezi, 2010. Ankara

Tapon N, Harvey KF, Bell DW, Wahrer DC, Schiripo TA, Haber D, Hariharan IK. salvador promotes both cell cycle exit and apoptosis in Drosophila and is mutated in human cancer cell lines. *Cell* 2002, 110: 467–478.

Varelas X, Miller BW, Sopko R, Song S, Gregorieff A, Fellouse FA, Sakuma R, Pawson T, Hunziker W, McNeill H, Wrana JL and Attisano L. The Hippo pathway regulates Wnt/beta-catenin signaling. *Dev Cell* 2010, 18;579-591.

Von Both I, Silvestri C, Erdemir T, Lickert H, Walls JR, Henkelman RM, Rossant J, Harvey RP, Attisano L, Wrana JL. Foxh1 is essential for development of the anterior heart field. *Dev Cell* 2004 Sep, 7(3):331-45.

Von Gise A, Lin Z, Schlegelmilch K, Honor LB, Pan GM, Buck JN, Ma Q, Ishiwata T, Zhou B, Camargo FD, Pu WT. YAP1, the nuclear target of Hippo signaling, stimulates heart growth through cardiomyocyte proliferation but not hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012, Feb 14;109(7):2394-9.

Wang C, Zhu X, Feng W, Yu Y, Jeong K, Guo W, Lu Y, Mills GB. Verteporfin inhibits YAP function through up-regulating 14-3-3 σ sequestering YAP in the cytoplasm. *Am J Cancer Res* 2016, 6(1): 27–37.

Wang W, Li X, Huang J, Feng L, Dolinta KG, Chen J. Defining the protein–protein interaction network of the human hippo pathway. *Mol Cell Proteomics* 2014, 13: 119–131.

Wawrzak D, Luyten A, Lambaerts K, Zimmermann P. Frizzled-PDZ scaffold interactions in the control of Wnt signaling. *Adv Enzyme Regul* 2009, 49(1), 98-106.

Wu S, Liu Y, Zheng Y, Dong J, Pan D. The TEAD/TEF family protein Scalloped mediates transcriptional output of the Hippo growth-regulatory pathway. *Dev Cell* 2008, 14:388–398.

Yelbuz TM, Waldo KL, Kumiski DH, Stadt HA, Wolfe RR, Leatherbury L, Kirby ML. Shortened outflow tract leads to altered cardiac looping after neural crest ablation. *Circulation* 2002,106:504–10.

Yıldırım M. Resimli Sistemik Anatomi. In: Yıldırım M (Eds). Dolaşım sistemi. 2.Baskı İstanbul : Nobel Tıp Kitabevleri 2013

Yin F, Yu J, Zheng Y, Chen Q, Zhang N, Pan D. Spatial organization of Hippo signaling at the plasma membrane mediated by the tumor suppressor Merlin/NF2. *Cell* 2013, 154: 1342–1355.

Yu FX, Meng Z, Plouffe SW, Guan KL. Hippo pathway regulation of gastrointestinal tissues. *Annu Rev Physiol* 2015, 77:201–227.

Yu FX, Zhao B, Panupinthu N, Jewell JL, Lian I, Wang LH, Zhao J, Yuan H, Tumaneng K, Li H, et al. Regulation of the Hippo–YAP pathway by G-protein-coupled receptor signaling. *Cell* 2012, 150: 780–791.

Yu FX, Zhao B, Guan KL. Hippo Pathway in Organ Size Control, Tissue Homeostasis, and Cancer. *Cell* 2015, Nov 5;163(4):811–28.

Yu J, Zheng Y, Dong J, Klusza S, Deng WM, Pan D. Kibra functions as a tumor suppressor protein that regulates Hippo signaling in conjunction with Merlin and Expanded. *Dev Cell* 2010, 18:288–299.

Yuan Z, Kim D, Shu S, Wu J, Guo J, Xiao L, Kaneko S, Coppola D, Cheng JQ. Phosphoinositide 3-kinase/Akt inhibits MST1-mediated pro-apoptotic signaling through phosphorylation of threonine 120. *J Biol Chem* 2010, 285: 3815–3824.

Zanconato F, Forcato M, Battilana G, Azzolin L, Quaranta E, Bodega B, Rosato A, Bicciato S, Cordenonsi M, Piccolo S. Genome-wide association between YAP/TAZ/TEAD and AP-1 at enhancers drives oncogenic growth. *Nat Cell Biol* 2015, 17: 1218–1227.

Zhang L, Ren F, Zhang Q, Chen Y, Wang B, Jiang J. The TEAD/TEF family of transcription factor Scalloped mediates Hippo signaling in organ size control. *Dev Cell* 2008, 14: 377–387.

Zhang L, Tang F, Terracciano L, Hynx D, Kohler R, Bichet S, Hess D, Cron P, Hemmings BA, Hergovich A, et al. NDR functions as a physiological YAP1 kinase in the intestinal epithelium. *Curr Biol* 2015, 25: 296–305.

Zhang N, Bai H, David KK, Dong J, Zheng Y, Cai J, Giovannini M, Liu P, Anders RA, Pan D. The Merlin/NF2 tumor suppressor functions through the YAP oncoprotein to regulate tissue homeostasis in mammals. *Dev Cell* 2010, 19:27–38.

Zhao B, Li L, Tumaneng K, Wang CY, Guan KL. A coordinated phosphorylation by Lats and CK1 regulates YAP stability through SCF(β -TRCP). *Genes Dev* 2010, 24: 72–85.

Zhao B, Li L, Wang L, Wang CY, Yu J, Guan KL. Cell detachment activates the Hippo pathway via cytoskeleton reorganization to induce anoikis. *Genes Dev* 2012, 26: 54–68.

Zhao B, Wei X, Li W, Udan RS, Yang Q, Kim J, Xie J, Ikenoue T, Yu J, Li L, et al. Inactivation of YAP oncoprotein by the Hippo pathway is involved in cell contact inhibition and tissue growth control. *Genes Dev.* 2007, 21:2747–2761.

Zhao B, Ye X, Yu J, Li L, Li W, Li S, Yu J, Lin JD, Wang CY, Chinnaiyan AM, et al. TEAD mediates YAP-dependent gene induction and growth control. *Genes Dev* 2008, 22: 1962–1971.

Zhao R, Watt AJ, Battle MA, Li J, Bondow BJ, Duncan SA. Loss of both GATA4 and GATA6 blocks cardiac myocyte differentiation and results in acardia in mice. *Dev Biol* 2008, 317:614–619.

-Zhao Y, Samal E, Srivastava D. Serum response factor regulates a muscle-specific microRNA that targets Hand2 during cardiogenesis. *Nature* 2005 Jul 14, 436(7048):214-20.

Zheng Y, Wang W, Liu B, Deng H, Uster E, Pan D. Identification of Happyhour/MAP4K as alternative Hpo/Mst-like kinases in the Hippo kinase cascade. *Dev Cell* 2015, 34: 642–655.

Zhou D, Conrad C, Xia F, Park JS, Payer B, Yin Y, Lauwers GY, Thasler W, Lee JT, Avruch J, et al. Mst1 and Mst2 maintain hepatocyte quiescence and suppress hepatocellular carcinoma development through inactivation of the Yap1 oncogene. *Cancer Cell* 2009, 16: 425–438.

Zhou Q, Li L, Zhao B, Guan KL. The Hippo Pathway in Heart Development, Regeneration, and Diseases. *Circ Res* 2015, 116:1431-1447.

Zhou Z, Hu T, Xu Z, Lin Z, Zhang Z, Feng T, Zhu L, Rong Y, Shen H, Luk JM, et al. Targeting Hippo pathway by specific interruption of YAP–TEAD interaction using cyclic YAP-like peptides. *FASEB J* 2015b, 29: 724–732.

Zhu C, Li L, Zhao B. The regulation and function of YAP transcription co-activator. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 2015.



ÖZGEÇMİŞ

Soyadı, Adı : ŞEHNE, Merve
Uyruk : T.C.
Doğum yeri ve tarihi : ANTAKYA 16.04.1992
Telefon : 05379118242
E-mail : merve.sehne@gmail.com
Yabancı Dil : İngilizce

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet tarihi
Y. Lisans	Adnan Menderes Üniversitesi	
Lisans	Adnan Menderes Üniversitesi	Haziran 2014

BURSLAR ve ÖDÜLLER:

Pankreas kanserinde elongasyon inisiyasyon faktör 2 alfa (eIF2 α)'nın siRNA (small interfering RNA) ile susturulması (in vitro ve in vivo) sonrasında hücre ölümünün araştırılması, TÜBİTAK PROJESİ, Bursiyer, 2016

İŞ DENEYİMİ

AKADEMİK YAYINLAR

1. MAKALELER

Ergin K, Erdogan AM, Gökmen E, Armagan GD, Olgun HN, Aktas SG, Sehne M, Süzek T, Ozpolat B. Investigation of the cell death in pancreatic cancer after silencing of elongation factor 2 alpha by siRNA. Changing the face of modern medicine: stem cells and gene therapy, 11, 2016.

2. PROJELER

Pankreas kanserinde elongasyon inisiyasyon faktör 2 alfa (eIF2 α)'nın siRNA (small interfering RNA) ile susturulması (in vitro ve in vivo) sonrasında hücre ölümünün araştırılması, TÜBİTAK PROJESİ

3. BİLDİRİLER

A) Uluslararası Kongrelerde Yapılan Bildiriler

Ergin K, Erdogan AM, Gökmen E, Armagan GD, Olgun HN, Aktas SG, Sehne M, Süzek T, Ozpolat B. Investigation of the cell death in pancreatic cancer after silencing of elongation factor 2 alpha by siRNA. Changing the face of modern medicine: stem cells and gene therapy, ISSCR,18.10.2016.

B) Ulusal Kongrelerde Yapılan Bildiriler

Deneysel Böbrek İskemi/Reperfüzyon hasarında omega 3 yağ asitlerinin olası koruyucu etkilerinin araştırılması. Uluslararası Sağlık Bilimleri Kongresi, Aydın, 2017

Beta gluklan uygulanmasının TNBS ile indüklenmiş deneysel kolit modeli üzerine terapötik ve koruyucu etkilerinin araştırılması. Uluslararası Sağlık Bilimleri Kongresi, Aydın, 2017