

**ZEBRA BALIĞI (*Danio rerio*)'NİN FARKLI
DOKULARINDA TELOMERAZ ENZİMİ
AKTİVİTESİ ÖLÇÜMÜ**

**Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Yüksek Lisans Tezi
Biyoloji Anabilim Dalı**

Hülya YILDIZ

**Danışman:
Doç. Dr. Ayşe Gül MUTLU**

**Ocak, 2015
BURDUR**



YÜKSEK LİSANS JÜRİ ONAY FORMU

HÜLYA YILDIZ tarafından DOÇ. DR. AYŞE GÜL MUTLU yönetiminde hazırlanan “ZEBRA BALIĞI (*DANIŖ RERİŖ*)’NİN FARKLI DOKULARINDA TELOMERAZ ENZİMİ AKTİVİTESİ ÖLÇÜMÜ” başlıklı tez tarafımızdan okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi 08/01/15

Doç. Dr. Deniz İNNAL
Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi
Biyoloji Bölümü
Başkan

Doç. Dr. Ayşe Gül MUTLU
Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi
Fen Edebiyat Fakültesi
Jüri Üyesi

Yrd. Doç. Akın YILMAZ
Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi
Mühendislik Fakültesi
Jüri Üyesi

ONAY

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunun tarih ve Sayılı kararı ile kabul edilmiştir

Doç. Dr. Songül ŞEN GÜR SOY

Müdür

Fen Bilimleri Enstitüsü

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
İÇİNDEKİLER	i
ÖZET	ii
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	v
ÇİZELGELER DİZİNİ	vi
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	vii
1. GİRİŞ	1
1.1. Telomer	3
1.2. Telomerlerin İşlevleri	5
1.3. Telomer Proteinleri	5
1.4. Telomeraz (Telomer Terminal Transferaz)	7
1.5. Telomeraz Enziminin Yapısı ve Alt Birimleri	8
1.5.1. Telomeraz Enziminin Yapısı	8
1.5.2. Telomeraz Enziminin Alt Birimleri	8
1.6. Trap Yöntemi	10
2. MATERYAL ve YÖNTEM	12
2.1. Materyal	12
2.1.1. Zebra Balığı (<i>Danio rerio</i>)'nın Sistematikteki Yeri	12
2.1.2. Zebra Balığı (<i>Danio rerio</i>)'nın Genel Özellikleri	12
2.1.3. Örneklerin Temin Edilmesi	12
2.1.4. Çalışmada Kullanılan Araç ve Gereçler	13
2.1.5. Kullanılan Cam ve Plastik Malzemelerin Hazırlanması	13
2.1.6. Çalışmaya Başlamadan Önce Dikkat Edilmesi Gerekenler	13
2.2. Yöntem	13
2.2.1. Örneklerin Muhafazası	13
2.2.2. Balıkların Diseksiyonu	14
2.2.3. Kit Prosedürünün Uygulanması	17
2.2.3.1. Doku Ekstraktlarının Hazırlanması	17
2.2.3.2. TRAP	17
2.2.3.3. ELISA	18
2.2.3.4. Bradford Yöntemi	20
2.2.3.5. RTA'nın Hesaplanması	20
2.2.3.6. İstatistik	20
3. ARAŞTIRMA BULGULARI	21
4. TARTIŞMA ve SONUÇ	26
5. KAYNAKLAR	30
ÖZGEÇMİŞ	35

ÖZET

Yüksek Lisans

Zebra Balığı (*Danio rerio*)'nın Farklı Dokularında Telomeraz Enzimi Aktivitesi Ölçümü

Hülya YILDIZ
Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Telomerler özelleşmiş DNA tekrar dizilerinden ve telomer bağlı proteinlerden oluşurlar. Telomeraz veya diğer bir ifadeyle telomer terminal transferaz enzimi kendi RNA alt birimini kalıp olarak kullanır ve canlıya özgü hegzamerik tekrarları telomer uçlarına ekleyen ribonükleoprotein yapısında bir ters transkriptazdır. İnsanlardaki gibi biyolojik sistemlerde, telomere en çok etki edenin ne olduğunu anlamak için omurgalı modellerini incelemek önemlidir. Zebra balıklarında da telomer uzunluğundaki değişimler hücre bölünmesi ile sağlanır. Zebra balığı da kademeli bir şekilde yavaş yavaş yaşlanan ve telomer çalışmaları için umut vadeden bir teleost omurgalı modelidir. İnsan telomer kısalması mekanizmalarına ve telomeraz aktivitesindeki insanlarınkine benzer değişimler sebebiyle, telomer ve telomeraz çalışmalarında Zebra balığı yoğun olarak kullanılmaktadır.

Bu çalışmada Zebra balığının ergin ve yavru bireylerinde kalp, karaciğer, dalak ve dişi bireylerde ayrıca yumurtalık dokularında telomeraz aktivitesi ölçümü amaçlanmıştır. Bunun için PCR-ELISA kombine bir yöntem olan TRAP yöntemi uygulanmış, sonuçlar Minitab programında istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Ergin bireylerde RTA (Relatif Telomeraz Aktivitesi) dalakta 1,122, kalpte 0,300, karaciğerde 0,131, yumurtalıkta 0,078 olarak; yavru bireylerde ise; kalpte 1,132, dalakta 0,572, karaciğerde 0,130 olarak bulunmuştur.

Anahtar Kelimeler : Telomer, Telomeraz, PCR-TRAP-ELISA, Zebra balığı

Danışman: Doç. Dr. Ayşe Gül MUTLU, Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü

Hazırlanan bu Yüksek Lisans tezi Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi tarafından 0202-YL-13 no'lu projeden desteklenmiştir.

ABSTRACT

M.Sc. Thesis

Measuring of Telomerase Enzyme Activities in Different Tissues of Zebrafish (*Danio rerio*)

Hülya YILDIZ
Mehmet Akif Ersoy University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Telomeres composed specialy DNA repeat sequence and telomere bound proteins. Telomerase or in other words Telomere terminal transferase enzyme is a reverse transcripase that uses as a template the RNA subunit and adds organism-specific repeats to the ends of the chromosomes. It is critical to investigate complementry vertebrate models to understand what is the most likely impact of telomere exhaustion in a biological system like humans. Telomere length changes are provided with cell division in zebrafish. Zebrafish is a teleost fish that exhibits gradual senescence is promising vertebrate model. Like humans telomerase expression in zebrafish somatic cells is not sufficient to prevent telomere shortening. Therefore zebrafish is used intensively in studies of telomer and telomerase.

In this study we planned to measuring and comparing of the telomerase enzyme activities in heart, liver,spleen, and also female's ovary tissues of Zebrafish. PCR-ELISA was applied in combination with the TRAP assay method, the results were statistically evaluated in Minitab. RTA (Relative Telomerase Activity) values were found in the adult fish; spleen 1,122; heart 0,300, liver 0,131; ovary 0,078 and in the juvenile fish heart 1,132 spleen 0,572, liver 0,130.

Keywords : Telomeres, Telomerase, PCR-TRAP-ELISA, Zebrafish

Advisor: Assoc. Prof. Dr. Ayşe Gül MUTLU, Mehmet Akif Ersoy University, Arts and Sciences Faculty, Department of Biology

The present M.Sc. thesis was supported by Mehmet Akif Ersoy University Scientific Reserch Projects Unit under the project no of 0202-YL-13.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tez konumun seçilmesi, tez çalışmalarımın yürütülmesi ve planlanmasında, deneyim ve desteklerini esirgemeyen, bana yol gösteren Danışman Hocam Sayın Doç. Dr. Ayşe Gül MUTLU'ya laboratuvar çalışmalarım sırasında hiçbir desteğini esirgemeyen Yüksek Lisans Öğrencisi, Değerli Arkadaşım Abdülkerim BİLGİNER'e ve tez çalışmamın tamamlanmasında maddi destek sağlayan Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimine ve bu birim çalışanlarına teşekkür eder, ayrıca çalışmalarım süresince maddi manevi her türlü desteğini esirgemeyen canım babam Niyazi YILDIZ'a ve varlığını hep yanımda hissettiğim canım anneme sevgi ve saygılarımı sunarım.

Hülya YILDIZ
BURDUR, 2015

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 1.1. Telomer FISH görüntüsü	4
Şekil 1.2. Telomer proteinleri	6
Şekil 1.3. Telomeraz alt birimleri	9
Şekil 1.4. Standart TRAP	10
Şekil 2.1. Zebra balığının aklimatizasyon ortamı	14
Şekil 2.2. Telomeraz aktivitesi ölçümünde kullanılan Zebra balığı dokuları.....	15
Şekil 2.3. Zebra balığının diseksiyon şekli	16
Şekil 2.4. Zebra balığının diseksiyon işlemi.....	16
Şekil 2.5. TRAP işleminde kullanılan termal döngü cihazı	18
Şekil 2.6. ELISA işlemi sonucu mikro plakadaki renk değişimi	19
Şekil 3.1. Protein tayini standart grafiği.....	21
Şekil 3.2. Yavru ve ergin grupların kalp, karaciğer ve dalaklarında ortalama telomeraz aktivitesi değerleri grafiği.....	23

ÇİZELGELER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Çizelge 3.1. Bireylerin relatif telomeraz aktivitesi ortalamaları, minimum- maksimum değerler ve standard hata.....	22
Çizelge 3.2. Ergin grupların dokularında telomeraz aktivitesinin karşılaştırılmasında p değerleri.....	24
Çizelge 3.3. Yavru grupların dokularında telomeraz aktivitesinin karşılaştırılmasında p değerleri.....	24
Çizelge 3.4. Yavru ve ergin grupların aynı dokularında telomeraz aktivitesinin karşılaştırılmasında p değerleri.....	25

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

TRAP	Telomer tekrarı amplifikasyon protokolü
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
ELISA	Enzim bağı immunosorbent analizi
kb	Kilobaz
TRF1	Telomerik tekrar bağlanma faktörü 1
TRF2	Telomerik tekrar bağlanma faktörü 2
TIN2	Nükleer protein faktör 2
POT1	Telomer koruma faktörü 1
TPP1	Tripeptitpeptidaz
Rap1	Peppressör aktivatör proteini 1
TERT	Telomeraz katalitik alt birimi
TERC; TR	Telomeraz RNA şablonu
TEP1	Telomeraz ilişkili Protein
hTERT	İnsan telomeraz katalitik alt birimi
mRNA	Mesajcı ribonükleik asit
cm	Santimetre
DNaz	Deoksiribonükleaz
RNaz	Ribonükleaz
g	Gram
mL	Mililitre
µL	Mikrolitre
rpm	Dakikadaki dönüş sayısı

dk	Dakika
sn	Saniye
nm	Nanometre
RTA	Relatif telomeraz aktivitesi
SH	Standart hata
ZFIN	Zebra balığı bilgi ağı
FISH	Floresan in situ hibridizasyon

1.GİRİŞ

İnsanlar gibi, hücre bölünmesi ile değişen telomer uzunluğuna sahip omurgalı modellerinin araştırılması, biyolojik bir sistemde telomer tükenmesinde en olası etkinin ne olduğunu anlamak ve araştırmak için önemlidir (Henriques ve diğ., 2012).

Fare, insan telomer biyolojisi için bir model olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Goytisolo ve Blasco, 2002). Bununla birlikte, fare ve insan telomer uzunluğunun arasında büyük farklılıklar vardır (Autexier, 2008). Bu nedenle, diğer modeller, *Saccharomyces cerevisiae* (Cohn ve Blackburn, 1995) *Caenorhabditis elegans* (Wicky ve diğ., 1996), *Arabidopsis thaliana* (Fitzgerald ve diğ., 1999), *Gallus gallus* (Swanberg ve diğ., 2010) ve *Danio rerio* yaşlanma ve kanserde telomerazın oynadığı rolü aydınlatmak için karakterize edilmiştir (Anchelin ve diğ., 2011; 2012).

Son zamanlarda Zebra balığı (*D.rerio*) yaşlanma, doku onarımı, doku yenilenmesi ve kanser ile ilgili olanlar da dahil olmak üzere çeşitli hastalıkların incelenmesinde giderek popüler bir model organizma olmuştur (Lam ve Gong, 2006; Lund ve diğ., 2009).

Zebra balığı (*Danio rerio*), kısa bir nesil zamanı olan, küçük, zarif, tropikal, hızla yetişen, kademeli yaşlanma sergileyen, hızlı gelişimi sırasında biyolojik süreçlerin incelenebildiği; embriyo bakım kolaylığı sunan ve şeffaf embriyoları nedeniyle güçlü bir ilaç tarama platformu sunan, deneysel tekniklerin sadeliği ve maliyet düşüklüğü ile de kantitatif analiz biçimleri kolaylığı sağlayan kemikli bir balıktır (Henriques ve diğ., 2012, Yang ve diğ., 2013). Telomer biyolojisi için de umut verici bir omurgalı modeli olan Zebra balığında, inbred (kendileşmiş) laboratuvar farelerinin aksine, insan benzeri heterojen uzunluğa sahip telomer gözlenmiştir. Çeşitli dokularda telomeraz aktivitesi tespit edilmesine rağmen, Zebra balığında telomer, yaş ile birlikte kısalır. İnsanlarda olduğu gibi, Zebra balığı somatik hücrelerinde telomeraz sentezi, telomer kısalmasını önlemek için yeterli değildir (Henriques ve diğ., 2012).

İnsanların, hasarlı organlarının iyileştirilmesi ya da kayıp dokularının yeniden üretilmesi için sınırlı bir yeteneği olmasına rağmen, retina, yüzgeç, kalp, omurilik ve diğer dokuları incelenen Zebra balıklarının ileri yaş dönemlerinde de olağanüstü olarak rejeneratif yeteneklerini koruduğu gözlenmiştir (Anchelin ve diğ., 2011).

Deneysel amputasyon sonrası kuyruk yüzgecinin (Morgan, 1900 ; Santamarı'a ve Becerra, 1991), pelvik, anal ve dorsal yüzgeçleri gibi diğer yüzgeçlerin de rejenerasyon gösterdiği belirlenmiştir (Kawakami ve diğ., 2006; Nachtrab ve diğ., 2011).

Son on yıl içinde zebra balığı kalp rejenerasyonu için de bir model organizma haline gelmiştir (Poss ve diğ., 2002; Raya ve diğ., 2003). Buna ek olarak bu hayvan karaciğer rejenerasyonunu incelemek için de kullanılmıştır (Sadler ve diğ., 2007; Kan ve diğ., 2009). Mekanosensör organlar (Dufourcq ve diğ., 2006; Ma ve diğ., 2008; Le Clair ve Topczewski, 2010), retina (Hitchcock ve Raymond, 2004), merkezi sinir sisteminde aksonlar (Becker ve Becker, 2007) ve serebellum (Liu ve diğ., 2004; Itou ve diğ., 2012)'un araştırılmasında ayrıca telomer uzunluğunun yaşlanma ile ilişkili olarak kısalması ve kanser çalışmalarında da Zebra balığı kullanılmıştır (Harley ve diğ., 1990).

Zebra balığı mikroarray verileri kullanılarak insan kanserleri modellenmesi ve onkogenomik çalışmalar yapılmaktadır. Zebra balığı da çeşitli kimyasal karsinojenlere duyarlıdır, insan ve memeli kanserlerine histopatolojik benzerlik gösterir ve ayrıca çeşitli dokularında pek çok tümör türlerini üretir (Lam ve Gong, 2006).

Telomerler, genom bütünlüğünün kontrolü ve karsinogenezden sorumlu tutulduğu için, telomer kısalması ve telomeraz aktivasyonu mekanizmalarının rolü üzerinde yoğunlukla durulmaktadır. Artan veriler göstermektedir ki telomer, genom bütünlüğü kontrolünde ek fonksiyonlara ihtiyaç duyar. Buna ek olarak, kök ve projenitör hücrelerde, telomerazın fark edilebilir seviyelerde ifade edilmesi ve bu hücrelerin kanser oluşumunda önemli rol oynadığına dair giderek artan kanıtlar bulunmaktadır. Çoğu insan tümörleri, telomeraz enzimini ifade eder. Bununla birlikte, insan tümörlerinin yaklaşık % 20'sinde telomer uzatma alternatif mekanizması (ALT) adı verilen alternatif bir mekanizma bulunmaktadır. ALT aktivasyonunu kontrol eden moleküler mekanizma tam olarak anlaşılamamıştır. Yapılan bir araştırmaya göre, telomeraz inhibisyonu farelerde tümör büyümesini yavaşlatmıştır fakat ALT aktivasyonu ile tümörün nüksettiği gözlenmiştir (Shay ve diğ., 2012; Gunes ve Rudolph, 2013).

Kim ve arkadaşları (1994) hücre ve dokulardaki telomeraz aktivitesinin tayininde kullanılmak üzere TRAP (Telomeric Repeat Amplification Protocol- Telomerik Tekrar Amplikonlarının Çoğaltılması) yöntemini geliştirmişler ve farklı kanser türlerinde

çalışarak kanser ile telomeraz ekspresyonu arasında bir korelasyon olduğunu rapor etmişlerdir.

Şu durumda telomeraz enzimi kanserde hem tanısal bir belirteç olarak hem de tedavi için bir hedef olarak kullanılabilir. Bu amaçla doğal veya kimyasal olarak farklı formlarda üretilmiş ve telomerazın farklı alt birimlerine etki eden telomeraz inhibitörleri araştırılmaktadır (Savoysky ve diğ., 1995).

Yaşlanmanın sebeplerini ortaya koymaya çalışan pek çok hipotez vardır. Bunlardan bir tanesi de telomer kısalması hipotezidir. Telomeraz aktivitesinin eksikliğine bağlı olarak telomer kısalmasının, normalde bölünebilen hücrelerin bölünemez hale gelişi, hücre ölümü, organ yetmezlikleri ve yaşlanma ile ilişkili rahatsızlıklarda etkin bir mekanizma olduğu düşünülmektedir (Bibby, 2002).

Bu tez çalışmasındaki amaç, karsinogenez ve yaşlanmaya bağlı ömür uzunluğunda etkili olan telomeraz enziminin, tıpkı insanlarda olduğu gibi benzer telomer yapısına sahip, yaşlanmaya bağlı olarak da telomer kısalması gösteren ve kanser olabilen Zebra balığının ergin ve yavrularının kalp, karaciğer, dalak, ve yumurtalık gibi dokularındaki aktivitesinin PCR-TRAP-ELISA yöntemiyle ölçülmesi ve değerlendirilmesidir. Bu çalışmanın bundan sonraki çalışmalarda temel oluşturacağı düşünülmektedir.

1.1. Telomer

Ökaryotik hücrelerde lineer (doğrusal) kromozom bulunur. Lineer kromozomlarda replikasyon yönü yeni oluşacak ipliklerde 5' den 3' ne doğrudur. Her iplikte replikasyonun başlaması için bir RNA primerine ihtiyaç vardır. RNA primeri DNA replikasyonu sonrası ortadan kaldırıldığında, kromozom ucunda eksik bir kısım kalır. Telomer ise bu eksilmenin yapısal genlere ulaşmaması için bir çeşit kalkan rolü oynamaktadır. Her kromozomun sonunda bir kısa telomer segmenti (Şekil 1.1.) hücre bölünmesi ile belli bir sınıra gelip hücre döngüsünün durmasına kadar kısalır. Kontrollü bir ifadenin sonucunda, DNA replikasyonu sırasında kaybedilen telomerik dizilerin telomeraz enzimi ile geri kazanımı sağlanabilir (Pfennig ve diğ., 2007).

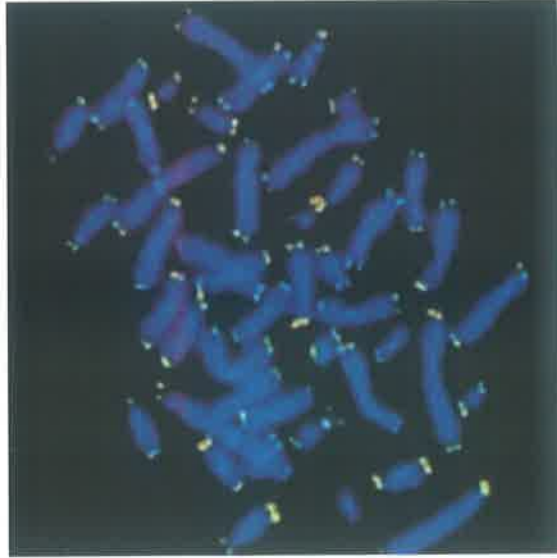
Telomerler, özelleşmiş DNA tekrar dizilerinden ve telomer bağlı proteinlerden oluşurlar. Telomerik DNA dizileri kodlama yapamazlar, bu yönleriyle diğer DNA

dizilerinden yapı ve işlev olarak ayrılırlar (Pfenning ve diğ.,2008; Anchelin ve diğ., 2011).

Telomer kavramı, ilk olarak 1931 yılında Herman J. Müller tarafından *Drosophila melanogaster*'in X ışınlarına maruz bırakılması sonucu kromozom yapısındaki değişimler ve bu değişimlerin sıklıklarının araştırılması sırasında ortaya atılmıştır. Müller, çalışmalarında kromozomların uç kısımlarının daha kararlı olduğunu, bu kısımlarda delesyon ve inversiyonların daha az olduğunu gözlemlemiştir.

Müller, Latince 'uç'(telos) ve 'bölüm' (meros) kelimelerinin birleşimi olan 'telomer' terimini ilk kez kullanmıştır (Greider ve Blackburn, 2009).

1978'de tek hücreli bir canlı olan *Tetrahymena*'nın telomer DNA'sı tekrar dizileri araştırılmıştır. Elizabeth Blackburn tarafından bu tekrar dizilerinin TTGGGG olduğu bulunmuştur. Daha sonraki çalışmalarla bu 6'lı tekrar dizilerinin türe göre farklılık gösterdiği belirlenmiştir (örneğin; insanda TTAGGG) (Blackburn, 1991; Kim ve diğ., 1994).



Şekil 1.1. Telomer FISH görüntüsü (Greider ve Blackburn'den, 2009). Sitogenetik analiz için kullanılan floresan in situ hibridizasyon, kromozomların floresan işaretli spesifik probalar ile görüntülenmesidir (Pinkel ve diğ., 1988).

İnsan veya cıvık mantarlarda olduğu gibi omurgalılar, bitkiler, bazı küf ve bazı protozoanlarda T2AG3 şeklinde telomerik tekrarlar vardır. Diğer tomurcuklanan veya bölünen mayalar ve bazı protozoan ve cıvık mantarlarda da düzensizlik gözlenmiştir. *Saccharomyces cerevisiae*'de G₁₋₃ T/C₁₋₃ A tekrar dizilerinin bulunması bu düzensizliğin örneklerinden biridir (Blackburn, 2001).

Telomerik tekrar dizilerinin ortalama sayısı türden türe büyük ölçüde farklılık gösterir. Örneğin insan telomer uzunluğu 8-12 kb iken bazı laboratuvar fare suşlarında bu uzunluk 100 kb olabilir. Telomer uzunluğu varyasyonları aynı organizmanın farklı dokularında, hatta tek bir hücre tipi içinde de görülebilir (De Lange ve diğ. 1990; Downs ve diğ., 2012).

1.2. Telomerlerin İşlevleri

Telomerler heterokromatin yapıdadır. Telomerik DNA, replikasyon esnasında kromozomal DNA'nın uç kısımlarını korur ve kromozom uçlarını rekombinasyon ve yıkımdan kurtarır. Kromozom uçlarının füzyonunu engeller böylece kararsız yapılar oluşmaz, stabilite sağlanır, kromozomların bütünlüğü korunur (Dubrano ve diğ., 2001; Riethman ve diğ., 2001). Telomerazın kromozom uçlarını stabilize etmesinin yanında kanser hücrelerinde apoptozun durdurulmasını sağladığı, büyümeyi kontrol eden genlerin transkripsiyonunu artırdığı ve DNA onarımını kolaylaştırarak bu hücrelerin hayatta kalmasını sağladığı belirtilmiştir (Chau ve diğ., 2007).

1.3. Telomer Proteinleri

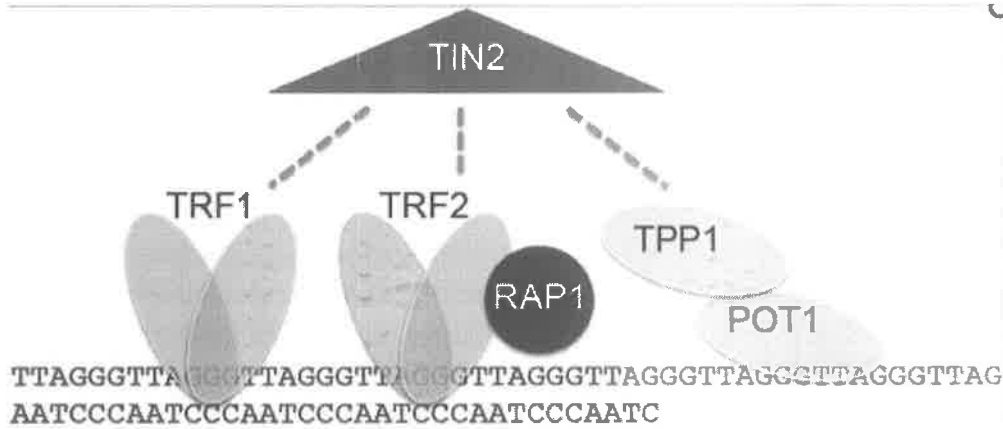
İlk kez in vitro insan hücrelerinde 'TTAGGG' dizilerine özgü olarak bağlanan bu proteinler, TRF1 (Telomerik tekrar bağlama Faktörü 1) ve TRF2 (Telomerik tekrar bağlama Faktörü 2) olarak tanımlanmıştır (Broccoli ve diğ., 1997; Chong ve diğ., 1995).

Diğer telomer proteinleri; TRF1 ve TRF2 nin etkileşiminden oluşan, nükleer protein faktörü 2 (TIN2), telomer koruma faktörü 1 (POT1), tripeptilpeptidaz (TPP1) ve repressör aktivatör proteini 1 (Rap1)'dir (Artandi ve De Pinho 2009). Telomerik DNA, (TTAGGG)'nin n sayıda tekrarı ve 'shelterin' kompleksi olarak bilinen ilişkili proteinleri içererek, doğrusal kromozom uçlarını oluşturmaktadır (Henriques ve diğ.,

2012). ‘Shelterin’ protein bileşenlerinin; telomer uçlarının telomeraz aktivitesi ile uzatılmasında, kromozom uçlarının DNA hasarından korunmasında, promotor t-loop oluşumunda ve telomer uzunluğunun korunmasında rol oynadığı bildirilmiştir (Buseman ve diğ., 2011).

Telomer yapısı çift zincirli (t-loop) ve tek zincirli (overhang) kısımlarından oluşur. Tek zincirli kısım 3' telomer ucunda bulunur ve kendi üzerinde katlanma yaparak çift zincirli gibi davranır böylece telomer yapısı korunmuş olur. Tek zincirli kısım POT1 ve TPP1, Çift zincirli kısım ise TRF1 ve TRF2 proteinlerinin bağlanmasıyla oluşur.

Şekil 1.2.'de de görüldüğü gibi TRF1 ve TRF2 çift zincirli telomer bölgesine bağlanır. POT1 ve TPP1 tek zincir (overhang) ile etkileşimlidir. RAP1, TRF2'ye bağlanır ve TIN2 ise TRF1, TRF2 ve TPP1 ile etkileşimi olan merkezi bir telomer bileşenidir (Artandi ve De Pinho, 2009).



Şekil 1.2. Telomer proteinleri (Artandi ve De Pinho'dan, 2009).

TRF1, telomer uzunluğunu ayarlar, aynı zamanda kırılğan DNA bölgelerine hareket ederek telomerik tekrar dizileri aracılığıyla telomerik DNA replikasyonunu kolaylaştırır; TRF2 ise, telomer uçlarının korunması için önemlidir ve t-loop formasyonunun oluşumunu kolaylaştırır.

1.4. Telomeraz (Telomer Terminal Transferaz)

Telomer uzunluğunun kısalması, memelilerde yaşlanma ile ilişkilidir. (Harley ve diğ., 1990). İnsanların somatik hücrelerinde de yaşla beraber telomer kısalması gözlenmiş ve telomerlerin her bölünme sonrası yaklaşık 100 baz azaldığı bildirilmiştir (Henriques 2012). 1960'lardan önce, insan somatik hücrelerinin durmadan bölünüp çoğaldığı düşüncesi vardı; Leonard Hayflick (1931) ise, kültür ortamında yaptığı çalışmalarla her hücrenin belirli sayıda (80-90 kez) bölündüğünü, her bölünmede telomer bölgesinin bir miktar kısalacağını belirtmiştir (Greider ve Blackburn, 2009).

Organizmanın yaşına bağlı olarak telomer bölgesindeki kademeli kısalmanın uzatılmasını standart DNA polimeraz yapamaz. Bu uzatılma işleminin, germ hücre hatlarında ve buna benzer hücrelerde 'telomeraz' olarak adlandırılan enzim + RNA kompleksi ile gerçekleştirildiği bilinmektedir (Holt ve diğ. 1999). Telomeraz, bir ters transkriptazdır, katalitik alt birimi (TERT) ve RNA şablonu (TERC) hareketiyle telomer uzatılmasını sağlayarak kromozom ucu tükenmesine karşı koyar (Henrique ve diğ., 2012).

Blackburn ve Greider (1984) Tetrahymena hücre ekstraktları ile sentetik telomer alt birimlerini karıştırdıklarında, bu alt birimlerin birbirine eklendiğini görmüşlerdir. Böylece telomeraz enziminin varlığı tamamen ortaya çıkmıştır (Greider ve Blackburn, 2009). İnsanda telomeraz aktivitesi Morin tarafından 1988 yılında ilk kez servikal kanser hücre hattı olan HeLa'da gösterilmiştir (Greider ve Balckburn, 2009).

İnsanların somatik dokuları yeterli telomeraz aktivitesinden yoksundurlar ve telomeraz aktivitesi, kök hücreleri, germ hücreleri ve tümör hücreleri gibi yüksek düzeyde çoğalma gösteren hücre tipleri ile sınırlıdır (Greider, 1998; Downs ve diğ., 2012). *Drosophila melanogaster* gibi bazı ökaryotik türlerde ise, telomer bulunmasına rağmen evrim sırasında telomeraz tamamen kaybolmuştur, telomeraz alternatifi olarak bu canlılarda retrotranspozonlar bulunduğu belirtilmiştir (Pardue ve De Baryshe, 1999).

Somatik hücrelerin sınırsız çoğalması telomerazın programsız ifadesi ile yeniden olabilir (Blasco, 2007). Bu durumun insan kanser türlerinin % 90'ından fazlasında olduğu belirlenmiştir (Kim ve diğ., 1994; Cong ve diğ., 2002; Stewart ve diğ., 2006). Telomerazın son yıllarda çok dikkat çekmesinin temel nedenleri, ömür

uzunluğu üzerine etkisi ve kanser hücreleri ile kök hücrelerin çoğalmasında keşfedilen rolleridir (Flores ve diğ., 2005).

Telomer biyolojisi, doku onarımı için de önemlidir (Lund ve diğ., 2009). Yaşlanma hızı farklı türlerde doku onarımı da yaygın olarak farklıdır, çünkü hücre çoğalması ve yaşlanma, telomeraz rolü ile ilgilidir (Pfennig ve diğ., 2007).

Telomer, her hücre bölünmesinde kısaldığından, kritik bir uzunluğa ulaştığında hücre bölünmesi durur. Bu olay aynı zamanda insanda doku rejeneratif yeteneğinin kısıtlanmasıyla sonuçlanırken, anormal karyotip görülmesini engeller (Lund ve diğ., 2009).

1.5. Telomeraz Enziminin Yapısı ve Alt Birimleri

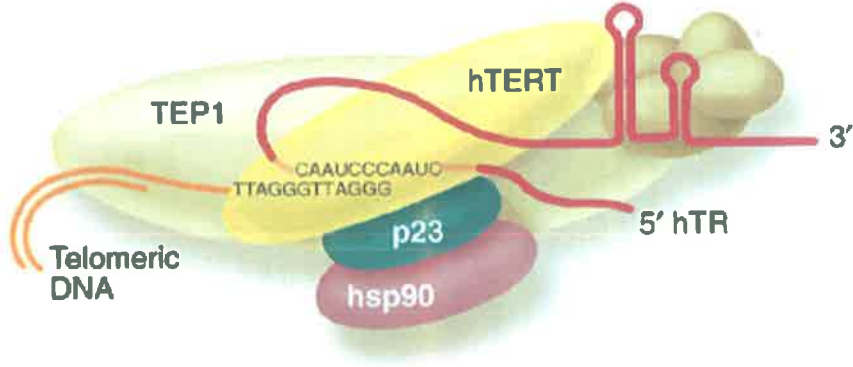
1.5.1. Telomeraz Enziminin Yapısı

Telomeraz, telomerik DNA'nın sentezi için şablon olarak görevli RNA alt birimine sahiptir ve bu işlem bir protein bileşeni tarafından katalize edilir, bu sebeple telomeraz enzimi bir reverse transkriptazdır. Telomerazın RNA bileşeni ilk kez siliatlarda karakterize edilmiştir (Bibby, 2002).

1.5.2. Telomeraz Alt birimleri:

Telomeraz , telomeraz reverse transkriptaz (TERT), telomeraz RNA'sı (TERC), telomeraz ile ilişkili protein 1 (TEP1) ve şaperon proteinler (p23, Hsp90) den oluşur (Chau ve diğ., 2007). Telomeraz kompleksini stabilize etmek için bulunan proteinlerden biri de 'diskerin' olarak adlandırılır (Şekil 1.3) (Katunaric ve Zamolo, 2012).

Telomeraz aktivitesinin yüksek olması, insan telomeraz reverse transkriptaz (hTERT) alt birimi ile ilişkilidir. Mesajcı RNA (mRNA) ve çok sayıda transkripsiyon faktörü (C-MYC, SP1, NFKB, MZF2, E2F'yi-1, Ets ve AP1) içeren hTERT promotör aktivitesini düzenler (Chau ve diğ., 2007).



Şekil 1.3. Telomeraz alt birimleri (Shay ve Wright'dan, 1999). İnsan Telomerazında katalitik alt birim hTERT, telomeraz RNAsı hTR, telomeraz proteini TEP1 ve şaperon proteinlerle birlikte ayrıca disklerin proteinlerini göstermektedir.

Son çalışmalar, her iki bileşenin (TERT ve TERC) telomeraz ifadesini düzenlediği ve fonksiyonel telomeraz holoenzimi için gerekli olduğunu göstermiştir. Bu holoenzimin işlevi, kromozomların telomer ucuna heksamerik tekrarları ekleyerek telomer uzunluğunu stabilize etmek ve evrimsel olarak kromozomların korunmasını sağlamaktır (Cairney ve Keith 2008).

Memeliler, kemirgenler, bitkiler, mayalar ve protozoanlar gibi türlerin TERT genleri klonlanmış, Zebra balığında ayrıca TR bileşeni de tanımlanmış ve karakterize edilmiştir (Yap ve diğ., 2005; Yu diğ., 2006; Lau ve diğ., 2008).

Telomer uzunluğu açısından, Zebra balığı telomeri (15-20 kb) ve insan telomeri oldukça benzerdir (10-15 kb). Telomeraz enzimi, Zebra balığının birçok organında yapısal olarak aktif olmasına rağmen, memeli dokularında bu durum böyle değildir. tert- mRNA ifadesi, telomeraz aktivitesi ve telomer uzunluğunun hepsi de yaşlanma sürecini değerlendirmek için yararlı belirteçler olarak kullanılır. İleri yaş Zebra balıklarının hemen hemen tüm dokularında ise bu veriler önemli ölçüde azalmıştır. (Xie ve diğ., 2008; Anchelin ve diğ., 2011; 2012).

1.6. TRAP Yöntemi

Telomeraz aktivitesi tespit etmek için polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) tabanlı telomerik amplifikasyon tekrarı protokolü (TRAP) Kim ve arkadaşları tarafından 1994 yılında bulunmuştur. Bu yöntem, telomerazın özellikle kanser ve yaşlanmadaki rolünün araştırılması için devrim yaratmıştır (Burger, 2002) .

TRAP yöntemi temelde iki adımlı bir işlemdir. İlk adımda telomeraz, sentetik forward primer ile 3' uca doğru polimerik yinelemeleri uzatır. İkinci adımda ise, reverse primer ilavesi ile n sayıda (insan telomeri için [TTAGGG] olan) 6'lı diziye karşılık gelen PCR amplifikasyonu oluşturulur. Şekil 1.4'te birinci adım, primer uzatma (TS) ve ikinci adım PCR amplifikasyonu (CX) gösterilmiştir.



Şekil 1.4. Standart TRAP (Burger'dan, 2002).

TRAP yöntemine, enzim aktivitesi miktarının belirlenmesinde hassasiyetin artması için varyasyonlar eklenmiştir (Aldous ve diğ., 2002). Orijinal telomeraz aktivitesi yöntemi, telomeraz inhibitörü içeren telomeraz pozitif örneklerle yalancı negatif sonuç verebiliyordu. Negatif örneklerin ayırt edilmesinde yaşanan bu sıkıntılar yüzünden yöntemde bazı varyasyonlara gidilmiştir (Emrich ve Karl, 2002). TRAP ayrıca, poliakrilamid jel elektroforezi (PAGE) ile radyoaktif olarak etiketlenen reaksiyon ürünlerinin analizini gerektirdiğinden ve bu durumun tehlikeli, zaman alıcı olmasının yanında örnek sayısını da sınırlamasından dolayı, TRAP-ELISA kombine yöntemi geliştirilmiştir.

TRAP-ELISA yöntemi, jel ile ayırma aşamasını atlar ve radyoaktif etiketleme yapılmayan ürünlerin telomeraz aktivitesinin tespit edilmesini sağlar. Bu yöntemde

enzim bağlı immünosorbent analizi (ELISA) kullanılır. TRAP-ELISA yöntemi ile çok sayıda ve eş zamanlı olarak elde edilen amplifikasyon ürününün hassas olarak analizi yapılabilmektedir (Emrich ve Karl, 2002).

2. MATERYAL ve YÖNTEM

Bu araştırma Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Merkez Laboratuvarı, Fen Edebiyat Fakültesi Biyokimya ve Spektroskopik Laboratuvarları'nda gerçekleştirilmiştir.

2.1. Materyal

2.1.1. Zebra balığı (*Danio rerio*) Sistematikteki Yeri

Danio rerio (Hamilton 1822).

Phylum	: Chordata
Subphylum	: Vertebrata
Superclassis	: Osteichthyes
Classis	: Actinopterygii
Subclassis	: Neopterygii
Ordo	: Cypriniformes
Familya	: Cyprinidae
Genus	: <i>Danio</i>
Species	: <i>Danio rerio</i>

(Froese ve Pauly, 2014).

2.1.2. Zebra balığı (*Danio Rerio*)'nın Genel Özellikleri

Zebra balığı (*Danio rerio*), sazan (*Cyprinus carpio*) ile aynı familyadandır (Cyprinidae). Zebra balığı 5 cm den küçük ve en fazla 5 yıl yaşam süresine sahiptir. 3-5 ay gibi kısa bir sürede cinsel olgunluğa ulaşırlar ve dişi başına yaklaşık 100-200 yumurta verebilirler (Kishi ve diğ., 2003). Balıkların gövdelerinde, kaudal ve anal yüzgeçlerinde çeşitli çizgiler bulunduğu gözlenmiştir.

2.1.3. Örneklerin Temin Edilmesi

İstanbul CES Akvaryumculuk Su Ürünleri Yem Sanayi ve Ticaret Limited Şirketi'nin 2014 yılında İstanbul Tesislerinde üretilmiştir. Adı geçen şirket ana ırk

ülkenin Güney Doğu Asya olduğunu, balıklarda bulaşıcı hastalık ve sağlık sorununun olmadığını menşei şahadetnamesi ile bildirmiş ve ayrıca balıkların sağlık sertifikası bu şirket tarafınca onaylanmıştır.

2.1.4. Çalışmada Kullanılan Araç ve Gereçler

Termal döngü cihazı (Biorad C1000 Touch), vorteks (Dragon Lab Mx-f), santrifüj (Universal 320), derin dondurucu (Arçelik), ultrasonikatör (Alex Machine), mikropilaka okuyucu (BioTek Epoch), spektrofotometre (PG T70 UV/VIS), mikropilaka çalkayıcı inkübatörü (Zhwy-2000) ve otoklav (Alp) kullanılmıştır.

2.1.5. Kullanılan Cam ve Plastik Malzemelerin Hazırlanması

Bu çalışmada kullanılan pipet uçları, ependorf ve PCR tüpleri, çözeltiler, cam malzemeler, makaslar, pensler ve ısıya dayanıklı diğer malzemeler çalışmaya başlamadan önce 121 °C' de 20 dk 1 atm basınçta otoklavlanarak sterilize edilmiştir.

2.1.6. Çalışmaya Başlamadan Önce Dikkat edilmesi Gerekenler

Çalışmaya başlanmadan önce DNaz/RNaz kontaminasyonuna engel olmak için çalışılan ortam, kullanılan malzeme ve kullanılan kit solüsyonlarına dikkat edilmiştir. Bu çalışmada, steril ultra saf su kullanılmıştır. Kit solüsyonları aliquotlara ayrılıp kontaminasyon riskine karşı laboratuardaki diğer reaktiflerden uzak tutulmuştur. Çalışmada kullanılacak malzemeler otoklavlanmıştır. Çalışma esnasında steril eldiven, maskeler ve filtreli pipet uçları kullanılmıştır.

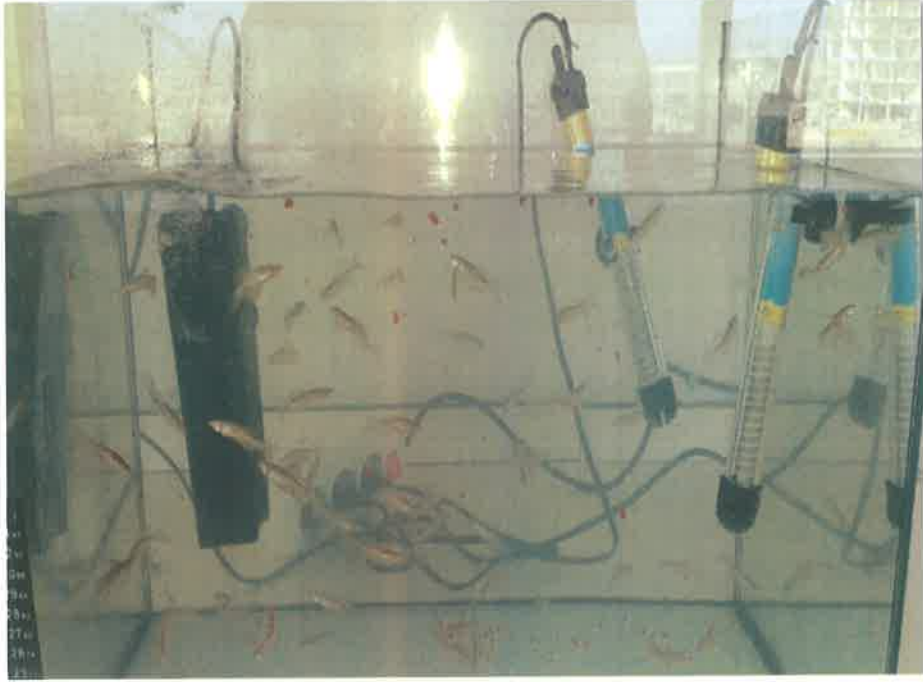
2.2. Yöntem

2.2.1. Örneklerin Muhafazası

Yavru ve ergin bireylere, deney hayvanları bakım prosedürleri uygulanmıştır. Balıklar 60x50x50 cm boyutlarında ve 3/2'si iki gün boyunca dinlendirilmiş musluk

suyu ile dolu akvaryumlarda yaşatılmıştır (Şekil 2.1). Akvaryumlarda havalandırma ve ısıtma sistemleri mevcuttur.

Deney hayvanlarının 10 gün süresince aklimatizasyonu sağlanmıştır. Aklimatizasyon esnasında su pH'sı 7,26 ve su sıcaklığı 26 ± 1 °C olarak ayarlanmıştır (Chow ve diğ., 2011). Balıklar her gün ticari pul yem ile beslenmiştir.



Şekil 2.1. Zebra balığı aklimatizasyon ortamı.

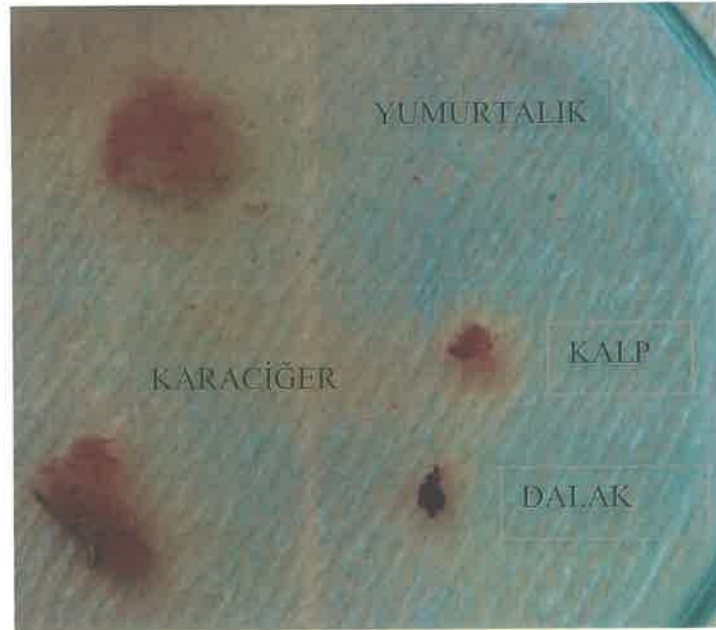
2.2.2. Balıkların Diseksiyonu

Bu çalışmada 15 ergin (5-6 aylık), 15 yavru (2 aylık) olmak üzere 30 Zebra balığı kullanılmıştır.

Vücut ağırlığı ve boy balık büyümesini tanımlamakta en yaygın kullanılan boyutlardır. Balıklarda ağırlık artışı ve boy büyümesi mutlak, oransal ve anlık büyüme gibi terimlerle ifade edilir. Bir organizmanın gelişmesinde çevresi ile ilişkisine bağlı birkaç safha vardır ve bu safhalarda büyümenin karakteri farklıdır. Türlerin kalıtsal

karakterleri olan minimum-maksimum vücut ağırlığı ve boy ilişkileri ve diğer karakterlerin (cinsi olgunluk- sekonder karakter) incelenmesi sonucu türler yavru ve ergin olarak ikiye ayrılır (İnnal, 2008).

Yavru ve ergin ayrımı, balıkların alındığı şirketin bildirmesinin yanında ayrıca diseksiyon işlemi sırasında da teyit edilmiştir. Yaklaşık 3 ayda cinsel olgunluğa erişen bu balıklarda testis veya yumurtalık çıkmayanlar yavru, çıkanlar ise ergin olarak doğrulanmıştır. 30 bireyin her birinden dalak, kalp, karaciğer ve ergin dişilerden ayrıca yumurtalık dokuları elde edilmiştir (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. Telomeraz aktivitesi ölçümünde kullanılan Zebra balığı dokuları

Diseksiyon öncesi balıklara buz anestezi uygulanmıştır. Şekil 2.3 ve 2.4'te görüldüğü gibi, baygın bireyler yan yatırılıp stereo mikroskop altında göz ve kaudal yüzgeç kısmından iğnelerle tutturulmuştur ve pens ve makas yardımıyla pektoral yüzgeci kesilerek daha sonra anal yüzgeç kısmına kadar o kısmın derisi soyulmuştur. Dişi bireylerde ilk olarak sarı ve yuvarlak biçimde gözükten yumurtalık açığa

çıkartılmıştır. Erişkin ve yavru bireylerden, sol pektoral yüzgece yakın ve solungaçların yakınındaki kalp; mide bağırsak sistemine çok yakın açık pembe renkte akışkan-cıvık kıvamlı karaciğer; karaciğere çok yakın ve koyu pembe renkte olan dalak balıktan alınmıştır (Gupta, T., Mullins, M.C., *Dissection of organs from the adult Zebra Fish protocol*. www.jove.com/video/1717/dissection-of-organ).



Şekil 2.3. Zebra balığının diseksiyon şekli.



Şekil 2.4. Zebra balığının diseksiyon işlemi.

Organlar pH 7,3 fosfat tamponu çözeltisinde perfüze edilmiştir. Her denekten çıkartılan organlar tampon çözeltisinden geçirilip daha sonraki işlemlerde kullanılmak için ependorf tüplerine alınmış ve kullanımlarına kadar -20 °C'de derin dondurucuda saklanmıştır.

2.2.3. Kit Prosedürünün Uygulanması

Bu çalışmada Roche Telomerase PCR-ELISA kiti kullanılmıştır. Kit prosedüründe yer alan talimatlar gerçekleştirilmiştir.

2.2.3.1. Doku Ekstraktlarının Hazırlanması

Ependorf tüpleri içindeki doku örneklerine 200 µL lizis solüsyonu eklenip ultrasonik parçalayıcıda toplamda 5 kez 30'ar sn tutulmuş ve her 30 sn'den sonra parçalayıcıdan çıkartılıp buz üzerinde 30 sn bekletilmiştir. Parçalama işleminden sonra lizat, 30 dakika boyunca buz üzerinde inkübe edilmiş, sonrasında 8500 rpm'de 20 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası 175 µL süpernatant temiz bir tüpe alınmıştır. PCR işlemine kadar derin dondurucuda saklanmıştır.

2.2.3.2. TRAP

Örnekler, yukarıda belirtilen şekilde telomerik kısımların çoğaltılması protokolü (TRAP) işlemine hazır hale getirilmiştir.

Kit içerisinde hazır halde bulunan reaksiyon karışım solüsyonu, PCR tüplerine konulmuş ve her tübe 3 µL hücre ekstraktı ilave edilmiştir. Pozitif kontroller için ise başlangıçta, 20 µL ultra saf su ile pozitif kontrol hücre ekstraktı solüsyonu seyreltilmiştir ve her pozitif kontrol için bu seyreltik solüsyon kullanılmıştır. Negatif kontrol, pozitif kontrol hücre ekstraktı solüsyonuna RNAaz eklenmesiyle hazırlanmıştır. Daha sonra tüm tüplere 22 µL ultra saf su eklenip PCR işlemi gerçekleştirilmiştir (Şekil 2.5).

Primer uzatma :	25 °C	20 dk
Telomeraz inaktivasyonu:	94 °C	5 dk
Amplifikasyon işlemi için ise;		
Denatürasyon:	94 °C	30 sn
Bağlanma (annealing):	50 °C	30 sn
Polimerizasyon:	72 °C	90 sn

Koyu yazılmış kısımlar 25 döngü olarak ayarlanmış ve son 10 dakika 72 °C'de son uzama gerçekleştirilerek PCR işlemi tamamlanmıştır. PCR ürünleri 4 °C'da bir sonraki gün ELISA prosedüründe kullanılmak üzere bekletilmiştir.



Şekil 2.5. TRAP işleminde kullanılan termal döngü cihazı.

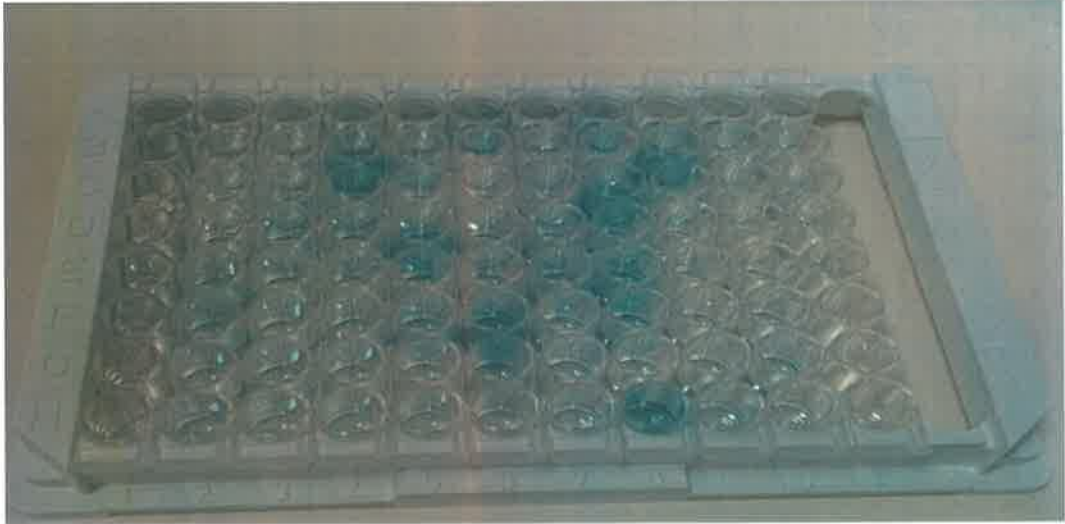
2.2.3.3. ELISA

Reaksiyon tüplerine 20 µL kitte hazır halde bulunan denatürasyon ayracı solüsyonu ile 5 µL amplifikasyon ürünü eklenmiştir. Karışım 10 dakika 25 °C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinden sonra tüplere 225 µL hibridizasyon tamponu eklenmiştir ve her bir tüp 15 sn kadar vortekslenmiştir.

Kitte bulunan mikroparka kuyucuklarına 100 µL bu karışımdan ilave edilmiştir ve çalkalamalı inkübatörde 37 °C 300 rpm'de inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra 250 µL yıkama solüsyonu (kullanmadan önce kitteki solüsyon 1:10 dilüe edilmiştir) ile tüm plaka 3 kez ve her yıkama sonrası 30 sn bekletilerek yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir.

Bu işlemlerden sonra her bir kuyucuğa anti-DIG-POD solüsyonu eklenmiştir ve 30 dk 25 °C de inkübasyon gerçekleştirilmiştir. (kitte hazırlanma talimatı olan anti-DIG-POD solüsyonu, 240 µL ultra saf su ile çözülmüştür bu stok solüsyondur, stok solüsyonu 1:5 olacak şekilde konjuge dilüsyon buffer ile çözülmüştür.)

İnkübasyon sonrası yine 5 kez yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. Yıkama işlemlerinden sonra kitle hazır halde bulunan TMB solüsyonundan her kuyucuğa 100 µL eklenmiştir ve mikropilaka 300 rpm'de 25 °C'de 15 dk inkübe edilmiştir (bu aşamada kuyucuklarda farklı tonlarda mavi olmak üzere renk değişimi olmuştur Şekil 2.6). Son olarak her kuyucuğa 100 µL stop solüsyonu da eklenmiştir ve (Başlangıçta oluşan kuyucuklardaki mavi tonları solüsyon eklenmesiyle sarı tonlarıyla değişmiştir.) 30 dk içinde 450 nm ve 690 nm'de mikro plaka okuyucu spektrofotometre ile 2 ölçüm gerçekleştirilmiştir.



Şekil 2.6. ELISA işlemi sonucu mikro plakadaki renk değişimi.

2.2.3.4. Bradford Yöntemi

Bradford Yöntemi kullanılarak, hücre ekstraktlarına protein tayini de yapılmıştır. Bunun için 40 µL örnek ve standartlar 3 mL Bradford çözeltisi ile karıştırılmıştır. 10 dk oda sıcaklığında inkübasyon sonrası 595 nm de spektrofotometre ile absorbans ölçümü yapılmıştır.

2.2.3.5. RTA'nın Hesaplanması

ELISA işleminden sonra mikropilaka okuyucu spektrofotometrede 450 nm ve 690 nm'deki absorbans sonuçları kullanılarak Relatif Telomeraz Aktivitesi (RTA) hesaplanmıştır.

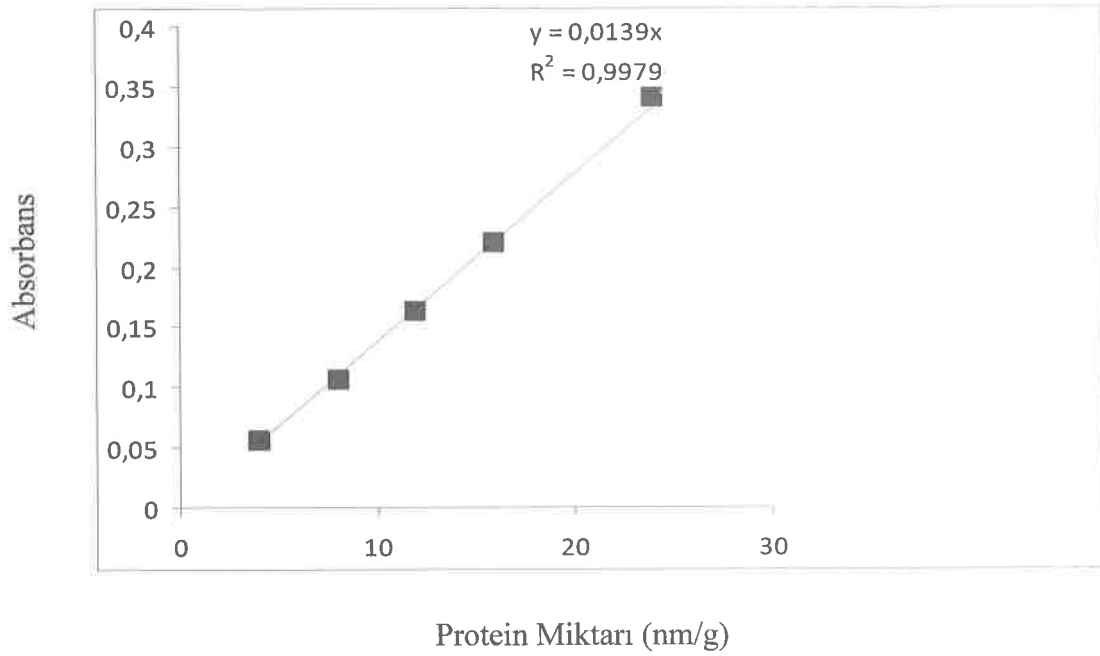
$$RTA = (\text{örnek } A_{450} - A_{690}) - (\text{Negatif Kontrol } A_{450} - A_{690}) * 100/\text{Protein miktarıdır.}$$

2.2.3.6. İstatistik

Minitab 13 programı kullanılarak Mann-Whitney Testi uygulanmış, $p < 0,05$ derecesinde olan farklılıklar anlamlı olarak kabul edilmiştir.

3. ARAŞTIRMA BULGULARI

Protein tayini için BSA ile yapılan standart grafik (Şekil 3.1) aşağıdaki gibi elde edilmiştir. Bu grafiğe göre her örnekteki protein miktarı hesaplanmıştır.



Şekil 3.1. Protein tayini standart grafiği

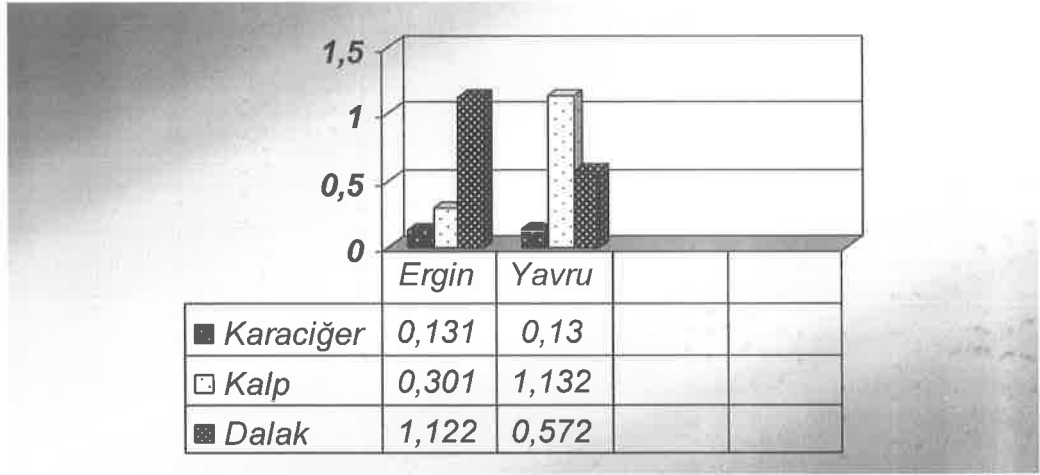
Örneklerden elde edilen protein miktarı sonuçları, RTA hesaplanmasında, materyal- yöntem kısmında açıklandığı şekliyle kullanılmıştır. Yapılan analizler sonucu elde edilen RTA değerleri ortalaması, minimum ve maksimum değerler ile standard hata değerleri aşağıdaki Çizelge 3.1’de gösterilmiştir.

Relatif telomeraz aktivitesi ergin bireylerde en yüksek dalakta, sonra sırasıyla kalp, karaciğer, yumurtalıklarda gözlenmiştir. Yavru bireylerde ise, en yüksek telomeraz aktivitesi kalpte, sonra sırasıyla dalakta ve karaciğerde tespit edilmiştir (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1. Bireylerin relatif telomeraz aktivitesi ortalamaları, minimum- maksimum değerler ve standard hata değerleri.

Hayat Evresi	Doku	RTA Ortalama	Minimum	Maksimum	Standard Hata
Ergin	Karaciğer	0,131	0,019	0,681	0,050
	Kalp	0,301	0,083	0,730	0,060
	Dalak	1,122	0,058	3,261	0,261
	Yumurta	0,078	0,027	0,163	0,025
Yavru	Karaciğer	0,130	0,043	0,384	0,032
	Kalp	1,132	0,218	7,504	0,507
	Dalak	0,572	0,056	2,821	0,206

Şekil 3.2'deki grafik incelendiğinde yavru ve ergin karaciğer dokusu ortalama telomeraz aktivitelerinin birbirine yakın değerlerde olduğu, aynı zamanda, ergin dalak dokusu ile yavru kalp dokusunun da birbirine yakın değerlere sahip olduğu görülmektedir. Ergin ve yavru dalak dokuları ile ergin ve yavru kalp dokuları ortalama telomeraz aktiviteleri değerleri arasındaki farklılıklar ise fazladır.



Şekil 3.2. Yavru ve ergin grupların kalp, karaciğer ve dalaklarında ortalama telomeraz aktivitesi değerleri grafiği.

Minitab istatistik programında Mann-Whitney Testi, grupların telomeraz aktivitelerindeki farklılığı karşılaştırmak için kullanılmıştır.

Çizelge 3.2’de de görüldüğü gibi ergin bireylerde karaciğer ve yumurtalık dokularının RTA değerleri arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildir. Karaciğer ile kalp dokusu ve karaciğer ile dalak dokusunun RTA değerleri arasındaki fark ise istatistiksel olarak anlamlıdır ve karaciğer bu her iki dokudan da daha düşük telomeraz aktivitesi gösterir. Kalp ile dalak dokusu ve kalp ile yumurtalık dokusu karşılaştırıldığında da, RTA değerleri arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulunmuştur. Dalak dokusu ve yumurtalık dokusu değerleri arasında da benzer bir farklılık vardır ve dalak dokusu, incelenen tüm ergin dokuları arasında en yüksek RTA’ne sahip olan dokudur.

Çizelge 3.2. Ergin grupların dokularında telomeraz aktivitesinin karşılaştırılmasında p değerleri.

Ergin Grupların Telomeraz Aktivitesi Karşılaştırılması	p Değeri
Ergin Karaciğer ve Ergin Kalp	0,0071
Ergin Karaciğer ve Ergin Dalak	0,0002
Ergin Kalp ve Ergin Dalak	0,0233
Ergin Karaciğer ve Ergin Yumurtalık	1,0000
Ergin Kalp ve Ergin Yumurtalık	0,0098
Ergin Dalak ve Ergin Yumurtalık	0,0023

Çizelge 3.3.'te de görüldüğü gibi yavru bireylerde kalp ve dalak dokularının RTA değerleri arasındaki fark $p < 0,05$ düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı değildir. Karaciğer ile kalp ve dalak dokularının RTA değerleri arasındaki fark ise istatistiksel olarak anlamlıdır. En yüksek telomeraz aktivitesi kalpte, sonra sırasıyla dalakta ve karaciğerde tespit edilmiştir.

Çizelge 3.3. Yavru grupların dokularında telomeraz aktivitesinin karşılaştırılmasında p değerleri.

Yavru Grupların Telomeraz Aktivitesi Karşılaştırılması	p Değeri
Yavru Karaciğer ve Yavru Kalp	0,0002
Yavru Karaciğer ve Yavru Dalak	0,0051
Yavru Kalp ve Yavru Dalak	0,1667

Çizelge 3.4'te görüldüğü gibi, ergin kalp dokusundaki RTA yavru kalp dokusundaki RTA değerlerine göre istatistiksel olarak anlamlı derecede düşüktür. Fakat karaciğer ve dalak dokularının RTA değerleri arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildir.

Çizelge 3.4. Yavru ve ergin grupların aynı dokularında telomeraz aktivitesinin karşılaştırılmasında p değerleri.

Yavru ve Ergin Grupların Aynı Dokularında Telomeraz Aktivitesi Karşılaştırılması	p Değeri
Ergin Karaciğer ve Yavru Karaciğer	0,468
Ergin Kalp ve Yavru Kalp	0,0146
Ergin Dalak ve Yavru Dalak	0,0800

4. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu tez çalışmasında Zebra balığı (*D. rerio*)'nın ergin ve yavrularında kalp, karaciğer, dalak ve dişi erginlerde ayrıca yumurtalık dokularında telomeraz aktivitesinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Omurgalıların telomer uzunlukları ve telomeraz ifadesini araştırmak insanlarda hüresel yaşlanma ve kanser araştırmaları için önem taşımaktadır (Downs ve diğ., 2012). Telomeraz, insan embriyonik hücrelerinde aktif olan, fakat etkinliği genellikle somatik hücre farklılaşması sırasında zayıflayan bir enzimdir (Blasco, 2007; Pfennig ve diğ., 2007).

İnsan somatik hücrelerinde kromozom uçlarındaki telomer yapısının kısılması ve bu kısılmanın devam etmesi, insanda doku rejeneratif yeteneğinin kısıtlanmasına katkıda bulunur. İnsan somatik hücrelerinin projenitörleri (ataları) kök hücrelerdir, kendi kendilerini yenileyebilme özellikleri bulunur, doku onarımından sorumludurlar. Kök hücrelerin bu özelliklerinden dolayı telomeraza ihtiyaç duyulur. Ayrıca telomeraz enzimi ifade etme yeteneği bulunan birçok kanser hücresinde, sürekli hücre bölünmesi mümkün olduğundan yapısal olarak ölümsüzdürler (Lund ve diğ., 2009).

İnsan organlarının hasarı ya da doku kaybı durumlarında iyileşme ve rejenerasyon için sınırlı bir yeteneği olmasına rağmen, Zebra balığı dokuları ileri yaş için olağanüstü rejeneratif yeteneklerini korur (Anchelin ve diğ., 2011). Zebra balığının çeşitli dokularında telomeraz aktivitesi bulunmaktadır fakat yine de telomerleri yaş ile birlikte kısalır. İnsanlarda olduğu gibi, Zebra balığı somatik hücrelerindeki telomeraz aktivitesi, telomer kısılmasını önlemek için yeterli değildir (Henriques ve diğ., 2012). Ayrıca, Zebra balığı embriyolarında, yaşlı veya yetişkin somatik dokularına göre telomeraz aktivitesi daha fazladır. Dokuların rejenerere olma yeteneği her yaşta olmasına rağmen yaşlı bireylerde rejenerasyonun daha geç olduğu gözlenmiştir. (Anchelin ve diğ., 2011).

Zebra balığı, genlerin tanımlanması ve karakterizasyonunda, organ fonksiyonu, davranış ve hastalık dahil biyokimyasal yolların belirlenmesinde önemli katkılar yapar ve bu nedenle köklü bir model organizma haline gelmiştir. ZFIN veri tabanı bir merkezi depo sağlayarak Zebra balığı ile ilgili genler, genetik belirteçler, haritalama panelleri, genomik kaynaklar, yayınlar ve toplu iletişim bilgi bağlantıları içererek Zebra balığı araştırma verileri için web tabanlı bir sorgu arayüzü sağlar. Bu başarılı veri seli

yönetimi, diğer model organizmalar ve insanlardaki araştırmalar sonucu oluşturulan çok miktarda bilgilerin bu verilere entegrasyonu ile meydana gelmiştir (Sprague ve diğ., 2005).

Bunların yanı sıra Zebra balığı umut verici bir kanser modeli olmuştur. Zebra balığı ve insan tümör moleküllerinin benzerliği araştırılmıştır. Genetik yöntemler ve mikroarray sonuçlarından elde edilen veriler bu konuda kullanılmaktadır. Yapılan bazı çalışmalarda Zebra balığı ve insan neoplazi ve tümörlerinde benzerlikler bulunmuştur. Zebra balığı mikroarray verileri kullanılarak insan kanserleri modellenmesi ve onkogenomik çalışmalar yapılmaktadır. Zebra balığı da çeşitli kimyasal karsinojenlere duyarlıdır ve insan ve memeli kanserlerine histopatolojik benzerlik göstererek çeşitli dokularında pek çok tümör türlerini üretir. Genetik olarak manipüle edildikten sonra kansere eğilimli bu balıklar, kanser ilaçlarının incelenmesi ve kanser tedavilerinin keşfi için de kullanılabilir (Lam ve diğ., 2006).

Japon Medaka balığının genom boyutu (700 Mb), insan genomunun dörtte biri, Zebra balığı genomunun ise yarısıdır (Kasahara ve diğ., 2007). Pfennig ve diğ., (2007) Japon Medaka (*Oryzias latipes*) ile yaptıkları çalışmada ergin balıkların beyin ve gonadlarında tert ifadesinin yüksek olduğu, tert ifadesiyle telomeraz enzimi arasında güçlü bir korelasyon ve insan somatik hücrelerine göre dokularında daha yüksek telomeraz aktivitesinin olduğunu bildirmişlerdir. Testis, yumurtalık, beyin ve kalp dokularının telomeraz aktivitelerini ölçmüşler; gonad ve beyin dokularında yüksek telomeraz aktivitesinin olduğunu, kalpte ise diğelerine göre daha düşük seviyede aktivite olduğunu belirlemişlerdir.

Lund ve diğ., (2009) 3,6,9 aylık ve 2 yaşındaki Zebra balıklarının kalp, solungaç, böbrek, dalak, karaciğer ve bağırsak dokularıyla yapmış oldukları çalışmada bu dokulardaki telomer uzunluğunun birbirine yakın olduğunu bildirmişlerdir. Hatta karaciğerde telomerlerin yaşla birlikte kısalmadığını bu çalışmada tespit etmişlerdir. Telomer uzunluğunun rejeneratif yetenek için gerekli olduğunu belirtmişler ve TRAP testiyle yapmış oldukları telomeraz aktivitesi ölçümünde 2 yaşındaki bireylerde de telomeraz aktivitesinin olduğunu bulmuşlardır. Doku ve kuyruk rejenerasyonunun bu balıklarda çok güçlü olması sebebiyle, telomer kısalmasını engellemek için, bu balıkların telomeraz aktivitesini muhafaza ettiği düşünölmektedir. Yaşa bağlı olarak dokulardaki telomeraz aktivitesinin en yüksekten düşöğüğe doğru dalak, kalp, karaciğer,

bağırsak, beyin ve solungaçlar şeklinde olduğunu yapılan ölçümler sonucu bildirmişlerdir.

Lund ve diğ. (2009) sonuçlarıyla bu tez çalışmasının sonuçları benzerlik göstermektedir. Bu tez çalışmasında da ergin (5 aylık) bireylerin telomeraz aktivitesi en yüksek dalak dokusunda ve sonra sırasıyla kalp ve karaciğerde gözlenmiştir.

Zebra balıklarında lenf nodülleri bulunmaz. Dalak ve böbrek, lenf nodüllerinin görevini üstlenir. Monosit ve gerektiğinde monositlerden oluşan makrofajlar ve lenfositler, lökositleri oluşturur. Bu kan hücresi tipleri, Zebra balığı dalağında çok fazla bulunur. Bu balıklardaki dalak, böbrek ile birlikte kusurlu kan hücreleri ve vücuttaki yabancı ajanları ortadan kaldırılmak için önemli bir filtreleme sağlar. Ayrıca Zebra balığı dalağı, az sayıda olgunlaşmamış, daha çok ise farklılaşan olgun kırmızı kan hücrelerinden oluşur ve bu hücrelerin vücuda geri kazanımından sorumludur (Menke ve diğ., 2011). Dalağın yapısı ve kan yapımı ile ilgili bu görevleri düşünüldüğünde bu tez çalışmasında dalak dokusunda telomeraz aktivitesinin yüksek bulunması normal bir sonuçtur.

Memeli karaciğerine benzer şekilde teleost balıklarda da karaciğer, vücudun metabolik homeostasisinde görevlidir. Karbonhidrat, protein ve lipit metabolizması, vitaminlerin depo edilmesi, albümin, fibrinojen proteinleri ve serum proteinlerinin sentezini ve detoksifikasyonu gerçekleştirir (Menke ve diğ., 2011). Zebra balığında karaciğerin rejenerasyonunu gösteren makaleler literatürde mevcuttur (Sadler ve diğ., 2007; Kan ve diğ., 2009). Karaciğerde telomeraz enziminin varlığı, bu rejenerasyon için gereklidir.

Deneylerimiz sonunda hem yavru hem ergin balıklarda, kalp dokusunda oldukça yüksek bir telomeraz aktivitesi gözlenmiştir. Poss ve diğ., (2002) 2 yaşındaki amputasyona uğratılmış Zebra balığı kalbinde 60 gün sonra (yüzey alanı ölçümü ve kalp kasılmasının incelenmesi ile) kalbin tamamen eski haline döndüğünü yapmış oldukları çalışmada görmüşlerdir. Çalışma sonunda kalbin mekanik hasara rağmen hiçbir iz kalmadan rejenere olduğu sonucuna varmışlardır. İnsanlarda oluşan kalp hastalıklarını (miyokard infarktüs gibi) iyileştirmek için Zebra balığı kalbinin rejenerasyon yeteneği umut vermektedir. Kukich (2014) ile Major ve Poss (2007) bu konuda yaptıkları çalışmalarda, Zebra balığı kalbinin çok yüksek rejenerasyon yeteneğini doğrulamışlardır. Bizim çalışmamızda kalpte tespit edilen yüksek telomeraz aktivitesi, bu yüksek rejenerasyon yeteneği ile bağlantılı olabilir.

Anchelin ve diğ., (2011) yaptıkları çalışmada 2, 6, 12 ve 30 aylık ve 4 farklı genotipte Zebra balığı kullanmışlardır. Göz, kas, yumurtalık, deri ve solungaç dokularında telomeraz aktivitesi ölçmüşlerdir. Telomeraz aktivitesini 30 aylık balıklar da dahil olmak üzere tüm gruplarda tespit etmişler fakat yaşlı balıkların kas dışındaki dokularında telomeraz ifadesinde bir azalma olduğunu gözlemlemişlerdir. Bu tez çalışmasında ise ergin ve yavruların karaciğer ve dalak dokularındaki telomeraz aktivitesinde istatistiksel olarak farklılık gözlenmemiş fakat kalpteki telomeraz aktivitesinin erginlerde, yavrulara göre düştüğü bulunmuştur.

Canlılarda telomeraz aktivitesinin kanser hastalığı, yaşlanma ve doku rejenerasyonu ile ilgili çalışmalarda büyük önem arz ettiği düşünüldüğünde, bu enzimle ilgili çalışmaların gittikçe hız kazanması kaçınılmazdır.

İnsanların çeşitli deneysel uygulamalarda model organizma olarak kullanılmayacağı gerçeği göz önüne alındığında, metabolizmaları insana benzeyen model organizmaların çeşitli yönlerden araştırılması gerekliliği doğmuştur.

Zebra balığının farklı dokularında telomeraz aktivitelerinin tespit edilmesi ile ilgili literatürde sınırlı sayıda makale vardır. Zebra balığı, telomer ve telomeraz çalışmalarında çok önemli bir yer tuttuğu için bu tez çalışmasında, çeşitli dokularındaki telomeraz aktivitesi farklılıklarının yaş ile birlikte değerlendirilerek ortaya koyulmuş olması literatüre büyük fayda sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

- Aldous, W.K., Marean, A.J., DeHart, M.J. Moore, K.H., 2002. Fluorescent Detection of Telomerase Activity. In: Double, J.A. ve Thompson M.J. Eds. *Telomere and, Telomerase Methods and Protocols*. Humana Pres, Totowa, New jersey. 191, 137- 146.
- Anchelin, M., Murcia, L., Perez, F.A., Navarro, E.M.G., Cayuela, M.L., 2011. Behaviour of telomere and telomerase during aging and regeneration in Zebrafish. *Plos one*, 6(2), 16955-16959.
- Anchelin, M., Perez, F.A., Martinez, C.M., Garcia, M.B., Mulero, V., Cayuela, M.L., 2012. Premature aging in telomerase- deficient zebrafish. *Disease Models & Mechanism*, 6,1101-1102.
- Artandi, S.E., Depinho, R.A., 2009. Telomeres and telomerase in cancer. *Carcinogenesis*, 31(1), 9-18.
- Autexier, C., 2008. POT of gold: Modeling dyskeratosis congenita in the mouse. *Genes Dev*, 22, 1731-1736.
- Blackburn, E H., 1991. Structure and function of telomeres. *Natur.*,350, 569–573.
- Blackburn, E.H., 2001 Switching and Signaling at the Telomere Review. *Cell*, 106, 661–673.
- Blasco, M. A., 2007. Telomere length, stem cells and aging. *Nat.Chem. Biol*, 3, 640–649.
- Becker, C. G. and Becker, T., 2007. Growth and pathfinding of regenerating axons in the optic projection of adult fish. *J. Neurosci. Res*, 85, 2793-2799.
- Bibby, M.C., 2002 Introduction to telomeres and Telomerase. In: Double, J.A. ve Thompson M.J. Eds. *Telomere and Telomerase Methods and Protocols*. Humana Pres, Totowa, New Jersey. 191, 1-12.
- Broccoli, D., Smogorzewska, A., Chong, L., De Lange T., 1997. Human telomeres contain two distinct Myb-related proteins, TRF1 and TRF2. *Nature Genetics*, 17, 231-235.
- Burger, A.M., 2002. Standard TRAP Assay. In: Double, J.A. ve Thompson M.J. Eds. *Telomere and, Telomerase Methods and Protocols*. Humana Pres, Totowa, New Jersey. 191, 109-124.
- Buseman, C.M., Wright, W.E., Shay, J.W., 2011. Is telomerase viable target in cancer. *Mutat. Res*, 730 (1-2), 90-97.
- Cairney, C. J., Keith, W. N., 2008. Telomerase redefined: Integrated regulation of hTR and hTERT for telomere maintenance and telomerase activity. *Biochimie*, 90, 13–23.
- Chau, M.N., ElTony, L.H., Jagadeesh, S., Banerjee, P.P., 2007. Physiologically achievable concentrations of genistein enhance telomerase activity in prostate cancer cells via the activation of STAT3. *Carcinogenesis*, 28(11), 2282-2290.
- Chow, W.S., Chan, W. Ka-L., Chan, K.M., 2011. Toxicity assessment and vitellogenin expression in zebrafish (*Danio rerio*) embryos and larvae acutely exposed to bisphenol A, endosulfan, heptachlor, methoxychlor and tetrabromobisphenol A. *J.Appl.Toxicol*, 33, 670-678.
- Cohn, M. and Blackburn, E. H., 1995. Telomerase in yeast. *Science*, 269, 396-400.

- Chong, L., Van Steensel, B., Broccoli, D., Erdjument, B.H., Hanish, J., Tempst, P., De Lange, T., 1995. A human telomeric protein. *Science*, 270, 1663-1667.
- De Lange T, Shiue L, Myers RM., 1990. Structure and variability of human chromosome ends. *Mol. Cell Biol*, 10, 518–527.
- Downs, P.D., Shen, Y., Pasquali, A., Beldorth, I., Savage, M., Gallier, K., Garcia, T., Booth, R.E., Walter, R.B., 2012. Characterization of telomeres and telomerase expression in *Xiphophorus*. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, 155(1), 89–94.
- Dubrano, K., Perrod, S., Gasser, S.M., 2001. Turning Telomerase Off and On. *Curr. Opin. Cell Biology*, 13, 281-289.
- Dufourcq, P., Roussigne, M., Blader, P., Rosa, F., Peyrieras, N. and Vríz, S., 2006. Mechano-sensory organ regeneration in adults: the zebrafish lateral line as a model. *Mol. Cell. Neurosci*, 33, 180-187.
- Emrich, T., Karl, G., 2002. Nonradioactive Detection of Telomerase Activity Using a PCR-ELISA-Based Telomeric Repeat Amplification Protocol. In: Double, J.A. ve Thompson M.J. Eds. *Telomere and, Telomerase Methods and Protocols*. Humana Pres, Totowa, New Jersey. 191, 147-158.
- Fitzgerald, M. S., Riha, K., Gao, F., Ren, S., McKnight, T. D. and Shippen, D. E., 1999. Disruption of the telomerase catalytic subunit gene from Arabidopsis inactivates telomerase and leads to a slow loss of telomeric DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96, 14813-14818.
- Flores, I., Cayuela, M.L., Blasco, M.A., 2005. Effects of telomerase and telomere length on epidermal stem cell behavior. *Science*, 309, 1253–1256.
- Frose, R., Pauly, D., 2014 FishBase (version8/2014) <http://www.fishbase.org>.
- Greider, C.W., 1998. Telomerase activity, cell proliferation, and cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 90–92.
- Greider, W.E., Blackburn, E., 2009. Telomeres, Telomerase and Cancer. *Scientifica America* 1, 98-101.
- Goytisolo, F. A. and Blasco, M. A., 2002. Many ways to telomere dysfunction: in vivo studies using mouse models. *Oncogene*, 21, 584-591.
- Gunes, Ç., Rudolph, K.L., 2013. The role of telomeres in stem cells and cancer. *Cell*, 152, 390-393.
- Gupta, T., Mullins, M.C., (3 Nisan 2010). *Dissection of organs from the adult Zebra Fish protocol*, 15 Aralık 2014, www.jove.com/video/1717/dissection-of-organ.
- Harley, C. B., Futcher, A. B. and Greider, C. W., 1990. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature*, 345, 458-460.
- Henriques, C.M., Carneiro, M.C., Tenente, I. M., JAcinto, A., Ferreira, M.G., 2012. Telomerase is required for Zebrafish lifespan. *Plos Genet*, 9(1), doi: 10.1371/1003214-9-1.
- Hitchcock, P. F. and Raymond, P. A., 2004. The teleost retina as a model for developmental and regeneration biology. *Zebrafish*, 1, 257-271.
- Holt, S.E., Shay, J.W., 1999. Role of telomerase in cellular proliferation and cancer. *J. Cell Physiol*, 180, 10–18.
- Itou, J., Kawakami, H., Burgoyne, T., Kawakami, Y., 2012. Life-long preservation of the regenerative capacity in the fin and heart in zebrafish. *Biology Open*, 1, 739–746.

- Innal, D., 2008. Aksu ve Köprüçay nehirlerinin acısu zonunda yaşayan balık tür çeşitliliğinin karşılaştırılması. Doktora Tezi. Hacettepe Üniversitesi Fen bilimleri Enstitüsü.
- Kan, N. G., Junghans, D. and Izpisua Belmonte, J. C., 2009. Compensatory growth mechanisms regulated by BMP and FGF signaling mediate liver regeneration in zebrafish after partial hepatectomy. *Faseb J*, 23, 3516-3525.
- Kasahara, M., Naruse, K., Sasaki, S., 2007. The medaka draft genome and insights into vertebrate genome evolution. *Nature*, 447, 714–719.
- Katunarić, M., Zamolo, G., 2012. Modulating telomerase activity in tumor patients by targeting dyskerin binding site for hTR. *Medical Hypotheses*, 79, 319–320.
- Kawakami, Y., Rodriguez Esteban, C., Raya, M., Kawakami, H., Martí, M., Dubova, I. and Izpisua Belmonte, J. C., 2006. Wnt/beta-catenin signaling regulates vertebrate limb regeneration. *Genes Dev*, 20, 3232-3237.
- Kim, N.W., Piatyszek M.A., Prowse, K.R., Harley, C.B., West, M.D., Ho, P.L., Coviello, G.M., Wright, W.E., Weinrich, S.L., Shay, J.W., 1994. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science*, 266, 2011–2015.
- Kishi, S., Uchiyama, J., Baughman, A.M., Goto, T., Lin, M.C., Tsai, S.B. 2003. The zebrafish as a vertebrate model of functional aging and very gradual senescence. *Experimental Gerontology*, 38, 777-786.
- Kikuchi, K., 2014. Advances in understanding the mechanism of zebrafish heart regeneration. *Stem Cell Research*, 13, 542–555.
- Lam, H.S., Gong, Z., 2006. Modeling liver cancer using Zebrafish. *Cell Cycle*, 5, (6) 573-577.
- Lau, B.W., Wong, A.O., Tsao, G.S., So, K.F., Yip, H. K., 2008. Molecular cloning and characterization of the zebrafish (*Danio rerio*) telomerase catalytic subunit (telomerase reverse transcriptase, TERT). *J. Mol. Neurosci*, 34, 63-75.
- LeClair, E. E. and Topczewski, J., 2010. Development and regeneration of the zebrafish maxillary barbel: a novel study system for vertebrate tissue growth and repair. *Plos one*, 5, (1) doi: 10.1371/journal.pone.0011511
- Legassie, J.D., Jarstfer, M.B. 2005. Telomerase as a DNA dependent polymerase. *Biochemistry*, 44, 14191–14201.
- Liu, Q., Azodi, E., Kerstetter, A. E. and Wilson, A. L., 2004. Cadherin-2 and cadherin-4 in developing, adult and regenerating zebrafish cerebellum. *Brain Res. Dev. Brain Res*, 150, 63-71.
- Lluis, M., Sola, J.F., Bel, S.C., Sacanella, E., Estruch, R., Marquez A.U., 2010. Pharmacology and cell metabolism. *Alcohol and Alcoholism*, 46(5), 534-541.
- Lund, T.C., Glas, T.J., Tolar, J., Blazar, B.R., 2009. Expression of telomerase and telomere length are unaffected by either age or limb regeneration in *Danio rerio*. *Plos one*, 4(11), doi: 10.1371/journal.pone.0041111
- Ma, E. Y., Rubel, E. W. and Raible, D. W., 2008. Notch signaling regulates the extent of hair cell regeneration in the zebrafish lateral line. *J. Neurosci*, 28, 2261- 2273.
- Major, R.J., Poss, K. D., 2007. Zebrafish heart regeneration as a model for cardiac tissue repair. *Drug Discov Today Dis Models*, 4(4), 219–225.

- Menke, A.L., Spitsbergen, J.M., Woterbeek, A.P.M., Woutersen, R.A., 2011. Normal anatomy and histology of the adult Zebrafish. *Toxicologic Pathology*, 39, 759-775.
- Morgan, T. H., 1900. Regeneration in teleosts. *Dev. Genes Evol*, 10, 120-134.
- Nachtrab, G., Czerwinski, M. and Poss, K. D., 2011. Sexually dimorphic fin regeneration in zebrafish controlled by androgen/GSK3 signaling. *Curr. Biol*, 21, 1912-1917.
- Pardue, M.L., DeBaryshe, P.G., 1999. *Drosophila* telomeres: Two transposable elements with important roles in chromosomes. *Genetica*, 107, 189-196.
- Pérez, F.M., Mulero, V., Cayuela, M.L., 2008. Application of the dual-luciferase reporter assay to the analysis of promoter activity in Zebrafish embryos. *BMC Biotechnol*, doi: 10.186/1472-6750 8-81.
- Pfennig, F., Kind, B., Zieschang, F., Busch, M., Gutzeit, H.O., 2007. Tert expression and telomerase activity in gonads and somatic cells of the Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Growth Differ*, 50, 131-141.
- Pinkel, D., Landegent, J., Collins, C., Fuscoe, J., Segraves, R., Lukas, J., Gray, J., 1988. Fluorescence in situ hybridization with human chromosome-specific libraries: Detection of trisomy 21 and translocations of chromosome 4. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85, 9138-9142.
- Poss, K. D., Wilson, L. G. and Keating, M. T., 2002. Heart regeneration in zebrafish. *Science*, 298, 2188-2190.
- Raya, A., Koth, C. M., Buscher, D., Kawakami, Y., Itoh, T., Raya, R. M., Sternik, G., Tsai, H. J., Rodriguez-Esteban, C. and Izpisua-Belmonte, J. C., 2003. Activation of Notch signaling pathway precedes heart regeneration in zebrafish. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100, 1, 11889-11895.
- Riethman, H.C., Xiang, Z., Paul, S., Morse, E., Hu, X.L., Flint, J., Chi, H. C., Grady, D. L., Moyzis, R.K., 2001. Integration of telomere sequences with the draft human genome sequence. *Science*, 409, 948-950.
- Sadler, K. C., Krahn, K. N., Gaur, N. A. and Ukomadu, C., 2007. Liver growth in the embryo and during liver regeneration in zebrafish requires the cell cycle regulator. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104, 1570-1575.
- Santamaria, J. A., Becerra, J. 1991. Tail fin regeneration in teleosts: cell-extracellular matrix interaction in blastemal differentiation. *J. Anat.* 176, 9-21.
- Savoysky, E., Akamatsu, K., Tsuchiya, M., Yamazaki, T., 1995. Detection of telomerase activity by combination of TRAP method and scintillation proximity assay (SPA). *Nucleic acids research*, 24(6), 1175-1176.
- Shay, J.W., Reddel, R.R., Wright, W.E., 2012. Cancer and telomeres an alternative to telomerase. *Science*, 336, 1388-1390.
- Sprague, J., Clements, D., Conlin, T., Edwards, P., Frazer, K., Schaper, K., Segerdell, E., Song, P., Sprunger, B., Westerfield, M., 2003. The Zebrafish Information Network (ZFIN): The zebrafish model organism database. *Nucleic Acids Reserches*, 31, 241-243.
- Sprague, J., Bayraktaroglu, L., Clements, D., Conlin, T., Fashena, D., Frazer, K., Haendel, M., Howe, D.G., Mani, P., Ramachandran, S., Schaper, K., Segerdell, E., Song, P., Sprunger, B., Taylor, S., Slyke, C.E.V., Westerfield, M., 2005. The Zebrafish Information Network: The zebrafish model organism database. *Nucleic Acids Reserches*, 34, 581-585.

- Stewart, S.A., Weinberg, R.A., 2006. Telomeres: Cancer to human aging. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol*, 22, 531–557.
- Swanberg, S. E., O'Hare, T. H., Robb, E. A., Robinson, C. M., Chang, H. and Delany, M. E., 2010. Telomere biology of the chicken: a model for aging research. *Exp. Gerontol*, 45, 647-654.
- Wicky, C., Villeneuve, A. M., Lauper, N., Codourey, L., Tobler, H. and Müller, F., 1996. Telomeric repeats (TTAGGC)_n are sufficient for chromosome capping function in *Caenorhabditis elegans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93, 8983-8988.
- Xie, M., Mosig, A., Qi, X., Li, Y., Stadler, P.F., Chen, J.J.L., 2008. Structure and Function of the Smallest Vertebrate Telomerase RNA from Teleost Fish. *The Journal of Biological*, 283(4), 2049–2059.
- Xie, Y., Yang, D., He, Q., Songyang, Z., 2010. Zebrafish as a Model System to Study the Physiological Function of Telomeric Protein TPP1. *Plos one*, doi: 10.1371/16440-6-2.
- Yang, J., He, S., Li, S., Zhang, R., Peng, A., Chen, L., 2013. *In vitro* and *In vivo* antiangiogenic activity of caged polyprenylated xanthenes isolated from *Garcinia hanburyi* hook. f. *Molecules*, 18, 15305-15313.
- Yap, W. H., Yeoh, E., Brenner, S., Venkatesh, B., 2005. Cloning and expression of the reverse transcriptase component of pufferfish (*Fugu rubripes*) telomerase. *Gene*, 353, 207–217.
- Yu, R. M., Chen, E. X., Kong, R. Y., Ng, P. K., Mok, H. O., Au, D. W., 2006. Hypoxia induces telomerase reverse transcriptase (TERT) gene expression in non-tumor fish tissues in vivo: the marine medaka (*Oryzias melastigma*) model. *BMC Mol. Biol*, 7, 27 doi: 10.1186/1471-2199-7-27.

ÖZGEÇMİŞ

Adı ve Soyadı: Hülya YILDIZ

Doğum Yeri ve Yılı: Bursa- 08.06.1987

Medeni Hali: Bekar

Yabancı Dili: İngilizce



Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise: Bursa Ertuğrulgazi Lisesi, 2001-2004

Lisans: Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Biyoloji Bölümü, 2008-2012

Yüksek Lisans: Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Biyoloji Bölümü, 2012- Devam