

**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

***DESMA* MUTANT ZEBRA BALIĞI MODELİNDE
TEDAVİ AMAÇLI XMU-MP- 1 UYGULAMASI**

Zeynep ÇİNAR

**Tıbbi Biyoloji Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

ANKARA

2021

**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

***DESMA* MUTANT ZEBRA BALIĞI MODELİNDE
TEDAVİ AMAÇLI XMU-MP- 1 UYGULAMASI**

Zeynep ÇİNAR

**Tıbbi Biyoloji Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Pervin DİNÇER**

**ANKARA
2021**

ONAY SAYFASI

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Desma Mutant Zebra Balığı Modelinde Tedavi Amaçlı XMU-MP-1 Uygulaması

Öğrenci: Zeynep Çınar

Danışman: Prof.Dr.Pervin Dinçer

Bu tez çalışması 12.02.2021 tarihinde jürimiz tarafından "Tıbbi Biyoloji AD Yüksek Lisans Programı" nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: Doç.Dr. Özlen Konu Karakayalı
Bilkent Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik

Tez Danışmanı: Prof.Dr.Pervin Dinçer
Hacettepe Üniversitesi Tıbbi Biyoloji AD

Üye: Doç. Dr. Hatice Güneş Özhan
Dokuz Eylül Üniversitesi Biyotıp ve Sağlık Teknolojileri A.D.

Üye: Doç. Dr. Gamze Bora
Hacettepe Üniversitesi Tıbbi Biyoloji AD

Üye: Dr. Öğr.Üyesi Suat Sarı
Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fak., Farmasotik Kimya A.D.

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun bulunmuştur.

04 Mart 2021

Prof. Dr. Diclehan Orhan

Enstitü Müdürü

YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

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

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

Yükseköğretim Kurulu tarafından yayınlanan “**Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge**” kapsamında tezim aşağıda belirtilen koşullar haricince YÖK Ulusal Tez Merkezi / H.Ü. Kütüphaneleri Açık Erişim Sisteminde erişime açılır.

- Enstitü / Fakülte yönetim kurulu kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 2 yıl ertelenmiştir. ⁽¹⁾
- Enstitü / Fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 6 ay ertelenmiştir. ⁽²⁾
- Tezimle ilgili gizlilik kararı verilmiştir

12/02/2021

Zeynep ÇINAR

1 “*Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge*”

- (1) *Madde 6. 1. Lisansüstü teze ilgili patent başvurusu yapılması veya patent alma sürecinin devam etmesi durumunda, tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulu iki yıl süre ile tezin erişime açılmasının ertelenmesine karar verebilir.*
- (2) *Madde 6. 2. Yeni teknik, materyal ve metotların kullanıldığı, henüz makaleye dönüşmemiş veya patent gibi yöntemlerle korunmamış ve internetten paylaşılması durumunda 3. şahıslara veya kurumlara haksız kazanç imkanı oluşturabilecek bilgi ve bulguları içeren tezler hakkında tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile altı ayı aşmamak üzere tezin erişime açılması engellenebilir.*
- (3) *Madde 7. 1. Ulusal çıkarları veya güvenliği ilgilendiren, emniyet, istihbarat, savunma ve güvenlik, sağlık vb. konulara ilişkin lisansüstü tezlerle ilgili gizlilik kararı, tezin yapıldığı kurum tarafından verilir *. Kurum ve kuruluşlarla yapılan işbirliği protokolü çerçevesinde hazırlanan lisansüstü tezlere ilişkin gizlilik kararı ise, ilgili kurum ve kuruluşun önerisi ile enstitü veya fakültenin uygun görüşü üzerine üniversite yönetim kurulu tarafından verilir. Gizlilik kararı verilen tezler Yükseköğretim Kuruluna bildirilir. Madde 7.2. Gizlilik kararı verilen tezler gizlilik süresince enstitü veya fakülte tarafından gizlilik kuralları çerçevesinde muhafaza edilir, gizlilik kararının kaldırılması halinde Tez Otomasyon Sistemine yüklenir*

** Tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulu tarafından karar verilir.*

ETİK BEYAN

Bu çalışmadaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında özgün olduğunu, Prof. Dr. Pervin DİNÇER danışmanlığında tarafımdan üretildiğini ve Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Yönergesi'ne göre yazıldığını beyan ederim. HÜ Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul'undan 2018/33-10 karar numaralı etik izni alınmıştır.

Zeynep ÇINAR

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca bana yol gösteren ve her zaman destek olan çok değerli hocam ve danışmanım Prof. Dr. Pervin Dinçer'e,

Tez çalışmamı okuyarak değerli yorumlarını benimle paylaşan tez jüri üyeleri Doç.Dr. Özlen Konu Karakayalı'ya, Doç. Dr. Hatice Güneş Özhan'a, Doç. Dr. Gamze Bora'ya, Dr. Öğr. Üyesi Suat Sarı'ya, Doç. Dr. İlyas Onbaşlar'a, Doç Dr. Işık Yuluğ'ya,

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalındaki değerli hocalarıma, eğitimlerini tamamlamış ve hala devam eden tüm arkadaşlarıma en içten teşekkürlerimi sunarım.

Her zaman yanımda olan annem Tülay Atmaca'ya çok teşekkür ederim ve bu başarıyı sevgili anneme armağan ediyorum.

ÖZET

Çinar, Z., *Desma* Mutant Zebra Balığı Modelinde Tedavi Amaçlı XMU-MP-1 Uygulaması. Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 2021. Zebra balığı, ilaç araştırmalarında sıklıkla kullanılan bir model organizmadır. Bu tez çalışmasında, seçici olarak Hippo yolağının inhibisyonunu sağlayan bir MST1/2 kinaz inhibitörü olan XMU-MP-1 ilaç adayı molekülü, zebra balığı embriyolarının bulundukları ortama ve erişkin balıkların sırt kasına uygulanmıştır. Bu çalışmanın temel amacı zebra balığı embriyolarında ve erişkin balıklarda ilaç adayı moleküllerin taranması için gerekli olan toksisite deneyleri ve ilaç uygulamaları ile ilişkili algoritmayı oluşturmak ve teknik altyapıyı kurmaktır. İlaç uygulama algoritmasının geliştirilmesi ve teknik altyapının standardizasyonu sürecinde mekanotransdüksiyon hasarı olduğu öngörülen *desma* mutant kg155 (-/-) zebra balıklarına XMU-MP-1 uygulanmış ve bu molekülün mutant organizma üzerindeki iyileştirici etkisi *ankrd1a* ifadesi üzerinden değerlendirilmiştir. Tez çalışması sonucunda ilaç adayı moleküllerin embriyolara ve kas içi enjeksiyonu ile erişkin balıklara uygulanması için izlenmesi gereken algoritma ve ilişkili teknik altyapı başarı ile oluşturulmuştur. Ayrıca, *desma* kg155 (-/-) mutant embriyolara ve erişkinlere XMU-MP-1 ilaç adayı molekülün uygulanmasını takiben ilacın etkinliği için *ankrd1a* ifadesine bakılmış ve kontrol gruplarına kıyasla herhangi bir farklılık görülmemiştir. Bu tez çalışması, HÜ BAP Koordinasyon Birimi tarafından (Proje No: 17472) desteklenmiştir. *desma* mutant kg155 (-/-) zebra balıkları, TÜBİTAK 214S174 no'lu proje kapsamında oluşturulmuş ve bu tez çalışmasında toksisite ve ilaç uygulamaları için kullanılmıştır. Tez araştırmasının yapılabilmesi için gereken zebra balığı laboratuvar altyapısı 214S174 no'lu proje kapsamında kurulmuştur. Tez çalışması için, HÜ Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul'undan 2018/33-10 karar numaralı etik izni alınmıştır.

Anahtar kelimeler: Zebra balığı, toksisite, ilaç uygulaması

ABSTRACT

Çinar, Z., Therapeutic XMU-MP-1 Application in Desma Mutant Zebrafish Model. Hacettepe University Graduate School of Health Sciences, Medical Biology Master Thesis, Ankara, 2021. **The zebrafish is a popular model organism in drug research.** In this thesis, the application of XMU-MP-1 drug candidate molecule which is a MST1 / 2 kinase inhibitor and selectively inhibits the Hippo pathway was performed by mixing the drug with zebrafish embryo egg water or adult fish by intramuscular injection. The main aim of this study is creating an algorithm and technical infrastructure related to toxicity and drug applications assays which are required for screening drug candidate molecules in zebrafish embryos and adult fish. Along with developing the drug application algorithm and standardization of the technical infrastructure, we applied XMU-MP-1 to *desma* mutant kg155 (-/-) zebrafish which were assumed to have defects in mechanotransduction signaling and we assessed the therapeutic efficacy of the molecule by targeting the expression level of *ankrd1a*. As a result, the algorithm and related technical infrastructure which are required for application of drug candidate molecules to embryos or adult fish have been successfully procured. Moreover, when control and experimental groups (*desma* mutant kg155 (-/-) embryos and adults) compared, *ankrd1a* expression level was not changed. This thesis was funded by the HU BAP Coordination Unit (Project No: 17472). The project for generating of *desma* mutant kg155 (-/-) zebrafishes which were used in toxicity and infrastructure of zebrafish laboratory in the scope of this study was granted by TÜBİTAK (214S174 project number). The required ethical approval for this thesis was obtained from HU Animal Experiments Local Ethics Committee with decision number 2018 / 33-10.

Keywords: Zebrafish, toxicity, drug application

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iv
ETİK BEYAN	v
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR	xii
ŞEKİLLER	xiii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	6
2.1. Zebra Balığı	6
2.2. Zebra Balığı İlaç Uygulaması	7
2.3. İskelet Kası	14
2.4. Hippo Yolağı ve YAP	15
2.5. Mekanotransdüksiyon ve YAP	17
2.6. XMU-MP-1 ve Rejenerasyon	18
2.7. Ankrin Tekrar Proteinleri (Ankyrin Repeat Domain Proteins, <i>ANKRD</i>)	20
2.8. <i>Desma</i> Mutant kg155 (-/-) Zebra Balıkları	231
2.9. Hipotez ve Amaç	23
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER	24
3.1. Gereçler	24
3.1.1. Zebra Balıkları	24
3.1.2. Zebra Balıklarının Bakımı ve İdamesi	24
3.1.3. Zebra Balığı Embriyolarında Toksisite Deneyi	25
3.1.4. Erişkin Zebra Balıklarında Toksisite Deneyi	25
3.1.5. Zebra Balığı Embriyolarında İlaç Uygulaması	26
3.1.6. Erişkin Zebra Balıklarında İlaç Uygulaması	26
3.1.7. Zebra Balığında Total RNA İzolasyonu	26
3.1.8. cDNA Sentezi	26
3.1.8. Kantitatif Gerçek-Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (kGZ-PZR)	27

3.2. Yöntemler	27
3.2.1. Zebra Balıklarının Bakımı ve İdamesi	27
3.2.2. Zebra Balığı Embriyolarında Toksisite Deneyi	28
3.2.3. Erişkin Zebra Balıklarında Toksisite Deneyi	32
3.2.4. Zebra Balığı Embriyolarında İlaç Uygulaması	34
3.2.5. Erişkin Zebra Balığında İlaç Enjeksiyon Bölgesinin Belirlenmesi	35
3.2.6. Erişkin Zebra Balığında Enjeksiyon Stresinin Belirlenmesi	36
3.2.7. Erişkin Zebra Balıklarında İlaç Uygulaması	36
3.2.8. Zebra Balığı Embriyolarından Total RNA İzolasyonu	38
3.2.9. Erişkin Zebra Balığı Dokusundan RNA İzolasyonu	39
3.2.10. cDNA Sentezi	40
3.2.11. Kantitatif Gerçek-Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (kGZ-PZR)	41
4. BULGULAR	43
4.1. Zebra Balığı Embriyolarında Toksisite Deneyi	43
4.2. Erişkin Zebra Balıklarında Toksisite Deneyi	43
4.3. Zebra Balığı Embriyolarına İlaç Uygulaması	44
4.4. Erişkin Zebra Balığında Kas İçi Enjeksiyon Bölgesinin Belirlenmesi	45
4.5. Erişkin Zebra Balığında Enjeksiyon Stresinin Belirlenmesi	46
4.6. Erişkin Zebra Balıklarına İlaç Uygulaması	47
4.7. Zebra Balığında Toksisite ve İlaç Uygulaması Algoritması	49
5. TARTIŞMA	53
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	62
6.1. Sonuçlar	62
6.2. Öneriler	63
7. KAYNAKLAR	65
8. EKLER	70
EK-1. Tez çalışması ile ilgili etik kurul izni	
EK-2. Toksisite testi öncesi ve sonrası erişkin balıkların bulundukları su ortamında toplam sertlik, su oksijen seviyesi ölçümleri.	
EK-3. RNA konsantrasyon ve saflık değerleri	
EK-4. Yabancıl tip ve mutant embriyolarda <i>ankrd1a</i> ifadesinin <i>actb</i> ile oranlanarak elde edilen kat değişimleri.	

EK-5. Yabanıl tip ve mutant embriyolarda *ankrd1a* ifadesinin *actb* ile oranlanarak elde edilen kat değişimleri.

EK-6. Yabanıl tip ve mutant embriyolarda/erişkinlerde *actbv* e *ankrd1a* kGZ-PZR çalışmaları.

EK-7. Toksisite testi morfolojik değerlendirme, 96 saatin sonunda normal morfoloji gösteren embriyoya ait mikroskop görüntüsü

EK-8. Sitrik asit- Kolliphor HS 15 içeren çözücü optimizasyon çalışmaları

EK-9. Orjinallik Ekran Çıktısı

EK-10. Dijital Makbuz

9. ÖZGEÇMİŞ

81



SİMGELER VE KISALTMALAR

(TGF)-β	Transforming growth factor β
(TNF)-α/NF-κB	Tumor necrosis factor alpha /Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
ACTB	Actin beta
ANKRD1/2	Ankryn repeat domain protein $\frac{1}{2}$
CHMP	Committee For Medicinal Products for Human Use
cm	Santimetre
CRISPR	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
dGH	degree general hardness
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
g	gram
kg	kilogram
L	Litre
Lats	Large Tumor Supressor Homolog
LGMD2R	Limb Girdle Kas Distrofi 2R
LMNA	Lamin A/C
mg	Miligram
ml	Mililitre
mm	Milimetre
Mst	Mammalian STE-20 like
pH	Power of Hydrogen
RNA	Ribonükleik asit
rpm	Rounds per minute
Sav1	Protein Salvador homolog 1
SAR	Structure-activity relationship
TAZ	Transcriptional co-activator with PDZ binding motif
TEAD	TEA domain family member
UV	Ultraviyole
YAP	Yes Associated Protein
μl	Mikrolitre
°C	Derece santigrat

ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
2.1. Zebra balığı ile ilaç taramaları.	9
2.2 Toksisite testinde zebra balığı morfolojisinin değerlendirilmesi.	11
2.3. Zebra balığı modellerinin tedavi edici ilaç adayı moleküllerin keşfinde kullanımı.	14
2.4. Memelilerde Hippo yolağı.	16
2.5. XMU-MP-1'in kimyasal yapısı.	20
3.1. Toksisite testi embriyo gelişim evresi.	29
3.2. Zebra balığı embriyolarında toksisite testi düzeneği.	30
3.3. Erişkin zebra balığında toksisite testi için tank düzeneği.	33
3.4. Zebra balığı embriyolarına ilaç uygulaması.	35
3.5. Zebra balığı enjeksiyon bölgesinin belirlenmesi.	36
3.6. Mikroenjeksiyon iğnesi ile kas içi enjeksiyon sistemi.	37
3.7. Mikroenjeksiyon iğnesinin uygulama noktası.	38
4.1. Yabanıl tip ve mutant embriyolarda <i>ankrd1a</i> ifadesi.	45
4.2. Erişkin zebra balığı sırt kasında <i>ankrd1a</i> ifadesi.	46
4.3. Erişkin zebra balığında mikroenjeksiyon iğnesi ile kas içi enjeksiyon stresinin belirlenmesi, <i>ankrd1a</i> ifadesi.	47
4.4. Yabanıl tip ve mutant erişkinlerde <i>ankrd1a</i> ifadesi.	48

1. GİRİŞ

Zebra balığı (*Danio rerio*), vücut büyüklüğü, embriyolarının saydam olması, memelilerle %80 ve daha yüksek oranda gen ve protein benzerliğinin olması gibi özellikleri nedeniyle ideal bir laboratuvar hayvanıdır. Hızlı büyüme-gelişme özelliği sebebiyle ilk olarak omurgalıların gelişim modeli olarak kullanılmaya başlanmıştır. Memeli modellere kıyasla sahip oldukları birçok avantaj nedeniyle, gen işlevlerinin aydınlatılması, hastalık modellemesinde ve ilaç keşfinde kullanımları gittikçe artmıştır (1).

Zebra balığı, toksik ajanların taranmasında kullanımları yanında, ilaç hedeflerinin tanımlanması ve bu tanımlanan hedeflerin doğrulanması, ilaç keşfinde kullanılan analiz yöntemlerinin geliştirilmesi ve ilaç toksisite çalışmaları gibi birçok araştırmada model organizma olarak kullanılmaktadır (2). Hastalıklara sebep olan gen ürünlerinin moleküler hedeflerinin belirlenmesi ilaç keşfinin önemli bir yönüdür. Bu süreç doğrudan ve dolaylı olarak ikiye ayrılır. Doğrudan yaklaşımda, küçük aday bileşik ile bağlanan protein saflaştırılır ve tanımlanır. Dolaylı yaklaşımda ise aday ilaç hedefleri, aday küçük molekülün neden olduğu biyolojik sonuçların profili çıkarılarak belirlenir. Örneğin aday küçük molekül bilinen bir sinyal yolağı ile ilişkili hücresel bir aktiviteyi değiştirdiğinde, bu etkiden sorumlu olan yolaktaki bilinen proteinler test edilebilir. Zebra balığı embriyoları kullanılarak çok sayıda küçük molekül taranabilir. Yabani tip embriyoların ortamına eklenen bileşiklerin sebep olduğu gelişimsel kusurlar oldukça kolay saptanabilir (3). Preklinik bir araştırmada dolaylı yaklaşım ile öncelikle ilaç için olası bir hedef belirlenir. Bu bir yolağın herhangi bir basamağındaki bir hedef olabilir. Ardından ilacın etkisini ölçecek bir yöntem belirlenir ya da geliştirilir. Örneğin doku kültüründe veya zebra balığı embriyosunda herhangi bir biyolojik sistemde farklılık yarattığı belirlenen bir yöntem ile gözlenebilir. Üçüncü aşamada ise seçilen yöntem ile ilaç taraması yapılır. Ayrıca hangi ilaç konsantrasyonunun hücreler veya embriyolar için toksik olmadığı, güvenilir olduğu belirlenir. Zebra balığı, ilaç keşfinde birçok aşamada kullanılabilir ve zaman/maliyet açısından kemirgenlere iyi bir alternatiftir (4).

Zebra balığı embriyoları ilaçlara geçirgendir ve genetik ve moleküler yaklaşımlarla manipülasyonları kolaydır. İlaç toksisitesi ve ilacın etkinliğini çalışmak için yapılan ilaç araştırmaları sürecinde taşıdığı birçok avantajları nedeniyle sıklıkla tercih edilmektedir. İlaç adayı küçük moleküllerin çoğunluğunun canlı sistemlerde yeterince etkin olamaması veya toksisite oluşturmaları sebebiyle kullanımları sınırlıdır. Bu nedenle toksisite araştırmalarının temel amacı model organizmalar kullanarak moleküllerin insan üzerindeki toksisitesini hızlı ve doğru bir şekilde tahmin etmektir. *In vivo* da tarama yapmak ilaç toksisitesinin ve *in vivo* ilaç etkilerinin eş zamanlı olarak değerlendirilmesini sağlar. Ayrıca ilaç adayı olan küçük molekülün canlıdaki herhangi bir yolakla etkileşime girmesi nedeniyle ilaç adayı küçük molekülün bilinmeyen özellikleri ve hedefleri de tespit edilebilir. Aynı anda birçok küçük molekülün her birinde bir zebra balığı embriyosunu içeren 96 veya 384 kuyucuklu kaplarda taranması imkanını veren ölçekli ilaç taramaları yapabilmek, zebra balığı ile çalışmanın en büyük avantajlarından birisidir (5).

İlaç araştırmalarından önceki süreçte insanda hastalık nedeni olan mutasyonu, zebra balığında oluşturmak ve takiben modelin fenotipik doğrulamasını yaparak patolojik fenotipi tanımlamak gerekir. Ardından bu model üzerinde molekül kütüphanelerinden elde edilen ilaç adayı molekül taramaları yapılarak tedavi edici moleküller tanımlanır. Takiben, klinik çalışmalarının tamamlanması sonunda ilaç hastaya verilir. Zebra balığı modeli, ilaç araştırmalarında memeli modellerine bir alternatif olmakla birlikte ilaç keşfi sürecinin her aşamasında kullanılabilen çok değerli bir modeldir.

Preklinik ilaç taramalarında, hayvanların refahı ile ilişkili 4R kuralı gözönüne alınarak deney hayvanlarına verilecek kimyasalların uygulama yolu minimum olumsuz etkiler içerecek şekilde seçilmelidir. Bu nedenle ilaç araştırmalarında laboratuvarında takip edilecek algoritmayı oluşturmak ve teknik altyapının optimizasyonu çok büyük önem taşımaktadır.

İskelet kası ve mekanotransdüksiyon arasındaki ilişki, kas kütlesinin korunmasının mekanik yüklemeye bağlı olmasından doğar. Yapılan çalışmalarda, mekanik yüklemenin sürekliliğinin kas kütlesini arttırdığı ve tersi durumda ise kas kütlesinin azaldığı gözlenmiştir (6,7). Hippo yolu, IGF1-PI3K-Akt ve MAPK

yolakları ve aktin, titin, ankyrin, vb. mekanik yükü taşıyıcı proteinler, kas kütle artışında ve kas farklılaşmasında önemli görevler alırlar (8). Hippo yolağının en alt basamağında bulunan YAP (*Yes-Associated Protein*) iskelet kası mekanotransdüksiyonunda kilit görev üstlenmektedir. Hippo yolağı etkisiz iken YAP çekirdekte bulunmakta ve YAP tarafından düzenlenen mekanosensitif genler aktifleşmektedir. *Ankrd1a* iskelet kası ile ilişkili ve YAP ile doğrudan ilişkili mekanosensitif genlerden birisidir (9) YAP'ın ayrıca iskelet kasında bulunan satelit hücrelerinde proliferasyonu tetiklediği ve farklılaşmayı durdurduğu gösterilmiştir (10).

LGMD2R (MIM 615325), geç yaşta başlayan ve yavaş ilerleyen ultra nadir bir hastalıktır (11). Hastadaki mutant desmin ifadesinin kontrol bireyin desmin ifadesi ile aynı düzeyde olmasına rağmen geç yaşta ortaya çıkan kas dejenerasyonu, desmin–lamin B etkileşiminin bozulması durumunda kas fiberlerinde mekanik ileti bozukluğu oluştuğunu ve uzun süreli mekanik yükleme sonucunda kas dejenerasyonuna neden olduğunu düşündürmüştür. Hastalıktaki patogenezi açıklayabilmek için TÜBİTAK 1001 (Proje No: 214S174) projesi kapsamında *desma* mutant kg155 (-/-) zebra balıkları oluşturulmuştur. *Desma* mutant kg155 (-/-) zebra balığı modeli, *Des* geninin lamin B bağlanma bölgesinde TALEN genom düzenleme aracı ile *desma* c.1273delAG mutasyonu oluşturularak geliştirilmiştir (12). Bu balıklarda kontrol gruba göre gözlenen farklılıklar içerisinde mekanotransdüksiyon hasarı ile ilişkili en belirgin farklılık kalsiyum geçiş sinyalleri ile ilişkilidir. Mutant balıklarda kalsiyum geçiş sinyalinin kontrol değerlerine oranla belirgin olarak azaldığı gözlenmiştir. Bu durum kalsiyum sinyalinin sönme zamanı (sarkoplazmik retiküluma dönüş süresi) ile ilişkili olup mutant hücrelerde sinyalin zamanlamasının geç sönme nedeniyle uzadığı yönündedir. Özellikle uzun akım uyarısı uygulandığında bu farklılık daha belirginleşmiştir (12).

LGMD2R'de aktif olan YAP miktarı Hippo yolağı inhibisyonu ile arttırılabilir ve mekanosensitif gen ve yolaklarda gözlenen bozuklukların giderilip giderilmediği araştırılabilir. Bu nedenle tez çalışmasında *desma* mutant kg155 (-/-) zebra balıklarına uygulanacak ilaç adayı küçük molekül olarak XMU-MP-1 kullanılmıştır. Bu molekül Hippo yolağını baskılamaktadır. Bu durumda, YAP'ın

çekirdeğe aktararak çekirdekte mekanosensitif genlerin aktivasyonunu sağlayarak kas kütlesini arttırdığı düşünülmektedir (10). Bununla ilgili olarak Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'mızda yapılan bir tez çalışmasında YAP'ın hedef genlerinden *ANKRD1*'in LGMD2R hastasına ait fibroblastların ölümsüzleştirildikten sonra kasa farklılaştırılmış kültüründe kontrole göre hem durağan hem mekanik yükleme durumlarında ifadesinin 11 kat arttığı gözlenmiştir (13).

Bu tezde, zebra balığında, hem embriyoda hem de erişkin balıkta ilaç uygulaması çalışmaları için bir algoritma oluşturulması ve teknik altyapının hazırlanması amaçlanmıştır. İlaç uygulaması ile ilgili algoritmanın ve teknik alt yapının oluşturulabilmesi için model organizma olarak *desma* mutant kg155 (-/-) zebra balıkları; ilaç adayı molekül olarak, Hippo yolağında MST1/2 kinazın güçlü ve seçici inhibitörü olan XMU-MP-1 (*MedChem*, katalog no. HY-100526 CAS 2061980-01-4 kullanılmıştır (14). İlaç adayının *in vivo* etkisinin gözlenmesi için, YAP'ın hedef genlerinden biri olan *ankrd1a* geninin ifadesi araştırılmıştır.

Bu tez kapsamında XMU-MP-1 ilaç adayı molekülün uygulanması öncesinde, zebra balıkları için toksik olmayan dozun belirlenmesi amacıyla toksisite deneyleri yapılmıştır. Yabanıl tip balıklarda toksik olmayan ilaç dozu (embriyolarda (312 embriyo); 100 mg/L ve erişkinlerde (20 erişkin) 0.05 mg/kg) belirlendikten sonra ilaç adayı molekül belirlenen konsantrasyonlarda ilaç uygulama sürecindeki kontrollerle birlikte 180 yabanıl ve 180 mutant olmak üzere toplam 360 adet zebra balığı embriyosunun su ortamına, 18 adet erişkinde (9 yabanıl tip ve 9 mutant erişkin) ise mikroyenjeksiyon iğnesi kullanılarak kas içine uygulanmıştır. Bu uygulamaların optimizasyonları yabanıl tip zebra balıklarında yapılmıştır. Embriyo ve erişkin deneylerinde ilacın uygulanmadığı negatif kontrol, ilacın çözündüğü DMSO'nun toksik olup olmadığının kontrol edildiği çözücü kontrolü ve ilaç adayı küçük molekülün uygulandığı gruplar ortak olarak oluşturulan gruplardır. İlaveten embriyolarda 96 kuyucuklu kap içi kontrol, toksik olduğu bilinen molekülü içeren pozitif kontrol ve erişkin balıklarda ise mikroyenjeksiyon iğnesi ile kas içine enjeksiyon yapıldığından, bu enjeksiyonun balık üzerinde stres oluşturma durumu da kontrol edilmiştir. Uygulama sonrası her iki grupta da ilaç adayı molekülün *in vivo* etkilerinin araştırılması amacıyla YAP'ın hedef geni olan *ankrd1a* geninde ilaç adayı

küçük molekülün etkisi olup olmadığı kGZ-PZR ile araştırılmıştır. Embriyolarda ve erişkinlerde, kontrol grupları ile ilaç uygulanan gruplar arasında bu genin ifadesi arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamıştır.

Sonuç olarak, bu tez çalışması ile zebra balığı embriyolarında ve erişkinlerde ilaç uygulaması için gereken algoritma ve teknik altyapı oluşturulmuştur. Küçük molekül seçimi ve etkilerinin biyolojik çıktısı ise her çalışma için spesifik olduğundan araştırmacıların kendi sorularına yönelik ilerlemelerini gerektirmektedir.

Bu tez çalışması, Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje No: 17472). Ayrıca, bu tez çalışmasının gerçekleştirilmesi için TÜBİTAK 214S174 no'lu projede oluşturulmuş olan *desma* mutant kg155 (-/-) mutant zebra balıkları kullanılmıştır. Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul'dan etik izin (2018/33-10) alınmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Zebra Balığı

Danio rerio (zebra balığı), 1960'lardan bu yana bilimsel araştırmalarda kullanılan bir organizmadır. Zebra balığı genomunun 2001'de dizilenmiş olması ve insan genomu ile % 87 benzerlik göstermesi insan hastalıkları ile ilgili birçok genin zebra balığında mevcut olduğunu ve insan hastalıklarındaki mutasyonların modellenmesinin mümkün olduğunu göstermektedir (15).

Zebra balığı, daha önce genomu dizilenen diğer omurgalılarından daha fazla (26.206 protein kodlayan) gene sahiptir. Protein kodlayan genlerin zebra balığı ve insanda karşılaştırılması oldukça ilginç sonuçlar ortaya koymaktadır. İnsan genlerinin %71.4'ünün zebra balıklarında en az bir ortoloğu vardır. Bu sebeplerden dolayı zebra balıkları, insan hastalıklarıyla ilişkili genlerin biyolojik aktivitelerinin anlaşılmasında da başarıyla kullanılmaktadır (16).

Zebra balıkları yaklaşık 3 cm uzunlukta tatlı su balıklarıdır. Erkekler, incedir ve vücutları torpido şeklindedir. Siyah uzunlamasına çizgilere sahiptirler. Karın bölgesi ve yüzgeçler ise altın rengindedir. Dişiler yumurta üretimi nedeniyle şişmandır. Zebra balıkları 3 aylık kısa bir sürede büyüyebilirler ve dişiler haftada yüzlerce yumurta verebilir. Dış döllenme gerçekleştiğinden embriyolarda manipülasyonlar yapabilmek mümkündür. Embriyolar, 2-4 gün içinde hızlıca gelişmekte olup 24 saat içinde kalp atışı ve eritrositler diseksiyon mikroskobu altında kolayca gözlenebilir (17). Jenerasyon süresi hızlı olduğundan 3 ayda erişkinliğe ulaşırlar ve ortalama 2-3 yıl yaşarlar. Zebra balıkları, doğal yaşam alanlarının birçok özelliğinden dolayı laboratuvar ortamında yetiştirilme yönünden dayanıklı canlılardır. Zebra balıklarının, laboratuvar ortamında yetiştirilme standartlarında doğal yaşam alanlarındaki biyolojileri ve evcilleştirilmiş alt popülasyonların bulundukları ortama adaptasyonları dikkate alınmalıdır (18). Laboratuvar ortamında yaşadıkları suyun pH'sı genellikle 7.2—7.6 ve sıcaklığı 28.5°C'dir. Suyun UV sterilizasyonu ve tankların temizliği mikroorganizmaların uzaklaştırılması için kritiktir. Larvaların ve juvenillerin (21-90 günlük) büyümeleri için paramezyum,

rotifer ve artemia ideal besinlerdir. Erişkinler (90 günden büyük zebra balıkları) için ise toz artemia ve toz gıda karışımları ile beslenme programı oluşturulabilir (19).

2.2. Zebra Balığına İlaç Uygulaması ve Toksisite Testi

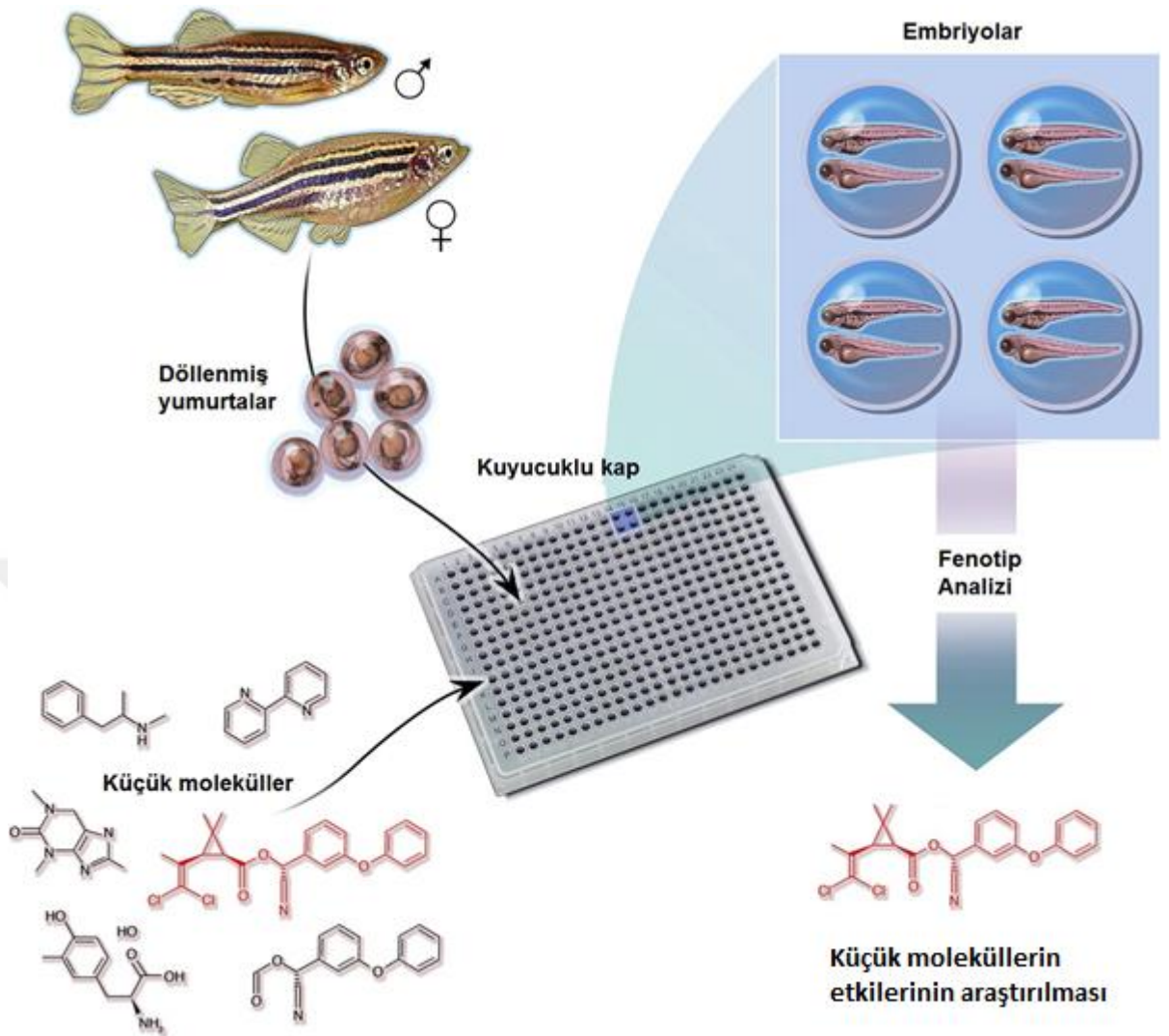
2.2.1. Zebra Balığına İlaç Uygulaması

İlaç keşfi, *in vitro* deneyler sonrasında hayvan deneyleriyle doğrulanıp son olarak insanların kullanmasıyla sonuçlanan karmaşık bir süreçtir. Hastalıklar için ilaç geliştirme süreci ilaç adayı olabilecek küçük molekül kütüphanelerinin taranması ile başlar (20). Zebra balığı, ilaç adayı küçük moleküllerin *in vivo* taramasında yaygın kullanılan bir model organizmadır. Tek bir çiftleşmede yüzlerce embriyo alınabilmesi ve bu embriyoların küçük kuyucuklu kaplarda yaşayabilmesi nedeniyle, embriyo ortamında bulunan embriyolar çok fazla sayıda küçük moleküle maruz bırakılarak ilaç taramaları ve bu taramaların fenotipik/genotipik değerlendirmeleri hızlıca ve kolayca yapılabilmektedir (21).

İlaç taramasında zebra balığı kullanılmasının birçok teknik avantajı bulunmaktadır: (i) ilaç doğrudan balığın bulunduğu ortama verilmektedir. Bunun iki büyük avantajı bulunmaktadır: Çok daha hızlı ve basit bir işlemdir. Ayrıca molekülün tüm bir organizmaya absorpsiyon, dağılım, metabolizma ve atılım (*ADME profillemesi*) kapsamında nasıl davrandığının anlaşılmasına da katkı sağlar. Ancak, iki önemli noktaya da dikkat edilmesi gerekir: İlk olarak, bazı ilaç adayı moleküller suda çözünmez ve bu durum absorbe edilen ilacın miktarı ve ilaç stabilitesi üzerinde doğrudan etkilidir. Çözünürlüğü arttırmak için, bileşikler önce DMSO, metanol, asetat veya siklodekstrin gibi organik çözücülerde veya taşıyıcılarda çözülmelidir. İkinci olarak, global ADME profillemesinin zebra balığında uygulanmasında zorluklar olduğu bilinmektedir. Radyoaktif veya floresan işaretli moleküllerin tespit edilmesinde yeni tekniklerin gelişimi bu tekniklerin organ ve hücreleri ayırıcı tekniklerle birlikte kullanılabilmesi, ilaveten zebra balığı ilaç metabolizması konusunda detaylı birikimin olması, bu önemli hedefe ulaşılmasını sağlar. (ii) Zebra balıklarının çok sayıda yumurta vermesi ve embriyoların küçük boyutta olması birçok ilacın farklı birçok konsantrasyonda çok kuyucuklu kaplarda paralel olarak test edilmesine olanak sağlar. (iii) Zebra balığı ile yüksek omurgalılar arasında özellikle analog organlar olan kalp, karaciğer, pankreas ve beyin ve

insandaki fizyolojik süreçler bakımından yüksek oranda genetik korunmuşluk mevcuttur. Ancak, kanser araştırmalarında özellikle üzerinde çok çalışılan akciğer, prostat ve meme zebra balığında yoktur. Embriyonik gelişimle ilgili moleküler mekanizmaların birçoğu memelilerle aynıdır. (iv) Zebra balığı embriyoları saydamdır, bu nedenle ilacın *in vivo* etkilerinin hücre gruplarında veya tüm bir dokuda gösterilmesi için floresan içeren transjenik balıklar oluşturularak ileri görüntüleme teknikleriyle görselleştirilmesi mümkündür. Zebra balığı embriyolarının boyutunun küçüklüğü, fazla sayıda yumurta vermesi, ilaç uygulama şekilleri ve yüksek ölçekli taramalar yapılabilmesi gibi özellikleri omurgasızların özellikleri ile benzer bile olsa omurgalı olması onu *in vitro* ve *in siliko* taramalara göre daha etkili kılmıştır. Diğer yandan fazla zaman ve yüksek maliyet nedeniyle sıklıkla kullanılamayan memeli modellere göre daha avantajlı olması zebra balığını iki grup arasındaki boşluğu dolduran önemli bir aday haline getirmektedir (22).

İlaç araştırmalarında en erken dönemde güvenilirliği ve etkinliği test edilmiş ilaç adayı moleküllerini seçmek çok önemlidir. Zebra balığı, ilaç keşif sürecinin çeşitli aşamalarında kullanılmaktadır. Özellikle son yıllarda prelinik toksisite testi (morfolojik bulgularla değerlendirilebilen teratojenisite, hepatotoksisite, nefrotoksisite; anormal kalp morfolojisinin gözlemlendiği kardiyotoksisite vb.) uygulamaları için çok tercih edilen bir organizma olmuştur. Ayrıca bazı memeli modellerine (kemirgenler, köpekler, domuzlar vb.) göre uygun maliyetli bir alternatif olmuştur. Aday küçük molekül keşfinde zebra balığı modeli kullanımının genel işleyişi Şekil 2.1’ de verilmiştir. Yüzlerce küçük molekül, çok sayıda zebra balığı embriyosu kullanılarak bu işleyiş ile taranabilir (23).



Şekil 2.1. Zebra balığı ile ilaç taramaları. Zebra balığı embriyoları kuyucuklu kaplarda yaşayabilir ve eş zamanlı olarak birden fazla molekül test edilebilir. Ayrıca toksisite çalışmaları da yapılabilir (23).

2.2.2. Zebra Balığında Toksisite Testi

Toksisite araştırmalarının temel amacı model organizmalar kullanarak moleküllerin insan üzerindeki toksisitesini hızlı ve doğru bir şekilde tahmin etmektir. Toksisite deneyleri genellikle *in vitro* çalışmalarla başlar. Aday küçük moleküllerin farklı hücre hatlarında farklı konsantrasyonları denenir. Daha sonra hayvan modellerinde testler yapılır. İlaç adayı moleküllerin toksisitesini ve güvenilirliğini belirlemek için zebra balığı iyi bir modeldir. Küçük moleküllerin zebra balıklarının su ortamına verilerek difüzyon ile absorbe edilmesi sağlanabilir. Ayrıca, erişkin

balıklarda çeşitli enjeksiyon uygulamaları veya oral gavaj yoluyla aday küçük moleküllerin toksik etkileri test edilebilir (24).

Toksisite testleri zebra balığı embriyolarında kuyucuklu kaplar kullanılarak kolayca yapılabilir. Aday küçük moleküllerin farklı konsantrasyonlarda hazırlanan çözeltileri kuyucuklu kaplara konulur. Daha sonra her kuyucuğa bir embriyo olacak şekilde embriyolar dağıtılır. Embriyolar döllenmeden sonra 5. güne kadar besinleri besin keselerinden absorbe edebildiğinden döllenmeden sonra yaklaşık 5.7-8. saatte başlatılan toksisite testinin 120 saate kadar sürdürülmesi mümkündür. Embriyolarda normal olmayan morfolojinin gözlenmesi (sıklıkla gözlenen morfolojik bozukluklar Şekil 2.2.'de verilmiştir), normal olmayan yüzme davranışları veya ölüm ile küçük moleküllerin toksisitesi belirlenebilir (25).



1. Döllenmeden sonra 24.-120. saatler arasındaki ölümler

2. Döllenmeden sonra 24. saate kadar gerçekleşen ölümler



3. Döllenmeden sonra 24. saatte normal olmayan hareketlilik



4. Gelişim geriliği

5. Döllenmeden sonra 24. saatte normal olmayan notokort görüntüsü (kavisli notokort)



6. Larva duruşunun herhangi bir yöne doğru bükülmesi, kıvrılması



7. Normal olmayan beyin morfolojisi, doku ölümü

8. Normal olmayan kuyruk yüzgeci

9. Kan akışının olmaması

10. Gözün gelişmemesi

11. Normal olmayan kalp morfolojisi

12. Normal olmayan çene morfolojisi

13. Normal olmayan kulak morfolojisi

14. Normal olmayan yan yüzgeçler ya da yüzgeç gelişmemesi

15. Normalden daha az ya da daha çok pigmentasyon

16. Normalden daha kısa vücut yapısı

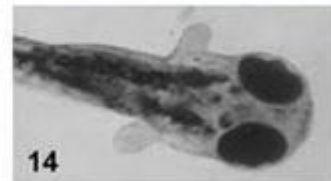
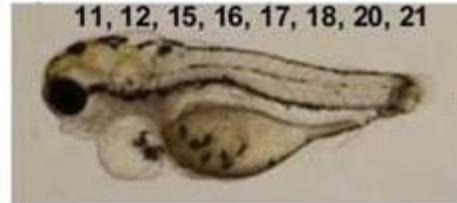
17. Normal olmayan somit organizasyonu ya da somitlerin hiç olmaması

18. Yüzme kesesinde şişme

19. Döllenmeden sonra 120. saatte dokunmaya tepki verilmemesi

20. Gövdenin kısa olması ya da normal olmayan gövde morfolojisi

21. Besin kesesinde şişme



Şekil 2.2. Toksisite testinde zebra balığı morfolojisinin değerlendirilmesi (25).

2.2.3. Zebra Balığına İlaç Uygulaması Yöntemleri

Birçok tedavi edici molekül, *in vitro* yöntemlerle keşfedilmiştir. Dokuya özgü toksisite fenotipinin gözlenmesi için çok etkin olarak kullanımlarına rağmen *in vitro* yöntemlerle birçok organı ve dokuyu etkileyen toksisiteyi gösterebilmek mümkün olmamaktadır. *In vitro* yöntemlerle keşfedilen birçok potansiyel tedavi edici molekül canlı organizmalarda yapılan denemelerde aynı etkiyi göstermez. Hücre kültürüyle karşılaştırıldığında, aday küçük moleküller organizmanın karmaşık biyolojisinden dolayı farklı davranabilirler. Canlı organizmada tarama yapmak ilaç toksisitesinin ve *in vivo* ilaç etkilerinin eş zamanlı olarak değerlendirilmesini sağlar. Hücre kültürü ortamında aday küçük moleküllerin daha az sayıda hedefleri bulunmasına rağmen bir model organizmada olası hedefleri daha fazla olabilir. Ayrıca bir model organizmada ilaç taraması yapıldığında ilaç adayı olan küçük molekül canlıdaki herhangi bir yolakla etkileşime girebilir. Böylece *in vitro* çalışmalara kıyasla küçük molekülün bilinmeyen özellikleri ve hedefleri de tespit edilebilir (5).

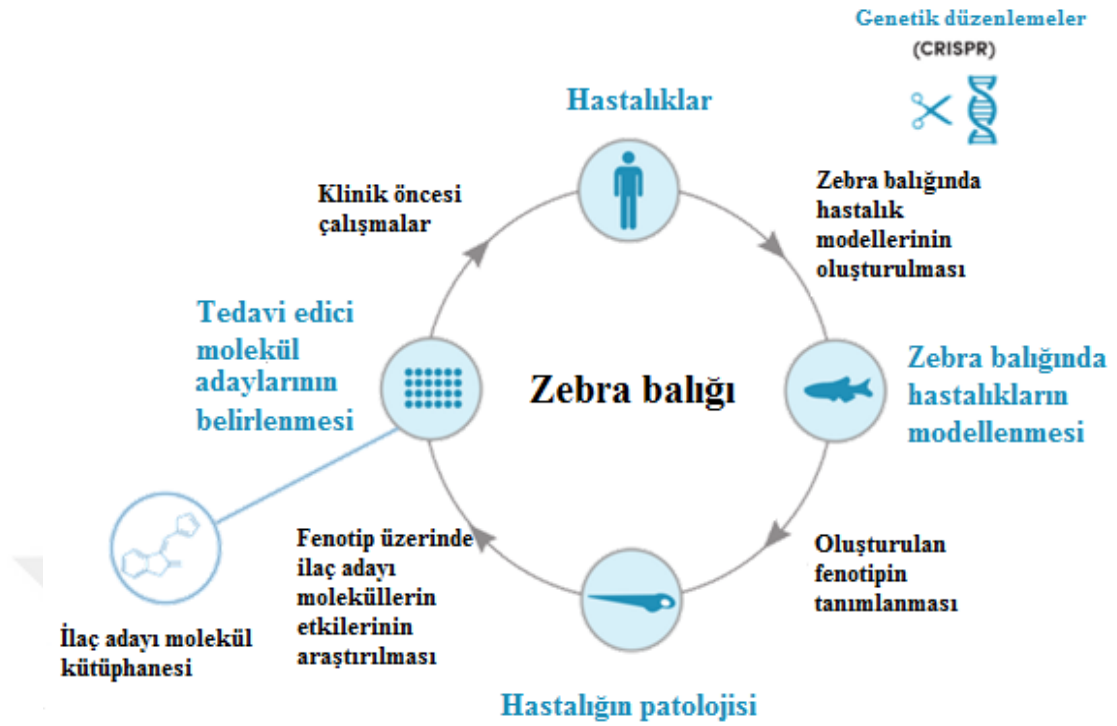
Zebra balığı, klasik omurgasız modellere benzer şekilde embriyogenez ve organogenezin kolayca görüntülenmesini sağlamanın yanı sıra hastalıkları ve gelişimi etkileyen omurgalılara özgü birçok sürecin çalışılmasında da kullanılabilir bir modeldir. Embriyogenez sürecindeki sinyal yolakları genellikle hastalıklarda hatalı olduğundan zebra balığının embriyogenez süreci yolağa özgün tedavi edici moleküllerin araştırılmasında kolaylık sağlamıştır (26). Ayrıca hastalıkları tedavi etmek için kullanılan birçok ilacın insan ve zebra balığı embriyoları arasında kıyaslanabilir etkileri vardır (27). Farmakoloji çalışmaları için zebra balığının önemli bir özelliği yüksek ölçekli tarama için iyi bir model olmasıdır. Yüksek doğurganlığa sahiptirler. Boyutları döllenmeden sonra 7 gün boyunca 5 mm'dir. 96- kuyucuklu kaplarda 50 µl kadar az bir sıvı içinde yaşayabilirler ve bu kaplarda yapılan çalışmalar için miligram miktarda ilaç adayı molekül yeterlidir. (28).

İlaç araştırmalarında, deney hayvanlarına verilecek kimyasalların uygulama yolu minimum olumsuz etkiler içerecek şekilde seçilmelidir. Test edilecek etken molekülün uygulanması için balığın yaşadığı su ortamına katma, oral yolla uygulama ve retro-orbital, damar içi vb. enjeksiyon yöntemlerinin uygulanması gibi farklı metotlar mümkündür. Zebra balığı ilaç uygulamalarında en popüler yöntem ilacın

suya katılmasıdır (29). Etken ilaç adayı molekül doğrudan olarak zebra balıklarının yaşadıkları su ortamına katılabilir. Su ortamına katılan ilaç adayı moleküllerini zebra balıkları ağız, solungaç ve deri yoluyla alabilir (30,31). İlaçları su ortamına katmak uygun ve elverişli bir metottur ancak bu yöntemle molekülün balık tarafından ne kadar alındığını bilmek zordur. İlavenen ilacın vücutta dağılımı, metabolizması ve atılımı (*ADME profillemesi-absorbsiyon, dağılım, metabolizma, atılım*) ile ilgili bilgi edinebilmek mümkün değildir. İlaç adayı molekül su ortamına katıldığında tam olarak verilen dozun bilinmemesi ve çözünürlük gibi sorunlar enjeksiyon uygulaması ile ortadan kaldırılabilir. Erişkin zebra balıklarına özellikle periton içi, kas içi, retroorbital ilaç enjeksiyonu güvenli yöntemler olarak kullanılmaktadır. Bu yöntemlerin başarılı olabilmesi için anestezi, enjeksiyon, iyileşme vb. aşamalar boyunca dikkatli ve tedbirli olmak gereklidir (32). Damar içi enjeksiyon da çok etkin bir metot olmakla birlikte zebra balıklarının damar çaplarının küçük olması sebebiyle uygulanması oldukça zordur (33). Bunların yanı sıra kas içi enjeksiyon yöntemi de özellikle kas çalışmaları için kullanılabilir (34). Oral gavaj, uzun süreli ilaç uygulamalarında tercih edilebilecek bir yöntemdir. Bu uygulamada gavaj ekipmanları gereklidir. Travma ve yaralanmalar oluşabilir (35).

2.2.4. Yabanıl Tip ve Mutant Zebra Balığına İlaç Uygulaması

Zebra balığı genomu ile insan genomunun yüksek orandaki benzerliği birçok hastalığın patogenezinin anlaşılmasında model organizma olarak kullanılabilmesini sağlamıştır. CRISPR/Cas9 (*clustered regularly interspaced short palin- dromic repeat/CRISPR-associated nuclease-9*) gen düzenleme teknolojisi, hastalıkların zebra balığında modellenmesi için büyük imkanlar sunmaktadır. Oluşturulan modellerin fenotipleri tanımlanabilmektedir. Bu şekilde, zebra balığı modelleri yeni tedavi edici ilaç adayı moleküllerin hedeflerinin keşfinde kullanılmaktadır. Bu durum, preklinik memeli modellerine geçilmeden önce ilaç adayı molekülle ilgili tüm analizlerin yapılabilmesine olanak sağlamaktadır (36) (Şekil 2.3.).



Şekil 2.3. Zebra balığı modellerinin tedavi edici ilaç adayı moleküllerin keşfinde kullanımı (36).

Tedavi edici ilaç adayı molekülün tek bir hedef üzerinde yüksek seçicilik ile etkinlik göstermesi ideal olanıdır. *In vitro* çalışmalarda bu etkinlik sağlanmaya çalışılsa da, ilaç adayı moleküller canlı organizmanın kompleks yapısı sebebiyle beklenenden farklı etkiler gösterebilir. Bu etkilere bir model organizma üzerinde bakılır. Zebra balığı bu hedef dışı etkilerin sistematik olarak taranmasını sağlar. Her ilaç adayı molekül yalnızca bir hedef için tasarlanır. İlaç adayı molekül, yabancı tip zebra balığına uygulandığında farklı bir etki görülüyorsa, ilaç adayı molekülün başka hedeflerinin de olması söz konusudur (37).

2.3. İskelet Kası

İskelet kası, insana ait en aktif dokulardan biridir. Vücut ağırlığının yaklaşık %40'ını ve proteinlerin %50-75'ini içerir. Genel olarak kas kütlesi, protein sentezi ve yıkımı arasındaki dengeye bağlıdır. İskelet kası, kas liflerinin ve bağ dokunun birlikte organizasyonu ile karakterizedir (38). Kas lifleri çok çekirdekli ve post-

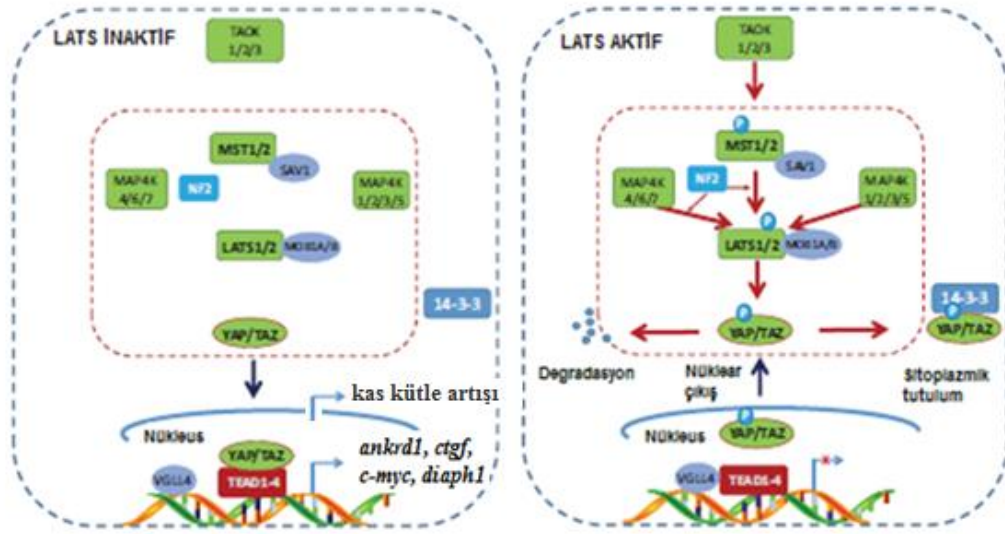
mitotiktir (39). Satellit hücreleri iskelet kasının yetişkin kök hücreleri olup sarkolemma ve bazal lamina arasında yer alırlar. Kas büyümesi, onarımı ve yenilenmesine katkıda bulunurlar (40,41). Miyojenik faktörler tarafından aktive edildiğinde çoğalır ve yeni kas liflerine farklılaşırlar (42).

Omurgalılarda iskelet kasları farklı tipte liflere sahiptir ancak kasılma hızları, metabolik aktiviteleri ve motor nöron ağı farklılıklarına göre temel olarak yavaş ve hızlı kas lifleri şeklinde sınıflandırılabilirler. Embriyoda, ilk kas lifleri miyoblastlar olarak bilinen proliferatif miyojenik öncüllerle oluşur. Yetişkin zebra balığında yavaş ve hızlı kas lifleri balık kasının farklı bölgelerindedir. Hızlı kas lifleri gövde kaslarının çoğunu oluşturan miyotomun iç kısmında iken yavaş kas lifleri yatay miyotomun kama şekline benzeyen bölgesine dağılmıştır. Ara lifler ise yavaş ve hızlı kas lifleri arasında yer almaktadır (43).

İskelet kası, canlının yaşamı boyunca mekanik ve fizyolojik strese dayanıklı olması gereken bir dokudur. Kas hasarı veya hastalıkları gittikçe ilerleyen kas güçsüzlüğüne sebep olur. Bu bozuklukların tedavisini amaçlayan yaklaşımlar iki kategoride toplanır; birincisi mutasyona uğramış geni onarmak veya değiştirmektir. İkincisi ise alternatif yolları aktive ederek veya patolojik sonuçları düzeltmek için yolağın *upstreamine* müdahale ederek mutasyonun etkisini azaltmayı amaçlar. İskelet kasında kök hücre tedavisi, gen tedavisi, oligonükleotit ve küçük moleküllerin uygulanması tedavi amaçlı kullanılan uygulamalar arasındadır (44).

2.4. Hippo Yolağı ve YAP

Hippo yolağı, doku yenilenmesi, tümör baskılanması ve organ boyutunun kontrolünde önemli rol oynayan bir yoldur (45). YAP ve TAZ (*Transcriptional co-activator with PDZ binding motif*) transkripsiyon aktivatörlerinin inhibisyonu ile aktive olan Hippo yolağı, hücre çoğalması ve apoptozun yanı sıra hücre-hücre etkileşimi, hücre polaritesi, G-protein bağlı reseptörlerin ligantları ve hücresel enerji durumu da dahil hücre içi ve hücre dışı sinyallere yanıt olarak hücrenin kendini yenilemesini düzenleyen bir yoldur (Şekil 2.4) (46).



Şekil 2.4. Memelilerde Hippo yolağı. Hippo yolağı etkisiz olduğunda YAP ve TAZ fosforillenmemiştir ve çekirdekte yerleşmişlerdir. YAP/TAZ proteini TEAD proteinine bağlandıktan sonra YAP ile ilişkili genlerin (*ankrd1*, *ctgf*, *c-myc*, *diaph1* vb.) transkripsiyonu aktifleşir. Hippo yolağı TAO kinazlar tarafından aktifleştirilir. TAO kinazlar MST1/2 proteinini aktif bölgesinden fosforilller. Fosforillenmiş MST1/2, LATS1/2'yi fosforiller. Aktif LATS1/2, YAP/TAZ'ı fosforiller. Bu fosforillenme YAP/TAZ'ın 14-3-3 proteini aracılı sitoplazmik tutulumuna ve E3 ubikülin ligaz aracılı yıkımına sebep olur (47).

Hücre polaritesi, hücreler arası etkileşimler, hücre iskeletinin mekanik etkileri, hormonlar gibi birçok hücre içi ve dışı etken ile aktifleşen Hippo kinaz kaskatında, TAO kinazlar (TAOK 1/2/3), MST1/2'yi fosforiller ve böylece MST1/2 aktifleşir (48,49). Aktifleşmiş MST1/2 skafold proteinlerden biri olan SAV1'i fosforiller (50). MST1/2'nin diğer substratları MOBK1A ve MOBK1B polipeptitleridir ve aktif olan MST1/2 tarafından fosforillenir (51). Bu iki protein, LATS1/2'nin MST1/2 aracılığıyla aktifleştirilip fosforillenmesinde yardımcı olur. Aktifleşen tümör baskılayıcı kinaz LATS, PDZ-bağlanma motifli koaktivatör YAP/TAZ'ı fosforiller. Bu da YAP'ın 14-3-3 proteinleriyle bağlanarak sitoplazmik lokasyonuna sebep olur ve onun transkripsiyon faktörlerine bağlanmasını baskılar (52,53). YAP/TAZ'ın aktivitesi, LATS tarafından başlatılan fosforillenmenin ardından E3 ubikülin ligaz ile katalizlenen ubikülinasyon sonucu gerçekleşen

YAP/TAZ degradasyonu ile de düzenlenebilmektir (54). Ayrıca YAP proteini otofaji ile de yıkılabilir. YAP/TAZ doğrudan DNA'ya bağlanamaz, hedef genlerin ifadesini düzenlemeleri için DNA'ya bağlanabilen transkripsiyon faktörleriyle etkileşime geçmeleri gereklidir (55). TEAD transkripsiyon faktörleri YAP/TAZ'ın en iyi tanımlanmış bağlanma partnerleridir. Bu proteinler ortak TEA DNA bağlanma domaini paylaştıklarından bu ismi almışlardır (56). TEAD-1/TEF-1 kalp kasında gen ifadesi için gereklidir (57). TEAD-4/TEF-3 iskelet kasına özgü genlerin aktivasyonunda rol oynar (58). TEAD-3/TEF-5 plasentada ifade edilip plasental genlerin düzenlenmesi ve gelişimde rol oynar (59). TEAD-2/TEF-4 ise seçici olarak embriyonik gelişimin ilk 7 günü boyunca ifade edilir (60).

Hippo kinaz kaskatı organ büyümesinin düzenlenmesinde önemli rol oynar ve ana hedefi koaktivatör YAP'tır. Farede embriyonik kalp gelişimi boyunca kardiyomiyosit çoğalması ve kardiyak morfogenezi için YAP gereklidir (61). YAP'ın işlev kaybı, yetersiz kardiyak hipertrofisine ve işlev bozukluğuna yol açar (62). YAP aktivitesi çekirdekte hücre çoğalması ve apoptozla ilgili genlerin transkripsiyonunu kontrol etmektedir (63). Ayrıca YAP hücre göçünü de etkiler. Satelit hücrelerin, bazal membran boyunca nişlerinden dolayı göç etmesi gerektiğinden kas gelişimi ve rejenerasyonu için bu göç önemlidir (64). Zebra balığında yapılan bir çalışmada, YAP'ın balığın kuyruk yüzgecinin rejenerasyonu için gerekli olduğu gösterilmiştir. YAP, rejenerasyon sırasında hücre çoğalmasını kontrol eder (65).

2.5. Mekanotransdüksiyon ve YAP

Hücrel mekanotransdüksiyon, hücrelerin mekanik sinyalleri biyokimyasal tepkilere dönüştürmesidir. Mekanik sinyalin membrana iletilmesiyle oluşan mekanik yüklemeye cevap olarak aktiveleşen iyon kanalları, plazma membranının girinti ve çıkıntıları, integrinler, kaderinler, büyüme faktörü reseptörleri, hücre iskeleti filamentleri, hücre çekirdeği, hücre dışı matriks ve diğer birçok yapı ve sinyal molekülleri bu mekanotransdüksiyon cevabına katkıda bulunmaktadır (66).

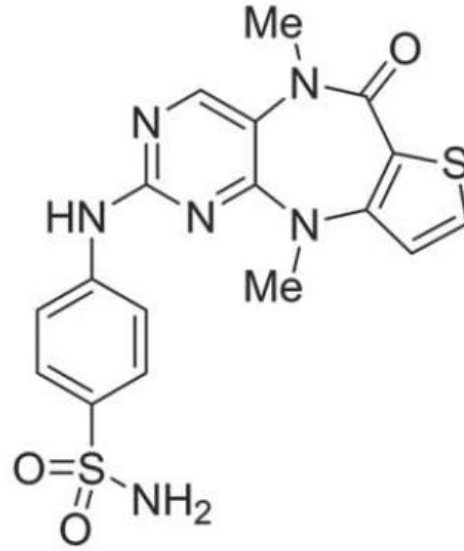
YAP, mekanotransdüksiyonun düzenlenmesinde rol oynamaktadır. Hücre dışı matriks tarafından iletilen fiziksel/mechanik uyarılar ile YAP/TAZ aktivitesi

düzenlenebilir. Bu düzenlenme, Rho GTPaz ve aktin-miyozin iskeletinin gerilmesini gerektirir ve Hippo/LATS kaskatından bağımsızdır (67). Ayrıca, hücre dışından alınan mekanik uyarılar hücre iskeleti nüklear zarfla bağlantılı olduğundan çekirdeğe de iletilir. Nesprin ve SUN proteinlerinden oluşan LINC kompleksi aktin stres fiberlerini çekirdek iskeletine bağlar (68). Bu iletim, gerilme ile aktifleşen YAP/TAZ yolağı için şarttır. Mezenkimal kök hücrelerde, aktin iskeleti veya LINC kompleksinin aracılık ettiği bağlantılar tamamen kaybolursa gerilmeye yanıt olarak YAP sinyalinin engellendiği gösterilmiştir (69). Çekirdek membranının iç kısmında bulunan bir ara filament olan lamin A, SUN proteinlerine bağlanır ve lamin A/C ile LINC kompleksi arasındaki bağlantı mekanik cevaba aracılık eder (70). Lamin A/C kodlayan LMNA geni mutant miyoblastlarda hücrenin mekanik strese cevap verme yeteneği ciddi şekilde etkilenmektedir. LMNA mutasyonuna uğramış miyoblastlarda YAP'ın siRNA aracılı baskılanması ile yapılan bir çalışmada, bu hücrelerde YAP sinyal iletimi hasarı olduğu gösterilmiştir. Döngüsel gerilme uygulanan yabancıl tip hücrelerde YAP'ın çekirdekte yerleşim oranı artarken LMNA miyoblast hattında bunun tam tersi görülmüştür. Farklı LMNA mutasyonu taşıyan hastalardan elde edilen primer miyoblast hücrelerine döngüsel stres uygulandığında çekirdekte bulunan YAP miktarının azaldığı, kontrolde ise hücrenin mekanik strese uyum sağlamak için çekirdekteki YAP miktarının arttığı sonucuna ulaşılmıştır. Bu sonuç, YAP proteininin düzenlenmesinin bozulmasının LMNA mutasyonu taşıyan hücrelerin mekanik strese karşı olan cevabını bozduğu şeklinde yorumlanmıştır (71).

2.6. XMU-MP-1 ve Rejenerasyon

Dokunun yıkıcı uyarana maruz kalmasından sonra dokunun onarım süreci başlar (72). Kök hücreler, hücre homeostazının korunması ve doku hasarının onarılmasında önemli rol oynar. Dokuların, hem embriyonik gelişim hem de rejenerasyonu sırasında kök ve progenitor hücreler özgün hedef hücrelerine ulaşmalıdırlar (73). Ancak kök hücrelerin bu potansiyelini organ rejenerasyonunda kullanmanın klinik faydaları oldukça azdır (75). Fare modellerinde, kolon ve karaciğer hasarında küçük molekül inhibitörlerinin kullanılması (76), rekombinant büyüme faktörü ile doğum sonrası farelerde kalp kası hücrelerinin rejenerasyonunun uyarılması (77) gibi tedavi edici yöntemler doku rejenerasyonunda uygulanmaktadır.

XMU-MP-1(2.6.4-((5,10-dimethyl-6-oxo-6,10-dihydro-5H-pyrimido[5,4-b]thieno[3,2-e][1,4]diazepin-2-yl)amino)benzenesulfonamide) (kimyasal yapısı Şekil 2.5' de görülmektedir) MST1/2'nin güçlü ve seçici bir inhibitörüdür. Bu durum, kinaza yönelik bir bileşik kütüphanesinin, ELİSA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) temelli ileri teknoloji tarama yöntemi uygulanarak gösterilmiştir ve SAR (*Structure-activity relationship*) çalışmaları ile de XMU-MP-1'in MST1/2'ye hücresel etkilerinin hedefe yönelik olduğu doğrulanmıştır. Farelerde, XMU-MP-1'in farmakokinetik özellikleri MST1/2'nin aktivitesinin inhibisyonu için yeterlidir. XMU-MP-1 ilk olarak *Sprague-Dawley* sıçanlarda tek bir damar içi enjeksiyon ya da oral doz verilerek denenmiştir. XMU-MP-1 %39.5 biyoyararlanım ve 1.2 saat yarı-ömür ile uygun farmakokinetik sergilemiştir. Farmakodinamik deneylerde, periton içi 1 mg/ kg XMU-MP-1 uygulamasıyla MOB1 ve YAP'ın fosforillenmesi baskılanmış ve bu inhibisyon uygulamadan sonraki 1.5 ile 6 saat arasında maksimum seviyeye ulaşmıştır. XMU-MP-1'in karaciğer rejenerasyonunda etkisini araştırmak için farelerde, kısmi hepatektomi (karaciğerin üçte ikilik kısmının çıkarılması) öncesinde yedi gün boyunca günde bir kez XMU-MP-1 uygulanmış ve MOB1 ve YAP'ın fosforillenme seviyeleri düşmüştür. Kısmi hepatektomi sonrası ise karaciğer rejenerasyonu önemli ölçüde artmıştır. MST1/2 KO farelere XMU-MP-1 uygulanmıştır. Bu farelerde, kısmi hepatektomi sonrası 36. saatte karaciğer hücrelerinin bölünmesinde artış görülmemiştir. Bu durum, karaciğerdeki rejenerasyonun XMU-MP-1'in MST1/2 inhibisyonu sebebiyle olduğunu göstermektedir. XMU-MP-1 hasarlı doku tamirini ve rejenerasyonu kolaylaştırır ve sağlıklı organları etkilemez bu yüzden doku hasarını tedavi etmek için güvenli ve hedefli bir tedavi edici ilaç adayı moleküldür (14). Kalp hipertrofisinin Hippo yolağı tarafından düzenlenmesi ilgili bir çalışmada, yenidoğan farelerin kardiyomiyositlerinde fenilefrin molekülü ile indüklenmiş hipertrofi oluşturulmuştur. Sonrasında bu farelere on gün boyunca XMU-MP-1 uygulanmıştır. XMU-MP-1 uygulanması YAP aktivasyonunu arttırmış dolayısıyla MST1/2 ve takiben hipertrofinin de inhibisyonu gözlenmiştir (78).



XMU-MP-1

Şekil 2.5. XMU-MP-1'in kimyasal yapısı (14).

2.7. Ankrin Tekrar Proteinleri (Ankyrin Repeat Domain Proteins, *ANKRD*)

YAP/TAZ proteinleri hücrenin yapısı, şekli ve polaritesi için doğal sensörlerdir. YAP/TAZ'ın aktivasyonu, hücrenin hücre dışı matriks (ECM)'den aldığı mekanik sinyallere tepki verdiğini gösterir (79). *ANKRD1* YAP'ın hedef genlerinden biridir (80).

Ankrin tekrar proteinleri (MARF'lar), iskelet kasında titin ile ilişkili strese duyarlı proteinlerdir. MARF ailesinin üyeleri kardiyak ankrin tekrar proteini (*ANKRD1*/CARP), ankrin tekrar domain proteini 2 (*ANKRD2*/ARPP), diyabetle ilişkili ankrin tekrar proteini (*ANKRD3*/DARP)'dir. Bu proteinler mekanik algılama, farklı sinyal yollarında görev alma ve transkripsiyon düzenlenmesine kadar birçok farklı işleve sahiptirler. (81). Kasın strese yanıt yollarında rol aldıklarından, yaralanma ve hipertrofi ile CARP, gerilme ve denervasyonla *ANKRD2*/ARPP, açlık sonrası iyileşme ile de DARP proteinleri indüklenir (82).

Memeli *ANKRD1* geni zebra balığında *ankrd1a* ve *ankrd1b* genlerine karşılık gelmektedir. Zebra balığında *ankrd1b* ifadesi döllenmeden sonra 24. saatte belirgin

bir şekilde artmaya başlar ve 72. saatte pik (24. saate kıyasla 92 kat artış) yapmaktadır. *Ankrd1a* ise 24. saatte artmaya başlar ancak *ankrd1b*'ye kıyasla 72. saatte daha hafif bir artış (24. saate kıyasla 1.7 kat artış) göstermektedir. *Ankrd1a* ifadesi iskelet kası gelişimi sırasında gövde somitlerinde, *ankrd1b* ise kuyruk somitlerinde izlenmektedir. Döllenme sonrası yedi günlük gelişimde *ankrd2* ifadesi çok az saptanabilmiştir. MARP'lar zebra balığı yetişkin çizgili kasında nispeten düşük bir seviyede ifade edilmektedir. Art arda beş gün boyunca günde iki kez üç saat yüzme egzersizi yaptırılan zebra balıklarının, kalp kasında *ankrd1a* 6.19 kat artmıştır (83). Ayrıca LGMD2R fenotipinde desmin ile lamin-B etkileşiminin olmaması nedeni ile oluşmuş “mekanotransdüksiyon hasarı” fenotipinin mekanosensitif genlerin veya gen ürünlerinin ifadesinin *in vitro* mekanotransdüksiyon modeli geliştirilerek kontrole göre mutant hasta hücresinin nasıl etkileneceğinin gösterilmesi amaçlanan bir tez çalışması sonucunda YAP'ın hedef genlerinden biri olan *ANKRD1*'in, LGMD2R'de kontrole göre hem statik hem mekanik yükleme durumlarında 11 kat arttığı gözlenmiştir (13).

2.8. Limb-girdle Kas Distrofisi ve *Desma* Mutant kg155 (-/-) Zebra Balıkları

2.8.1. Limb-girdle Kas Distrofisi

Limb-girdle kas distrofisi, proksimal ekstremité kaslarının gittikçe güçsüzleşmesi ile karakterizedir. Kalp ve solunum kasları ile birlikte diğer kaslar da etkilenir. Klinik seyirleri hızlı başlangıçlı olup şiddetli veya hafif seyredebilir(84).

LGMD2R (Limb Girdle Muscular Dystrophy 2R, MIM 615325/Orpha kod: 363543) fenotipinde *DES* geninin 7. eksonunda gözlenen 48 baz çifti uzunluğundaki insersiyon (c.1289-2A>G) desmin proteininin lamin B bağlanma bölgesi olarak tanımlanan domaininde hasar oluşturmaktadır (11). Yabanıl tip zebra balığı kasında yapılan birlikte immünöktürme deneyi, bu iki proteinin etkileşim halinde olduğunu ve Duolink-PLA deneyi ise bu etkileşimin tüm kas çekirdeklerinin yalnızca %30'unda olduğunu göstermiştir (85, yayınlanmamış veri). Desmin-lamin B etkileşiminin tüm çekirdeklerde olmaması, bu etkileşimin kas hücreleri için mekanik yükleme olduğunda gerçekleştiğini düşündürmüştür. Bunu destekleyen en önemli veri, mutant desmin proteininin sağlıklı bireyde ifade edilen desmin ile yaklaşık

olarak aynı düzeyde ifade edilmesine rağmen hastada kas dejenerasyonu gözlenmesidir. LGMD2R hasta ve sağlıklı kas dokusunda yapılan çalışmada mekanik iletiyi düzenleyen Hippo yolağında görevli bir transkripsiyon faktörü olan YAP proteini sağlıklı kas filamentleri içerisinde bulunan çekirdeklerin %37,5'sinde görülürken, hasta örneğinde bu oranın %15,1'e düştüğü gözlenmiştir (13). Ayrıca, hastanın erken yaşlarda değil, 40'lu yaşları takiben hastalık semptomlarını göstermesi de hastada mekanotransdüksiyon mekanizmasındaki bu hasarın mekanik yüklenmeye bağlı olarak zaman içerisinde kas dejenerasyonu oluşturduğu sonucunu desteklemektedir.

2.8.2. *Desma* Mutant kg155 (-/-) Zebra Balığı

Desmin c.1289-2A>G mutasyonunun zebra balığında modellenmesi amacıyla TALEN genom düzenleme aracı kullanılarak *desma* 8. eksonun lamin B bağlanma bölgesinde c.1273delAG mutasyonu oluşturulmuştur. Homozigot mutasyon taşıyan 96 saatlik embriyolarda ve erişkin mutant zebra balıklarında iskelet kasında *desma* ifadesi mRNA düzeyinde incelenmiş ve mutant embriyolarda yabanıl tipe oranla %66 oranında azalış tespit edilirken erişkin mutant balıklarda da *desma* ifadesinin yabanıl tipe oranla %55 oranında azaldığı tespit edilmiştir (Yayınlanmamış veri). Erişkin mutant balığa ait kas dokusu kesitleri elektron mikroskopunda incelendiğinde mutant zebra balığında miyofibrillerin birbirinden ayrıldığı ve sarkomerik organizasyonun bozulduğu ve yer yer nekrotik alanlar bulunduğu gözlenmiştir. Ek olarak miyofibril kayıplarının olduğu alanlarda anormal krista yapısıyla farklı şekil ve boyutlarda mitokondri gözlenmiştir. Ancak bu bulgu yalnızca bir mutant balıkta incelenmiştir (12). Mutant balığa ait en önemli veri, sitozolik kalsiyum sinyali ile ilişkilidir. Bilindiği üzere sitozolik kalsiyum sinyali artınca fiberde kasılma başlar. Kalsiyum konsantrasyonu yüksek kaldığı sürece kasılma devam eder. Kasılmanın bitip gevşemenin sağlanması için sitozolik kalsiyum konsantrasyonunun istirahat seviyesine gevşemesi gerekir. Bir uyarıyı takip eden süreçte hücre içi kalsiyum konsantrasyonunun kısa süre için artıp azalmasına kalsiyum geçiş sinyali denir. Uyarılma ile ER'dan sitozole kalsiyum salınır daha sonra ise bu kalsiyum ER tarafından geri toplanır. Bir yaşındaki *desma* mutant kg155 (-/-) balığın kas fiberleri incelendiğinde uyarılma sonrası sitozole kalsiyum salınımı, kontrol ile benzerlik

göstermiştir ancak sitozolden kalsiyumun geri toplanması süresinin kontrole göre yavaşladığı, kalsiyum geçiş sinyalinde sönme aşamasının uzadığı ve özellikle uzun akım uyarısı uygulandığında bu farkın daha belirgin hale geldiği görülmüştür. Bu bulgular kalsiyum transientini söndüren mekanizmaların mutasyondan etkilenmiş olabileceğini göstermektedir (12)

2.9. Hipotez ve Amaç

Bu tez çalışmasında zebra balığında ilaç uygulama algoritmasını geliştirmek ve ilişkili teknik altyapıyı oluşturmak üzere aşağıdaki hipotez kapsamında çalışılmıştır.

Hipotez: XMU-MP-1, hippo yolağını baskılayarak YAP'ın çekirdeğe taşınmasını ve kas kütlesinin artışı ile ilgili genlerin aktifleşmesini sağlayarak zebra balığı *desma* mutasyonunun neden olduğu kas distrofisi fenotipini düzeltir veya hafifletir.

Yukarıdaki hipotez doğrultusunda;

Tezin amaçları,

- Zebra balığı embriyolarına ilaç uygulama algoritmasını laboratuvarımızda oluşturabilmek,

- Zebra balığı erişkinlerine uygulanacak kas içi ilaç uygulama protokolünün laboratuvarımızda standardizasyonu,

- Algoritma oluşturulması ve teknik altyapının optimizasyonu için tez araştırmasını, ilaç adayı olarak XMU-MP-1 molekülünün *desma* c.1273delAG mutasyonu taşıyan *desma* mutant kg155 (-/-) zebra balığı embriyolarına ve erişkinlerine tedavi amaçlı verilmesi ve molekülün, mutasyonun neden olduğu kas distrofisi fenotipi üzerindeki etkisini *ankrd1a* ifadesini değiştirerek göstereceği şeklinde sunulan hipotez üzerinde gerçekleştirmektir.

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. Gereçler

3.1.1. Zebra Balıkları

Çalışmada incelenen zebra balıkları, Hacettepe Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma ve Uygulama Merkezi Zebra Balığı Araştırma Laboratuvarı'nda Tarım ve Orman Bakanlığı tarafından bildirilen hayvan refahı yönetmeliğine uygun olarak yetiştirilmiştir.

Tüm deneyler, Hacettepe Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun onayı alınarak (10.07.2018 tarihli, Karar no: 2018/33-10) yapılmıştır (EK-1).

Bu tez çalışması kapsamında, yabanıl tip AB ve laboratuvarımızda TÜBİTAK 214S174 projesi kapsamında oluşturulan *desma* mutant kg155 (-/-) zebra balıkları kullanılmıştır. *Desma* mutant kg155 (-/-) zebra balıkları, LGMD2R hastalığını modellemek üzere TALEN genom düzenleme aracı ile *desma* üzerindeki lamin B bağlanma bölgesinde c.1273delAG mutasyonu oluşturularak üretilmiştir.

3.1.2. Zebra Balıklarının Bakımı ve İdamesi

Zebra balığı embriyo solüsyonu (60X stok solüsyon):

NaCl (Merck): 5.00 mM

KCl (Carlo Erba): 0.17 mM

CaCl₂.2H₂O (Sigma): 0.33 mM

MgCl₂.6H₂O (Merck): 0.33 mM

dH₂O ile 1000 ml'ye tamamlanarak +4°C'de saklanmıştır.

1X embriyo solüsyonu, 60X stok solüsyondan dH₂O ile sulandırılarak hazırlanmış ve 1X solüsyona, metilen mavisi (Sigma, ABD) %0.01 (w/v) eklenerek oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir.

Zebra balıklarına yedirilen yemler:

- Toz artemia, 100 mikron (Gemma, Hollanda)
- Granül yem, 500 mikron (Gemma, Hollanda)
- Artemia yumurtası (Salt Lake Aquafeed, Premium Artemia Cyst)

3.1.3. Zebra Balığı Embriolarında Toksisite Deneyi

- 4 adet 96-kuyucuklu hücre kültürü kapları
- 1X embriyo solüsyonu
- XMU-MP-1 (Katalog. No.: HY-100526) stok çözeltisi %99.9 DMSO (Dimetil sülfoksit) (AppliChem GmbH, Almanya) içerisinde
- 3,4-dikloroanilin (embriyolarda toksik etkisi olduğu bilinen molekül, pozitif kontrol)
- Parafilm
- 1 mL ve 5 mL serolojik pipetler
- Etüv inkübatör

3.1.4. Erişkin Zebra Balıklarında Toksisite Deneyi

- 5L'lik Zebra Balığı tankları
- pH metre
- İletkenlik ölçer
- Civalı kimya termometresi
- Hava motoru
- Akvaryum hava taşları
- Oksijen seviyesi ölçer (AZ Water Quality Meter Model:8603)
- Suda toplam sertlik analiz kiti (JBL GH Test, Almanya)

Tricaine (3-amino benzoik asitilester) stok çözeltisi:

Tricaine (Sigma, Kat.# A-5040): 400 mg

ddH₂O: 97.9 ml

1 M Tris (pH 9): ~ 2.1 ml

pH 7'ye ayarlanmıştır.

Hazırlanan tricaine stok çözeltisinin anestetik olarak kullanılması:

4.2 ml stok tricaine çözeltisi yaklaşık 100 ml sistem suyuna eklenmiştir.

3.1.5. Zebra Balığı Embriyolarında İlaç Uygulaması

- 96-kuyucuklu hücre kültürü kapları (ThermoFischer Scientific, ABD)
- 1X embriyo solüsyonu
- XMU-MP-1 (Katalog. No.: HY-100526) stok çözeltisi DMSO içerisinde
- Parafilm
- Etüv inkübatör

3.1.6. Erişkin Zebra Balıklarında İlaç Uygulaması

- Steril sünger
- Mikroenjeksiyon sistemi
- Mikroenjeksiyon iğnesi
- %70'lik etil alkol
- Distile su
- XMU-MP-1 (Katalog. No.: HY-100526) stok çözeltisi DMSO içerisinde
- 5L'lik Zebra Balığı tankları
- Tricaine (3-amino benzoik asitester) stok çözeltisi

3.1.7. Zebra Balığında Total RNA İzolasyonu

Zebra Balığı Embriyolarından Total RNA İzolasyonu:

- Kloroform (Carlo Erba, Fransa)
- İzopropanol (AppliChem, Almanya)
- RNase Zap (Ambion, ABD)

Erişkin Zebra Balığı Dokusundan RNA İzolasyonu:

- Kloroform (Carlo Erba, Fransa)
- %99.5 ve %75 Etanol
- RNase Zap (Ambion, ABD)

3.1.8. cDNA Sentezi

QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen, Almanya)

RNase Zap (Ambion, ABD)

3.1.9. Kantitatif Gerçek-Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (kGZ-PZR)

- SensiFAST SYBR No-ROX Kit (Bioline, İngiltere)
- Rotor – Gene 6000 (Corbett Life Science, Avusturalya)
- Forward ve Reverse Primerler (PRZ Bio Technology, Türkiye)

3.2. Yöntemler

3.2.1. Zebra Balıklarının Bakımı ve İdamesi

Laboratuvar hayvanlarının kullanıldığı araştırmalar 4R kuralı olarak belirtilen ve açılımı “*Replacement*” yerine koyma, “*Reduction*” azaltma, “*Refinement*” iyileştirme ve “*Responsibility*” sorumluluk olan temel ilkeler baz alınarak deney hayvanlarının refahları gözetilerek, istatistik hesabı etkilemeyecek en az sayıda hayvanın kullanılarak sağlıklı ortamlarda yapılması gerekmektedir. İlk olarak 1959 yılında Russell ve Burch’un (86) “İnsani Deney Tekniğinin İlkeleri”nin yayımlanmasıyla ile 3R kuralı olarak ortaya konulmuştur. (87). 4.R, araştırmacının laboratuvar hayvanını kullandıktan sonra öldürülmesi aşamasında da ona karşı vicdani bir sorumluluğa sahip olmasını ifade etmektedir (88).

Döllenmenin hemen ardından embriyolar toplanarak, petri kaplarında 1X embriyo solüsyonu içerisinde, 29 °C sabit sıcaklıktaki etüve alınmıştır. Daha sonra etüvden alınarak bir aylık juvenil döneme kadar kapalı devre akvaryum sisteminden bağımsız tanklar içerisinde, 25-27 °C laboratuvar ortamında, toz artemia ile beslenerek büyütülmüştür. Juvenil dönem sonrası zebra balıkları sisteme bağlı tanklara alınarak, sabah granül yem, öğlen ve akşam ise canlı artemia ile beslenmiştir.

3.2.2. Zebra Balığı Embriyolarında Toksisite Deneyi

Yabanıl tip zebra balığı embriyolarında toksisite deneyleri, 2013 OECD Kimyasal Testler Kılavuzu'nda, Balık Embryosu Toksisite (FET-*Fish Embryo Acute Toxicity*) Testi'ne uygun olarak gerçekleştirilmiştir. Toksisite testi, 96 kuyucuklu kaplarda, her kuyucukta bir embriyo olacak şekilde yapılmıştır.

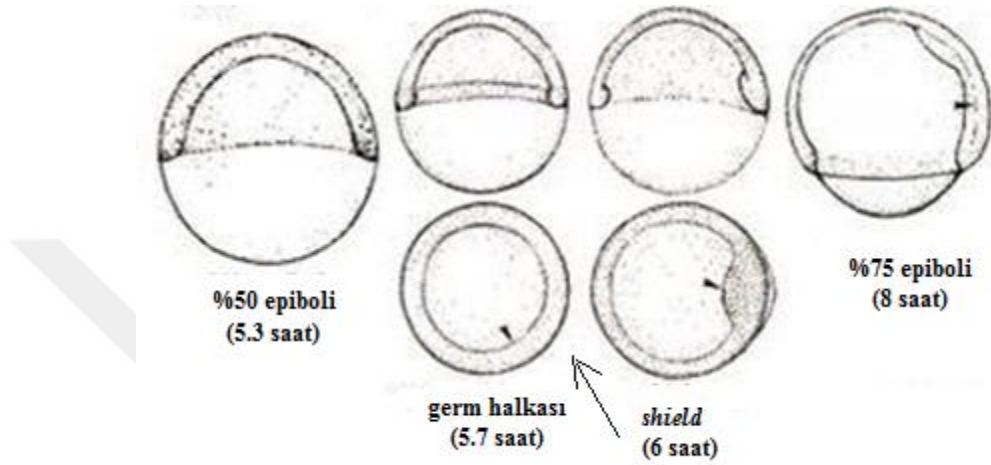
Toksisite deneyi için embriyoların hazırlanması: Döllenme sonrasında embriyolar, embriyo solüsyonuna alınmıştır. Döllenmemiş ve ölü embriyolar ayıklanmıştır. Canlı embriyolar 29 °C etüve kaldırılmıştır. Düzenli aralıklarla ölü embriyolar temizlenmiştir ve embriyo solüsyonu yenilenmiştir.

Toksisite deneyi için ilaç adayı (küçük molekül) molekülün hazırlanması: 10 mg toz XMU-MP-1, 1 ml DMSO'da çözülmüştür. Hazırlanan stoğun konsantrasyonu 10000 ppm'dir (ppm = mg çözünen / kg veya litre çözelti). Stok, embriyo solüsyonu ile ara stoğa ve ardından 100 mg/L'ye sulandırılmıştır. Uygulanmış olan en yüksek konsantrasyon 100 mg/L'dir. 1.5 sabit faktör ile aralıklı, seri dilüsyon yapılarak toplam 10 farklı konsantrasyonda ilaç uygulanmıştır. Her bir kuyucukta toplam çözelti hacmi 200 µl'dir.

Toksisite testi döllenmeden sonra 5.7-8. saat aralığındaki (%50 - %75 epiboli) embriyolara ilaç adayı molekül uygulanmasıyla başlatılır (25). %50 epiboli aşaması germ halkasının görünür hale geldiği en erken aşamadır. Toksisite testinin başlatıldığı gelişim aşaması Şekil 3.1.'de verilmiştir. Test 120. saate kadar sürdürülmektedir (89). İlaç adayı molekül uygulaması öncesinde tüm embriyoların benzer bölünme evresinde olduğu mikroskop altında hızlıca kontrol edilmiştir. Farklı bölünme evresinde olan embriyolar ayıklanmıştır. Ardından, varsa ölü embriyo kontrolü yapılmıştır, embriyo solüsyonu tazelenmiştir.

Hazırlanan ilaç adayı molekül, çözücü (ilaç adayı molekülün içinde çözüldüğü DMSO'dur) kontrolü, negatif kontrol (sadece embriyo solüsyonu) ve pozitif kontrol (embriyolarda toksik etkisi olduğu bilinen molekül 3,4-dikloroanilin çözeltileri kuyucuklara dağıtıldıktan sonra embriyolar kuyucuklara tek tek dağıtılmıştır. 96 kuyucuklu kaplar parafilmle kaplandıktan sonra 29°C etüve

kaldırılmıştır. Deney, 96 saat boyunca takip edilerek sürdürülmüştür. 96 saat sonrasında ölü, canlı ve embriyoların morfolojik görüntülerinin kontrolü yapıldıktan sonra deney sonlandırılmıştır. LC50 (%50'sini öldüren doz) hesaplanmıştır. Deney düzeneği Şekil 3.2.'de verilmiştir.



Şekil 3.1. Toksisite testi embriyo gelişim evresi. Toksisite testinin başlatıldığı embriyo gelişim evresi ok ile gösterilmiştir (90).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	3,89 mg/L	3,89 mg/L	3,89 mg/L	2,59 mg/L	2,59 mg/L	2,59 mg/L	Çözücü Kontrolü	Çözücü Kontrolü	Çözücü Kontrolü	Negatif Kontrol	Negatif Kontrol	Negatif Kontrol
B	3,89 mg/L	3,89 mg/L	3,89 mg/L	2,59 mg/L	2,59 mg/L	2,59 mg/L	Çözücü Kontrolü	Çözücü Kontrolü	Çözücü Kontrolü	Negatif Kontrol	Negatif Kontrol	Negatif Kontrol
C	3,89 mg/L	3,89 mg/L	3,89 mg/L	2,59 mg/L	2,59 mg/L	2,59 mg/L	Çözücü Kontrolü	Çözücü Kontrolü	Çözücü Kontrolü	Negatif Kontrol	Negatif Kontrol	Negatif Kontrol
D	3,89 mg/L	3,89 mg/L	3,89 mg/L	2,59 mg/L	2,59 mg/L	2,59 mg/L	Çözücü Kontrolü	Çözücü Kontrolü	Çözücü Kontrolü	Negatif Kontrol	Negatif Kontrol	Negatif Kontrol
E	3,89 mg/L	3,89 mg/L	3,89 mg/L	2,59 mg/L	2,59 mg/L	2,59 mg/L	Çözücü Kontrolü	Çözücü Kontrolü	Çözücü Kontrolü	Negatif Kontrol	Negatif Kontrol	Negatif Kontrol
F	3,89 mg/L	3,89 mg/L	3,89 mg/L	2,59 mg/L	2,59 mg/L	2,59 mg/L	Çözücü Kontrolü	Çözücü Kontrolü	Çözücü Kontrolü	Negatif Kontrol	Negatif Kontrol	Negatif Kontrol
G	3,89 mg/L	3,89 mg/L	3,89 mg/L	2,59 mg/L	2,59 mg/L	2,59 mg/L	Çözücü Kontrolü	Çözücü Kontrolü	Çözücü Kontrolü	Negatif Kontrol	Negatif Kontrol	Negatif Kontrol
H	ik	ik	ik	ik	ik	ik	ik	ik	ik	ik	ik	ik

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Pozitif Kontrol	Pozitif Kontrol	Pozitif Kontrol									
B	Pozitif Kontrol	Pozitif Kontrol	Pozitif Kontrol									
C	Pozitif Kontrol	Pozitif Kontrol	Pozitif Kontrol									
D	Pozitif Kontrol	Pozitif Kontrol	Pozitif Kontrol									
E	Pozitif Kontrol	Pozitif Kontrol	Pozitif Kontrol									
F	Pozitif Kontrol	Pozitif Kontrol	Pozitif Kontrol									
G	Pozitif Kontrol	Pozitif Kontrol	Pozitif Kontrol									
H	ik	ik	ik									

Şekil 3.2. Zebra balığı embriyolarında toksisite testi düzeneği. Uygulanan 10 farklı ilaç adayı molekülün konsantrasyonu: 100 mg/L, 66.66 mg/L, 44.44 mg/L, 29.62

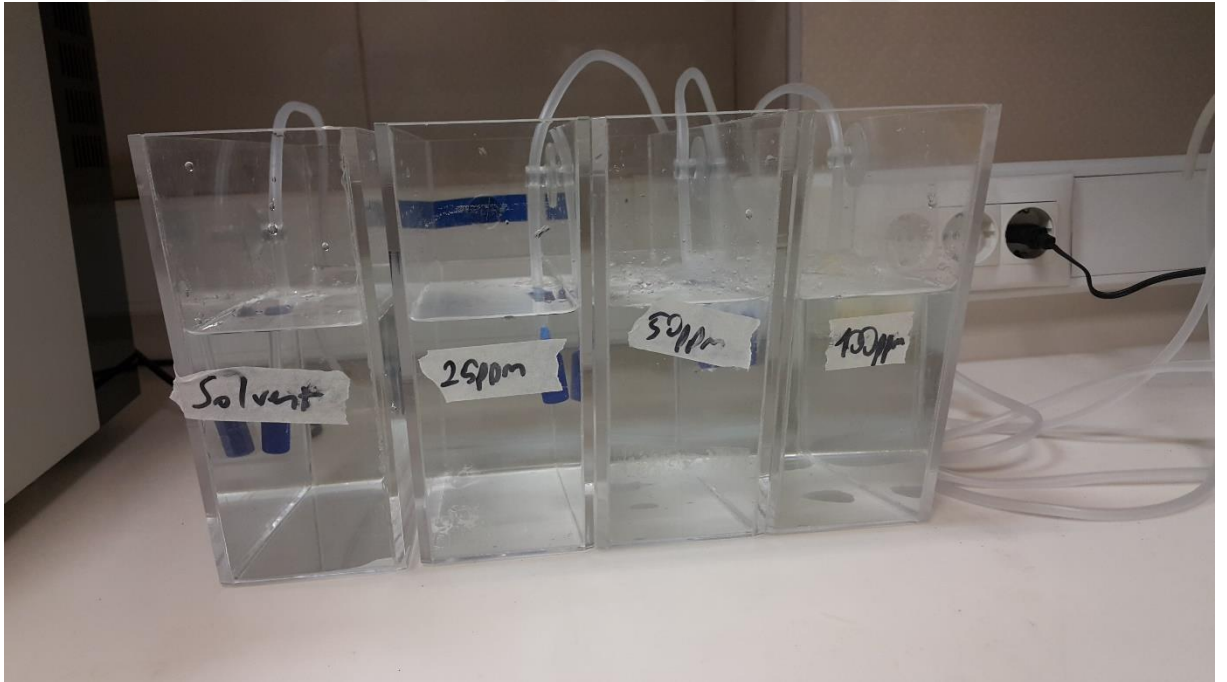
mg/L, 19.74 mg/L, 13.16 mg/L, 8.77 mg/L, 5.84 mg/L, 3.89 mg/L, 2.59 mg/L. Her bir kuyucuğa sadece embriyo solüsyonu içerisinde bir embriyo konulmuştur. Her farklı konsantrasyon 21 embriyoya uygulanmıştır. 210 embriyo ilaç adayı molekülün farklı konsantrasyonları için kullanılmıştır. Kuyucuklu kap içi kontrol (ik): 96 kuyucuklu kabın kendi içinde olası kontaminasyon durumunu gözlemek amacıyla kullanılmıştır. 39 embriyo kuyucuklu kap içi kontrol olarak kullanılmıştır. Negatif kontrol (nk): 21 embriyo negatif kontrol olarak kullanılmıştır. Pozitif kontrol (pk): 3,4-dikloroanilin ile muamele edilmiş 21 embriyo pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Çözücü kontrolü (çk): İlaç adayı molekülün içinde çözündüğü çözücü solüsyonun ilaç adayı molekül eklenmeden de embriyolar için toksik olup olmadığının anlaşılması için kullanılmıştır. Stok XMU-MP-1, DMSO içinde çözülmüştür. Çözücü kontrolü, embriyo solüsyonu içerisinde bulunan %1'lik DMSO çözeltisidir.

3.2.3. Erişkin Zebra Balıklarında Toksisite Deneyi

Yabanıl tip erişkin zebra balıklarında toksisite deneyleri, OECD Kimyasal Testler Kılavuzu'nda, Balık Toksisite Testi'ne uygun olarak ve yabanıl tip zebra balıkları kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Toksisite testinde, erişkin zebra balıkları 2L sistem suyu ile doldurulan balık tanklarında yaşamlarını sürdürmüştür (Şekil 3.3.). Toksisite deneyi öncesi ve sonrası balıkların bulunduğu tanklardaki sistem suyunun toplam sertlik, su oksijen seviyesi ölçümleri yapılmıştır (EK-2). Her tankta beş balık bulunmaktadır (ilaç aday molekülünün farklı üç konsantrasyonu için 15 ve çözücü kontrol için 5 balık). Erişkin toksisite deneyinde ilaç adayı molekülün 3 farklı konsantrasyonu denenmiştir. OECD kılavuzunda aday ilaç molekülünün balığın ortamına verilmesiyle ilişkili bilgiler sunulmuştur. Bunları temel alarak su ortamına verilen konsantrasyonlara eş değer olan konsantrasyonlar erişkin zebra balığının vücut ağırlığına göre hesaplanarak uygulanmıştır. Kullanılan erişkin zebra balıkları ortalama 0.5 g vücut ağırlığına sahip olduklarından 100 mg/L'ye eş değer konsantrasyon 0.05 mg/kg'dır. Diğer iki konsantrasyon ise 0.025 mg/kg ve 0,0125 mg/kg'dır. Çözücü kontrolü olarak DMSO uygulanmıştır. Ayrıca, iğnenin erişkin balıkta oluşturduğu stresi test etmek için, bir balığa sadece iğne batırılarak 96 saat takip edilmiştir. İlaç adayı molekül, kas hastalığının tedavisi için uygulanması

hedeflendiğinden erişkin balıkların doğrudan sırt kası içine enjeksiyon yöntemi ile yapılmıştır. Yapılan kas içi enjeksiyon yöntemi detayları aşağıda anlatılmıştır:

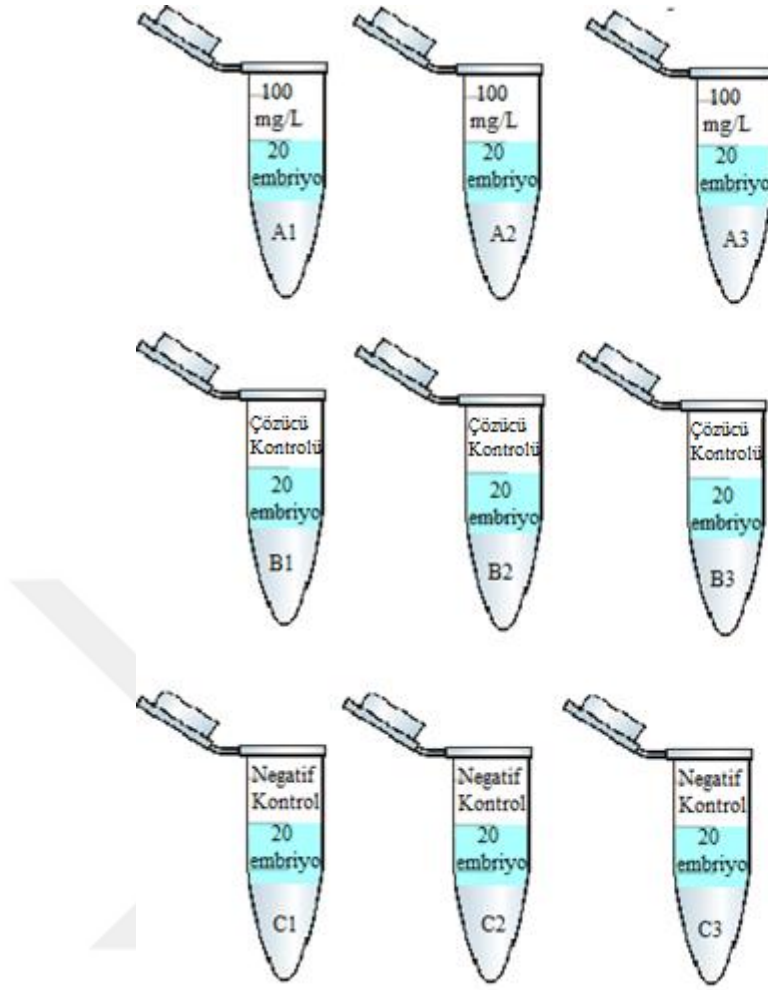
1. Yumuşak bir süngerin üst kısmında, yaklaşık bir erişkin zebra balığının sığacağı şekilde kesilerek boşluk oluşturulmuştur.
2. Sünger sistem suyuyla ıslatılmıştır. Süngerin sürekli ıslak kalması sağlanmıştır.
3. Erişkin balık, tricaine ile anesteziye alındıktan sonra, süngerdeki boşluğa dikkatlice yerleştirilmiştir.
4. Uygulanacak çözelti, iğne yardımıyla dorsal yüzgecin sağ tarafına enjekte edilmiştir.
5. Enjeksiyon sonrası zebra balıkları tanklara alınmıştır.
6. Zebra balıkları, 96 saat takip edilmiştir ve bu süreç boyunca hava motoru kullanılarak tanklara oksijen verilmiştir.
7. 96 saat sonra ölü-canlı sayısı belirlenerek deney sonlandırılmıştır. LC50 (%50'sini öldüren doz) hesaplanmıştır.



Şekil 3.3. Erişkin zebra balığında toksisite testi için tank düzeneği.

3.2.4. Zebra Balığı Embriyolarında İlaç Uygulaması

Yabanıl tip zebra balığı embriyolarına ilaç uygulaması döllenmeden sonra 24. saatte yapılmıştır. Embriyolar, taze solüsyon içerisine alındıktan sonra ölü ve normal görünümde olmayan embriyolar uzaklaştırılmıştır. Koryonu olan embriyolar koryondan çıkarılmıştır. İlaç adayı molekül (100 mg/L XMU-MP-1 içeren embriyo solüsyonu içerisinde), çözücü kontrolü (%1 DMSO içeren embriyo solüsyonu) ve negatif kontrol (sadece embriyo solüsyonu) çözeltileri kuyucuklara dağıtılmıştır. Ardından embriyolar bu çözeltilerin içine konulmuştur. Deney, ilaç adayı molekülün uygulandığı 60 embriyo, çözücü kontrolü için 60 embriyo ve negatif kontrol için 60 embriyo olmak üzere 180 yabanıl tip embriyo ile gerçekleştirilmiştir. Kuyucuklu kap parafilmle kaplandıktan sonra kapatılarak 29°C'deki etüve kaldırılmıştır. Embriyolar 3.5 saat etüvde bekletilmiştir. RNA izolasyonu için gerekli en az embriyo sayısı 20'dir. Bu sebeple, her 20 embriyo bir biyolojik tekrar olarak kabul edilerek 3'er tekrar yapılmıştır (Şekil 3.4.). Embriyolar, 3.5 saatin sonunda trizol konulmuş tüplere alınmıştır. Takiben RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. RNA'lardan cDNA sentezi ardından kGZ-PZR çalışması ile *ankrd1a* ifadesindeki farklılıklara bakılmıştır. İlaç adayı molekül uygulamasının yabanıl tip erişkinlerde optimizasyonu yapıldıktan sonra yukarıda belirtilen aşamalar *desma* mutant kg155 (-/-) x *desma* mutant kg155 (-/-) erişkin balıkların çiftleştirilmesiyle alınan *desma* mutant kg155 (-/-) embriyolara da aynı şekilde uygulanmıştır.

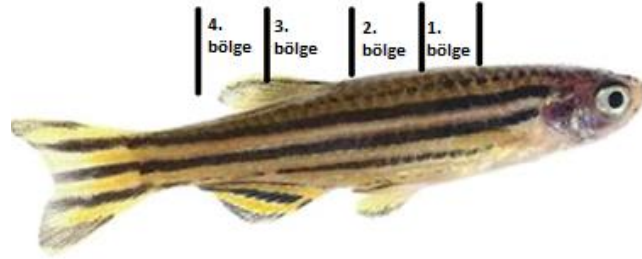


Şekil 3.4. Zebra balığı embriyolarına ilaç uygulaması. 96 kuyucuklu kaptaki ilaç uygulamasından 3.5 saat sonra, embriyolar bulundukları çözeltiden uzaklaştırılarak RNA izolasyonu için ependorf tüplere alınmıştır. Gruplar: A1,A2,A3: 100 mg/L ilaç adayı molekül (XMU-MP-1) çözeltisi uygulanan embriyolar; B1,B2,B3: Çözücü kontrolü (DMSO) uygulanan embriyolar; C1,C2,C3: Negatif kontrol olarak sadece embriyo solüsyonu uygulanan embriyolar. Şekilde gösterilen her grupta 20’şer embriyo bulunmaktadır. 1,2,3: tekrar sayısı A,B,C: grup.

3.2.5. Erişkin Zebra Balığında İlaç Enjeksiyon Bölgesinin Belirlenmesi

Erişkin zebra balıklarında ilaç adayı molekülün enjeksiyonunun yapılacağı bölgenin belirlenmesi için yabancıl tip erişkin balıkta sırt kası dört bölgeye ayrılmıştır (Şekil 3.5.). Belirlenen dört bölgeden doku parçası alınarak RNA izole edilmiştir.

RNA’lardan cDNA sentezi ardından kGZ-PZR çalışması ile *ankrd1a* ifadesindeki farklılıklara bakılmıştır.



Şekil 3.5. Zebra balığı enjeksiyon bölgesinin belirlenmesi.

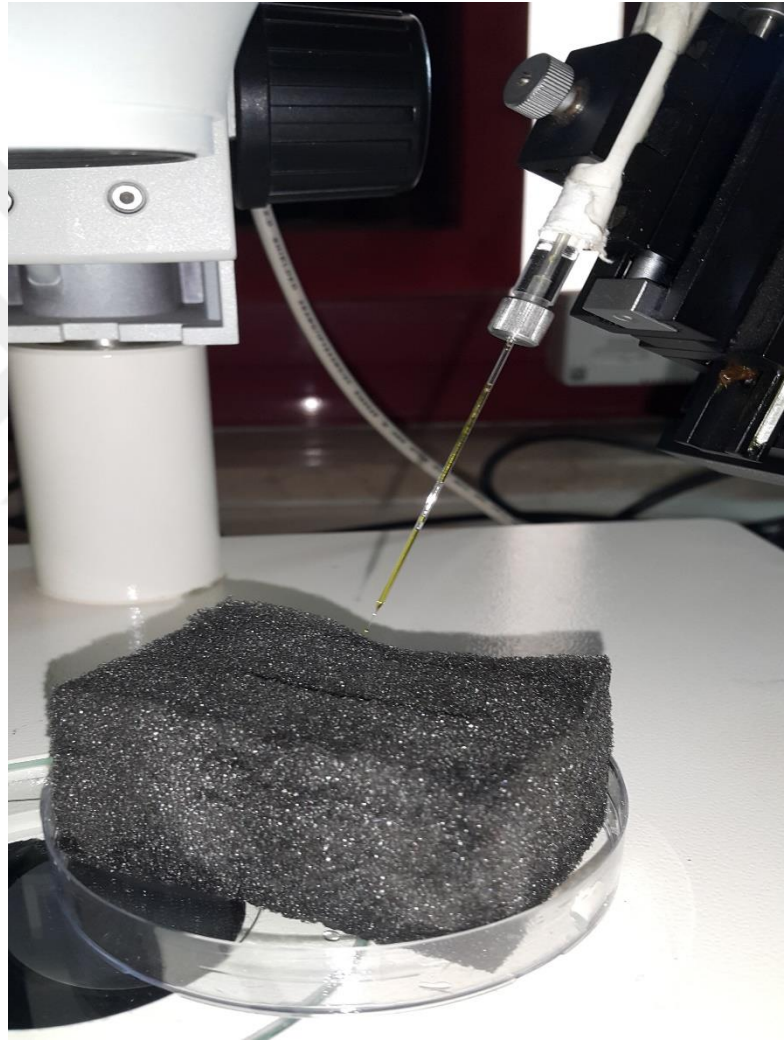
3.2.6. Erişkin Zebra Balığında Enjeksiyon Stresinin Belirlenmesi

Erişkin zebra balıklarına ilaç uygulaması mikroenjeksiyon iğnesi ile yapılacağından balığın sırt kasına iğne batırıldığında bu işlemin balıkta ilave bir stres (Örneğin bu çalışmada Hippo yolağı mekanik uyarılara karşı hassas bir yolak olduğu için mikroenjeksiyon iğnesi ile enjeksiyon yapılmasının ilaç uygulamasından bağımsız olarak kasta oluşturabileceği stres kontrol edilmiştir) oluşturup oluşturmadığı test edilmiştir. Daha önce belirlenen enjeksiyon bölgesine sadece mikroenjeksiyon iğnesi batırılmıştır. İşlem sonrasında zebra balıkları tanklara alınmıştır. Balıklar tanklara alındıktan 3.5 saat sonra, enjeksiyon bölgesinden yaklaşık $4 \times 3 \times 2 \text{ mm}^3$ boyutlarındaki bölge bistüri ile kesilerek RNA izolasyonu için trizol konulmuş ependorflere alınmıştır. RNA’lardan cDNA sentezi ardından kGZ-PZR çalışması ile *ankrd1a* ifadesindeki farklılıklara bakılmıştır.

3.2.7. Erişkin Zebra Balıklarında İlaç Uygulaması

Yabanıl tip erişkin zebra balığına ilaç uygulaması, mikroenjeksiyon iğnesi yardımıyla kas içine yapılmıştır. Steril, yumuşak bir süngerin üst kısmında, yaklaşık bir erişkin zebra balığı sığacak şekilde kesilerek boşluk oluşturulmuştur (Şekil 3.6.). Sünger %70’lik etil alkol sonrası distile sudan geçirilmiş, ardından sistem suyuyla ıslatılmıştır. Erişkin balık, tricaine ile anesteziye alındıktan sonra, süngerdeki boşluğa dikkatlice yerleştirilmiştir Uygulanacak çözelti mikroenjeksiyon iğnesi ile dorsal yüzgecin sağ tarafına enjekte edilmiştir (Şekil 3.7.). Enjeksiyon sonrası zebra

balıkları tanklara alınmıştır. Balıklar tanklara alındıktan 3.5 saat sonra, enjeksiyon bölgesinden yaklaşık $4 \times 3 \times 2 \text{ mm}^3$ boyutlarındaki bölge bistüri ile kesilerek RNA izolasyonu için trizol konulmuş ependorflere alınmıştır. RNA'lerden cDNA sentezi ardından kGZ-PZR çalışması ile *ankrd1a* ifadesindeki farklılıklara bakılmıştır. İlaç adayı molekül uygulamasının yabancı tip erişkinlerde optimizasyonu yapıldıktan sonra yukarıda belirtilenler *desma* mutant kg155 (-/-) erişkinlerine aynı şekilde uygulanmıştır.



Şekil 3.6. Mikroenjeksiyon iğnesi ile kas içine enjeksiyon sistemi.



Şekil 3.7. Mikroenjeksiyon iğnesinin uygulama noktası. Erişkin balığın sırt kasına ilaç uygulamasında mikroenjeksiyon iğnesinin batırıldığı nokta ok işareti ile gösterilmiştir.

3.2.8. Zebra Balığı Embriolarından Total RNA İzolasyonu

Total RNA izolasyonu, yabanıl tip AB zebra balıklarının çiftleştirilmesinden elde edilen embriolardan yapılmıştır. Döllenmeden sonra 24. saatte embriyolar her grupta 20'şer olacak şekilde negatif kontrol, çözücü kontrolü ve ilaç adayı molekül uygulaması için ayrılmıştır. Her gruptan 3'er tekrar yapılmıştır. Uygulamadan 3.5 saat sonra aşağıdaki protokol takip edilerek RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. İzole edilen RNA'ların konsantrasyon ve saflığı nanospektrofotometrik ölçümlerle belirlenmiştir (EK-3).

1. Embriyolar koryonlarından çıkarılmıştır.
2. 20 embriyo nükleaz içermeyen 1.5 ml'lik tüplere alınmıştır, tüp içerisindeki tüm sıvı uzaklaştırılmıştır.
3. Tüplere 250 µl trizol eklenmiş, RNase Zap ile temizlenen bir pens yardımıyla mekanik kuvvet uygulanarak, embriyolar homojen hale getirilmiştir.
4. Trizol eklenerek toplam hacim 1 ml'ye tamamlanmıştır.
5. Tüpler 5 dk. oda sıcaklığında bekletilmiştir.
6. Tüplere 200 µl nükleaz içermeyen kloroform eklenmiştir ve yaklaşık 15 sn tüpler çalkalanmıştır.

7. Tüpler 2 dk. oda sıcaklığında bekletildikten sonra +4°C'de 12000 g'de 15 dk. çöktürme işlemi yapılmıştır. Çöktürme sonrası oluşan şeffaf üst faz yeni bir tüpe aktarılmıştır.
8. 500 µl nükleaz içermeyen izopropanol eklenmiştir ve 10 dk. oda sıcaklığında bekletilerek RNA çöktürülmüştür.
9. Tüpler +4°C'de 12000 g'de 10 dk. santrifüj edilmiştir.
10. RNA peletine dikkat edilerek sıvı uzaklaştırılmıştır ve 1 ml nükleaz içermeyen %75 etanol konulmuştur.
11. Tüpler +4°C'de 7500 g'de 5 dk. santrifüj edilmiştir. RNA peletine dikkat edilerek tüm sıvı çekilmiştir, ardından tüpler kurutulmuştur.
12. Tüpler kurutulduktan sonra pelet üzerine 30 µl nükleaz içermeyen su eklenmiştir ve 55°C'ye ayarlanmış inkübatörde 10 dk. denatüre edilmiştir.
13. NanoDrop ND-1000 cihazında nanospektrofotometrik ölçümler gerçekleştirilmiştir.

3.2.9. Erişkin Zebra Balığı Dokusundan RNA İzolasyonu

Yabanıl tip erişkin zebra balıkları ve *desma* mutant kg155 (-/-) erişkin balıklar, negatif kontrol herhangi bir uygulama yapılmamış), çözücü kontrolü ve ilaç adayı molekül uygulanmış embriyolar olarak gruplandırılmıştır. Ayrıca, mikroenjeksiyon iğnesinin stresinin araştırılması için de ayrı bir grup oluşturulmuştur. Her balıkta aynı bölgeden olmak üzere, mikroenjeksiyon iğnesi ile kas içi enjeksiyonun yapıldığı doku alınarak RNA izolasyonu yapılmıştır. İzolasyon, uygulamadan 3.5 saat sonra aşağıdaki protokol takip edilerek gerçekleştirilmiştir. İzole edilen RNA'ların konsantrasyon ve saflığı nanospektrofotometrik ölçümlerle belirlenmiştir (EK-3).

1. Doku parçası nükleaz içermeyen tüplere alınmıştır ve üzerlerine 1 ml trizol konulmuştur.
2. Vidalı kapaklı tüplere 1/3 oranında cam boncuklar konulmuştur. Doku parçası ve trizol vidalı kapaklı tüplere aktarılmıştır.
3. Fastprep cihazında 6.0 hızda 40 sn. doku homojenize edilmiştir.
4. Doku homojenizasyonu sonrası cam boncukları uzaklaştırmak için tüpler +4°C'de 12000 g'de 5 dk. santrifüj edilmiştir.

5. Trizol olan faz yeni tüplere alınmıştır. Üzerlerine 200 µl nükleaz içermeyen kloroform eklenmiştir ve 10 sn vortekslenmiştir, ardından 5 dk. oda sıcaklığında bekletilmiştir.
6. Tüpler +4°C'de 12000 g'de 15 dk. santrifüj edilmiştir.
7. Çöktürme sonrası üst faz yeni tüplere aktarılmıştır. Üzerine 750 µl nükleaz içermeyen soğuk saf etil alkol eklenmiştir.
8. Tüpler -20°C'de 30 dk bekletilmiştir. Ardından +4°C'de 12000 g'de 10 dk. santrifüj edilmiştir.
9. Pelete dikkat edilerek üst faz uzaklaştırılmıştır. Üzerine 1 ml %75 etil alkol eklenmiştir. Ardından 2 sn karıştırılmıştır.
10. Tüpler +4°C'de 12000 g'de 5 dk. santrifüj edilmiştir.
11. Pelete dikkat edilerek üst faz uzaklaştırılmıştır.
12. Tüpler, 55°C'ye ayarlanmış inkübatöre konularak etil alkol uzaklaştırılmıştır.
13. Tüpler kurutulduktan sonra pelet üzerine 20 µl nükleaz içermeyen su eklenmiştir ve 60°C'ye ayarlanmış inkübatörde 1 dk. bekletilerek pelet çözülmüştür.

3.2.10. cDNA Sentezi

1. Embriyolara ve erişkin zebra balığı kas dokularına ait RNA'lerden cDNA sentezi için QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen) kullanılmıştır. Protokol aşağıda yazılmıştır.

cDNA sentezi çalışmasında kullanılan tüm malzemeler, RNaz Zap ve %0,1 oranında hazırlanan DEPC ile ribonükleazlardan arındırılmıştır.

Genomik DNA Wipeout reaksiyonu:

7X gDNA Wipeout Tamponu: 2 µl

Kalıp RNA: x µl (500 ng/µl olacak şekilde)

Nükleazsız dH₂O: (12-x) µl

Toplam: 14 µl

Örnekler 42 °C'de 5 dk. inkübe edilmiştir.

2. Her örnek üzerine, Reverse transkripsiyon karışımı 6 µl eklenmiştir (toplam miktar 20 µl) ve örnekler Gene Amplification PCR System 9700 (ABI) cihazında inkübe edilmiştir.

Reverse transkripsiyon karışımı:

Quantiscript RT: 1 µl

5X Quantiscript RT Tampon: 4 µl

RT Primer Karışımı: 1 µl

Toplam: 6 µl

Reaksiyon koşulları:

42 °C - 30 dk.

95 °C - 5 dk.

+4 °C - ∞

3. Sentezlenen cDNA'lar, dH₂O ile 1:4 oranında sulandırılarak kullanılmıştır.

3.2.11. Kantitatif Gerçek-Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (kGZ-PZR)

Embriyolara ve erişkin zebra balığı kas dokularına ait cDNA'la kullanılarak *actb1* ve *ankrd1a* amplifikasyon reaksiyonları aşağıda belirtilen koşullarda gerçekleştirilmiştir. Corbett Life Sciences Rotor-Gene 6000 cihazı kullanılmıştır. Kullanılan primer dizileri, PerlPrimer (versiyon 1.1.21) ve NCBI-Primer BLAST programları kullanılarak tasarlanmıştır. *Ankrd1a* ve *actb1* için kGZ-PZR ürünlerinin uygun uzunlukta olduğu ve özgül olmayan ürün amplifikasyonu olmadığı agaroz jel elektroforezi ile kontrol edilmiştir.

Tez kapsamında kGZ-PZR deneyi için kullanılan primer dizileri:

Gen	Forward 5'→3'	Reverse 5'→3'
<i>actb1</i>	TCTTCCAGCCTTCCTTCCTG	TGTGTTGGCATAACAGGTCCT
<i>ankrd1a</i>	GAAAAGCGAGAAACAACGAGA	GGTTCCTTTACAACCTGGAACCT

actb1 ve *ankrd1a* kGZ-PZR koşulları:

SensiFAST SYBRNo-ROX: 5 µl

Primer Forward (10 mM) : 0,4 µl

Primer Reverse (10 mM): 0,4 µl

dH₂O: 2,2 µl

cDNA: 2 µl

Toplam: 10 µl

Denatürasyon: 94 °C 2dk 1 döngü

Amplifikasyon: 94 °C 15 sn.

59 °C 60 sn.

40 döngü

Erime: 72 °C'den 95 °C'ye, her aşamada 1 °C artarak 1 döngü

Elde edilen veriler, Rotor-Gene 6000 Series Software 1.7 yazılımı ile analiz edilmiştir. Belirtilen yazılım kullanılarak, standart dilüsyon örnekleri ile standart eğri oluşturulmuş ve $\Delta\Delta C_t$ yöntemi ile göreceli kantitasyon hesabı yapılmıştır. Ayrıca amplifikasyonun özgüllüğü, erime eğrileri çizilerek doğrulanmıştır. Yabanıl tip AB, ve *desma* kg155 (-/-) zebra balığı örneklerinde, *ankrd1a* transkriptinin göreceli ifadesi, *actb1* ifadesine göre normalize edilerek hesaplanmıştır (EK-4-5-6). İstatiksel test olarak parametrik olmayan ve normal dağılım göstermeyen veriler için uygun olan Mann- Whitney U testi tercih edildi.

4. BULGULAR

4.1. Zebra Balığı Embriyolarında Toksisite Deneyi

Zebra balığı embriyolarının embriyo solüsyonu ortamına konulacak ilaç adayı molekülün konsantrasyonu OECD Kılavuzu temel alınarak toplam 312 embriyoda yapılan toksisite deneyi ile belirlenmiştir.

96 kuyucuklu kapların iç kontrolü olarak kullanılan 36 embriyodan biri, ilaç aday molekülünün uygulandığı 210 embriyodan biri, çözücü kontrolü olarak kullanılan 21 embriyodan biri ve negatif kontrol olarak kullanılan 21 embriyodan biri ölmüştür. Pozitif kontrollerin ise beklenildiği üzere tamamı ölmüştür. Ayrıca embriyolarda normal olmayan herhangi bir morfoloji görülmemiştir (EK-7). Denenen ilaç adayı molekülün farklı konsantrasyonlarının hiçbirinin ve çözücü kontrolün embriyoların %50'sinin ölümüne sebep olmadığı görüldüğünden LC50 hesaplanmamıştır. OECD kılavuzuna göre embriyolara uygulanacak toksisitesi ölçülecek olan molekülün deney düzeneğinde sınır kullanım değeri 100 mg/L olması tavsiye edilmektedir. Toksisite deneylerinde 100 mg/L kullanılmasına rağmen ölüm oranları çok düşük çıktığından, ilaç adayı molekülün toksik etkisinin olmaması nedeniyle embriyolar için 100 mg/L uygulanacak ilaç dozu olarak belirlenmiştir.

XMU-MP-1'in keşfedildiği çalışmada farelerde periton içi uygulama yapılırken ilaç adayı, %20 Kolliphor HS 15 içeren %0.1'lik sitrik asit çözeltisinde çözülmüştür (14). Bu çözelti embriyolara farklı konsantrasyonlarda verilerek toksik etkisine bakılmıştır. Kolliphor HS 15 yabancı tip embriyolarda toksik etki göstermiştir. Toksik etki ancak %0.1'lik sitrik asit çözeltisine %0.002 Kolliphor HS 15 konularak hazırlanan sulu çözeltide görülmemiştir. Ancak ilaç adayı molekül yine tamamen çözülmediğinden bu çözelti ile çalışılmamıştır.

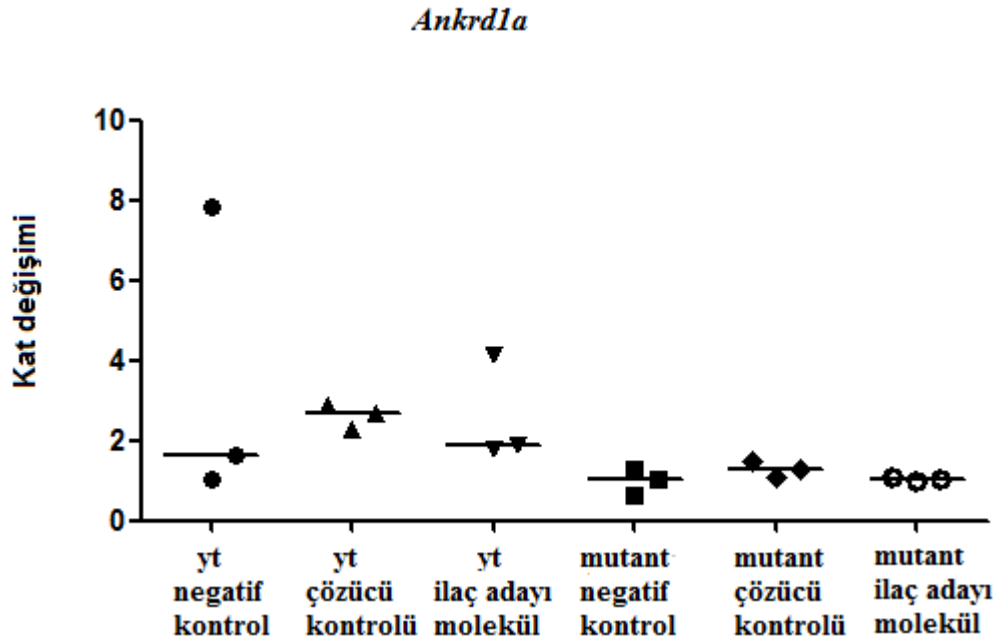
4.2. Erişkin Zebra Balıklarında Toksisite Deneyi

Erişkin zebra balıklarında uygulanacak ilaç dozunu belirlemek amacıyla balığın ağırlığına göre hesaplanan 0.05 mg/kg ilaç molekülünün uygulandığı beş balıktan biri ölmüştür. 0.025 mg/kg ilaç molekülü uygulandığı beş balığın ve çözücü kontrolün uygulandığı beş balığın tamamı canlıdır. Denenen konsantrasyonların

hiçbirinin ve çözücü kontrolün erişkinlerin %50'sinin ölümüne sebep olmadığı görüldüğünden LC50 hesaplanmamıştır. OECD kılavuzuna göre erişkinlere uygulanacak toksisitesi ölçülecek olan molekülün deney düzeneğinde sınır kullanım değeri 100 mg/L (vücut ağırlığına göre oranlandığında 0.05 mg/kg) olması tavsiye edilmektedir. Toksisite deneylerinde önerilen en yüksek dozu kullanmamıza rağmen ölüm oranları düşük çıktığından, ilaç adayı molekülün yüksek toksik etkisinin olmadığı bu nedenle erişkinler için 0.05 mg/kg, uygulanacak ilaç dozu olarak belirlenmiştir. Bir erişkin balığın ortalama vücut ağırlığı göz önüne alınarak hesaplanan miktardaki ilaç molekülü mikroyenjeksiyon iğnesi ile erişkin zebra balığı kası içine uygulanmıştır.

4.3. Zebra Balığı Embriolarında İlaç Uygulaması

İlaç adayı molekülün etkilerini yabanıl tip ve mutant zebra balığı embriolarında görmek ve ilaç adayı molekül uygulamasının optimizasyonu amacıyla toksisite deneyiyle belirlenen konsantrasyonda hazırlanan ilaç adayı molekül, kuyucuklu kaplara konulan embrioların sulu ortamına uygulanmıştır. İlaç adayı molekülün etkisini karşılaştırabilmek için kuyucuklarda sadece embriyo solüsyonu, ilaç adayı molekülün çözündüğü çözücüü içeren çözelti ve ilaç adayı molekülün bulunduğu sulu çözelti olmak üzere üç grup oluşturulmuştur. Uygulama sonrası embriolar doğal ortamlarında tutulmuştur. *Ankrd1a* ifadesi zebra balığında döllenmeden sonra 24. saatte belirgin bir şekilde artış gösterdiği için ilaç adayı molekülün etkisinin araştırılması için 24. saatte ilaç uygulaması yapılmıştır (72). Döllenmeden sonra 24. saatte her bir grupta 120 embriyo olmak üzere toplam 360 (yabanıl tip ve mutant embrioların tamamı) embriyo kullanılmıştır. 3.5 saat boyunca uygulanan ilaç adayı molekülünün, *ankrd1a* ifadesinde etkisinin olup olmadığını belirlemek amacıyla kGZ-PZR çalışması yapılmıştır. Grafiksel gösterimlerde GraphPad Prism 5 kullanılmıştır (Şekil 4.1.). Metot bölümünde belirtildiği gibi RNA izolasyonu için minimum 20 embriyo gerekli olduğundan, 20 embriyo birleştirilerek bir havuz oluşturulmuş ve bir biyolojik tekrar olarak sayılmıştır. İstatistiksel analizler sonucunda negatif kontrol, çözücü kontrolü ve ilaç adayı molekülün uygulandığı gruplar arasında *ankrd1a* ifadesinde farklılık görülmemiştir ($p < 0.05$).

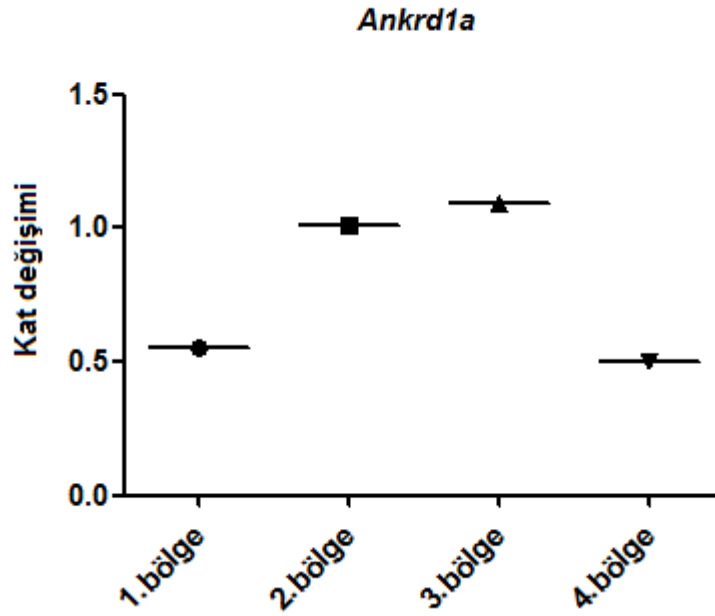


Şekil 4.1. Yabanıl tip ve mutant embriyolarda *ankrd1a* ifadesi. Döllenmeden sonra 24. saatteki embriyolar kullanılmıştır. Her nokta bir tekrarı göstermekte olup her tekrar 20 embriyodan oluşmaktadır. Mann-Whitney U testi uygulanmıştır.

4.4. Erişkin Zebra Balığında Kas İçi Enjeksiyon Bölgesinin Belirlenmesi

İlaç adayı molekülün embriyolar üzerindeki etkisine ilave olarak erişkin kasındaki etkilerinin incelenmesi de amaçlanmıştır. Bu nedenle, ilaç adayının kas dokusu üzerinde etki göstereceği beklendiğinden uygulama yöntemi olarak kas içine enjeksiyon yapılması tercih edilmiştir. Zebra balığı derisi pullu ve sırt kası nispeten sert bir bölge olduğundan enjeksiyonun yapılacağı uygun bölge aşağıda yazıldığı şekilde belirlenmiştir.

Erişkin zebra balığının sırt kası dört bölgeye ayrılmıştır. Metotta belirtilen aşamalar sırasıyla uygulanmıştır. İlgilenilen gen ifadesinin sırt kası boyunca aynı olup olmadığını belirlemek amacıyla kGZ-PZR çalışması yapılmış ve *ankrd1a* ifadesinde bu dört bölge arasında önemli farklılıklar bulunmadığından ergonomik açıdan en uygun bölge olan üçüncü bölge enjeksiyon bölgesi olarak belirlenmiştir. Grafiks gösterimlerde GraphPad Prism 5 kullanılmıştır (Şekil 4.2.).

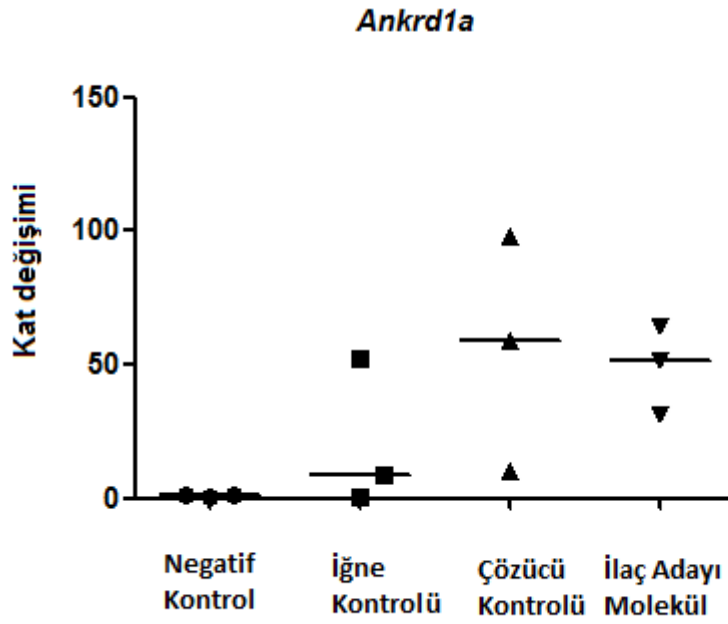


Şekil 4.2. Erişkin zebra balığı sırt kasında *ankrd1a* ifadesi.

4.5. Erişkin Zebra Balığında Enjeksiyon Stresinin Belirlenmesi

İlaç adayının etkilerini araştırmak amacıyla seçilen *ankrd1a* mekanik strese duyarlı bir gendir. Zebra balığı sırt kasına kas içi enjeksiyon yönteminin bu genin ifadesinde herhangi bir etkisi olup olmadığını araştırmak amacıyla enjeksiyon yapılan bölgeden alınan kas dokusu metotta belirtilen aşamalar uygulanmış ve kGZ-PZR çalışması yapılmıştır.

kGZ-PZR çalışması sonucu *ankrd1a* ifadesinde gözlenen kat değişimleri istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır. Erişkin zebra balığında mikronjeksiyon iğnesi ile kas içine enjeksiyon uygulamasının zebra balıklarında enjeksiyon stresi oluşturmadığı gözlenmiştir. Grafikselleştirme ve istatistiksel analizler GraphPad Prism 5 kullanılmıştır (Şekil 4.3.). Mann-Whitney U testi uygulanmıştır.



Şekil 4.3. Erişkin zebra balığında mikroenjeksiyon iğnesi ile kas içi enjeksiyon stresinin belirlenmesi, *ankrd1a* ifadesi.

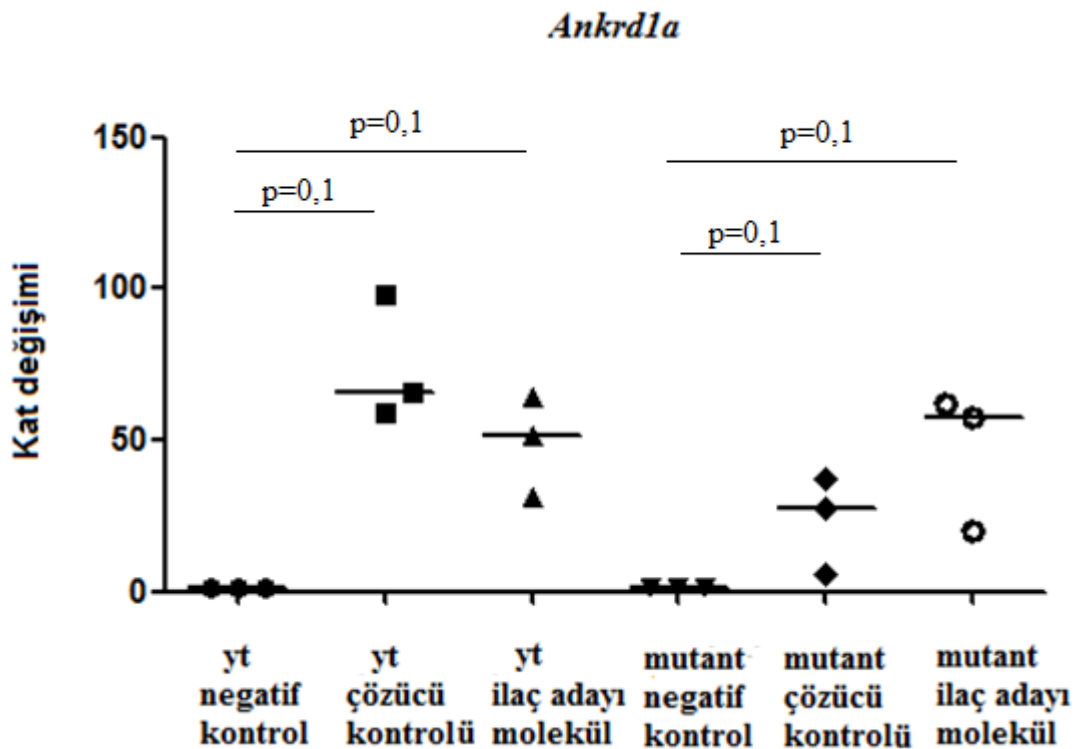
4.6. Erişkin Zebra Balıklarında İlaç Uygulaması

Erişkin balıkta mikroenjeksiyon iğnesi ile kas içi ilaç uygulamasının yapılacağı bölge saptandıktan sonra bu yöntemin strese sebep olmadığı da tespit edilmiştir. XMU-MP-1'in keşfedildiği çalışmada farelerde periton içi uygulama yapılırken ilaç adayı, %20 Kolliphor HS 15 içeren %0.1'lik sitrik asit çözeltisinde çözülmüştür (14). Belirtilen bu çözücü tez çalışmasında da kullanılmış ancak ilaç adayı molekülün çözülmesine herhangi bir katkısı olmamış olup uygulama esnasında mikroenjeksiyon iğnesinin ucunun tıkanığı gözlenmiştir.

DES mutasyonunun neden olduğu mekanotransdüksiyon hasarının patofizyolojisi henüz bilinmemektedir. Ancak, desminin lamin B ile birlikte rol aldığı yeni bir mekanosensitif yolağın olduğu, bu yolağın Hippo yolağı ile etkileşimde olabileceği, YAP'ın hedef genlerinden biri olan *ANKRD1*'in, LGMD2R'de kontrole göre hem statik hem mekanik yükleme durumlarında 11 kat arttığı daha önceki araştırmalarımız sonucunda öngörüldüğünden *desma* mutant kg155 (-/-) erişkin zebra balıklarının kaslarına ilaç adayı molekülün uygulanması

sonrası ilaç adayının *ankrd1a* ifadesi üzerindeki etkileri araştırılmıştır (13, yayınlanmamış veri).

Erişkin zebra balıklarına mikroenjeksiyon iğnesi ile ilaç adayı molekül uygulaması yapıldıktan 3.5 saat sonra deney sonlandırılmıştır. kGZ-PZR çalışması sonucu negatif kontrole kıyasla çözücü kontrolü ve ilaç adayı molekülün uygulandığı erişkin balıklarda *ankrd1a* ifadesinde artış görülmüştür ($p=0,1$). Bu artış, DMSO kaynaklıdır. Çözücü kontrolü ile ilaç adayı molekülün uygulandığı erişkin balıklarda *ankrd1a* ifadesinde farklılık görülmemiştir. (Şekil 4.6) Nadir hastalıklar ile çalışırken fazla sayıda hastayı çalışmaya dahil etmek mümkün olmadığından istatistiksel anlamlılık için ortak kabul edilen $p < 0,05$ yerine eşik değeri $p=0,1$ olarak kabul edilmiştir (91). Grafikselsel gösterimlerde GraphPad Prism 5 kullanılmıştır (Şekil 4.4.). Mann-Whitney U testi uygulanmıştır.



Şekil 4.4. Yabanıl tip ve mutant erişkinlerde *ankrd1a* ifadesi. Her nokta bir erişkin zebra balığının kGZ-PZR sonucu *ankrd1a* ifadesindeki kat değişimini temsil etmekte

olup her grupta üç erişkin zebra balığı kullanılmıştır. Mann-Whitney U testi uygulanmıştır.

4.7. Zebra Balığında Toksisite ve İlaç Uygulaması Algoritması

Zebra balığı embriyolarında toksisite ve ilaç uygulaması ile ilgili oluşturulan algoritma:

1. İlaç adayı molekülün suda çözünür olması ya da suda çözünürlüğünü arttıran farklı bir çözücüde çözünmesi ilaç molekülü olarak doğru konsantrasyonda uygulanmasını sağlar.
2. Toksisite testi için test edilecek molekül, embriyoların bulunduğu embriyo ortamına katılır.
3. Erişkin balıklar çiftleştirilir (Kaliteli ve fazla sayıda embriyo verdiği bilinen, çiftleştirmeden önceki 2 ay boyunca herhangi bir hastalık sebebiyle ilaç tedavisi görmemiş sağlıklı erişkinlerin tercih edilmesi önerilir) ve embriyolar toplanır.
4. Kuyucuklu kaplara negatif kontrol (embriyo solüsyonu), çözücü kontrolü (ilaç adayı molekülün çözücüsü), pozitif kontrol (toksik etkisi bilinen madde, toksik olduğu için farklı bir kuyucuklu kapta olması önerilir) ve en az beş farklı konsantrasyondaki ilaç adayı molekülü dağıtılır.
5. Döllenmeden sonraki 5.7-8. saat aralığında (%50 - %75 epiboli, germ halkasının görüldüğü evre ve hemen sonrası) embriyolar dağıtılarak toksisite testi başlatılır. Her kuyucuğa bir embriyo olmak üzere her bir kontrol grubun ve ilaç adayı molekülün her bir farklı konsantrasyonu için kullanılan minimum embriyo sayısı 20 olmalıdır.
6. Döllenmeden sonra, her 24 saatte bir normal olmayan morfolojik görüntülü embriyolar ve ölü-canlı embriyo sayısı kontrol edilir. Toksisite testi minimum 96 saat sürdürülür. 96 saatin sonunda kuyucuklardaki tüm embriyoların mikroskop altındaki görüntüleri çekilerek (Örnek EK-7) Şekil 2.2.b.'de sık rastlanan normal olmayan morfolojik görüntüler temel alınarak değerlendirmeler yapılır. (Takiben embriyolarda LC50 (%50'sini öldüren doz) belirlenir.
7. İlaç adayı molekülün hedef geninin/proteininin embriyoda ifade edildiği

zaman, ilacın uygulanmasının planlandığı en uygun zamandır. Her kuyucuğa bir embriyo olmak üzere her kontrol için ve ilaç adayı molekülün farklı konsantrasyonları için kullanılan embriyo sayısı minimum 20 olmalıdır.

8. İlaç adayı molekülün uygulanacağı embriyoların sağlanması için erişkin balıklar (bakınız 2. madde) çiftleştirilir ve embriyolar toplanır.
9. İlaç adayı molekül belirlenen LC50 değerinden düşük konsantrasyonda olarak embriyo ortamına katılabilir ya da mikroenjeksiyon ile doğrudan embriyoya uygulanır. Mikroenjeksiyon uygulaması, uygulanacak ilaç dozunun doğru miktarda uygulanmasını sağlar.
10. Kuyucuklu kaplara negatif kontrol, çözücü kontrolü ve ilaç adayı molekülün toksisite testiyle toksik olmadığı belirlenen konsantrasyondaki ilaç molekülü dağıtılır.
11. İlaç adayı molekülün uygulandıktan sonra maksimum etki gösterdiği süre boyunca (ilacın etki ettiği gen/protein üzerindeki değişimlerin farklı zaman aralıklarında takip edilmesiyle) embriyolar aday moleküle maruz bırakılır.
12. Çalışmanın amacına göre ilaç adayı molekülün etkilerinin değerlendirileceği bir veya birden fazla yöntem (kGZ-PZR, Western-Blot, *in situ* hibridizasyon, omik analizleri vb.) kullanılır.

Erişkin zebra balıklarında toksisite ve ilaç uygulaması ile ilgili oluşturulan algoritma:

1. İlaç adayı molekülün suda çözünür olması ya da suda çözünürlüğünü arttıran farklı bir çözücüde çözünmesi ilaç molekülü olarak doğru konsantrasyonda uygulanmasını sağlar.
2. İlaç adayı molekülün erişkin balığın su ortamına mı katılacağı yoksa enjeksiyon ile mi uygulanacağına karar verilir. Su ortamına katılacaksa hesaplanan ilaç dozunun balık tarafından tamamının alınmama olasılığı gözönüne alınmalıdır.
3. İlaç adayı molekülün erişkin balığa enjeksiyon ile uygulanması durumunda toksisite testinin de enjeksiyon yöntemi ile uygulanması önerilmektedir.

4. Toksisite testi için negatif kontrol, çözücü kontrolü ve ilaç adayı molekülün farklı konsantrasyon grupları hazırlanır. İlaç adayı molekülün etki edeceği yolağı etkileyebilecek dış etkenler de göz önüne alınarak ilave kontrol grupları eklenmelidir. (Örneğin bu çalışmada Hippo yolağı mekanik uyarılara karşı hassas bir yolak olduğu için mikroenjeksiyon iğnesi ile enjeksiyon yapılmasının ilaç uygulamasından bağımsız olarak kasta oluşturabileceği stres kontrol edilmiştir.)
5. Hazırlanan ilaç adayı molekülün farklı konsantrasyonları ve kontrol çözeltileri erişkin balıklara enjeksiyon yapılarak uygulanır. Toksisite testinin yapılacağı erişkinlerin birbirlerine yakın yaşlarda ve boyutlarda olmaları önerilmektedir.
6. Erişkin balıklar her 24 saatte bir kontrol edilerek normal olmayan morfolojideki balıklar ve ölü-canlı balık sayısı tespit edilir. Toksisite testi minimum 96 saat sürdürülür. Takiben erişkinlerde LC50 (%50'sini öldüren doz) belirlenir.
7. İlaç adayı molekül belirlenen LC50 değerinden düşük konsantrasyonda olarak uygulanır.
8. İlaç uygulamasının yapılacağı erişkinlerin birbirlerine yakın yaşlarda ve boyutlarda olmaları tercih edilmelidir.
9. İlaç adayının enjeksiyon ile uygulanması durumunda, hedef dokuya bağlı olarak enjeksiyon yöntemi belirlenir (kas içi, periton içi, retro-orbital vb.).
10. Kas içine enjeksiyon mikroenjeksiyon iğnesi veya hayvan deneylerinde kullanılan diğer enjeksiyon iğneleri ile yapılabilir. Erişkin zebra balığına mikroenjeksiyon iğnesi kullanılarak enjeksiyon yapılması hem maliyet hem de balığın sağlıklı yaşamının idamesi açısından önerilmektedir.
11. Erişkin balıklar, ilaç adayının maksimum etki gösterdiği süre boyunca (ilacın etki ettiği gen/protein üzerindeki değişimlerin farklı zaman aralıklarında takip edilmesiyle) ilaç uygulamasına maruz bırakılır.
12. İlaça maruz bırakılan sürenin tamamlanması sonrasında balıklara anestezi etkisi altına girmelerini takiben dekapitasyon ile ötenazi uygulanılır ve deney sonlandırılır.
13. Çalışmanın amacına göre ilaç adayı molekülün etkilerinin

değerlendirileceği bir veya birden fazla yöntem (kGZ-PZR, Western-Blot, *in situ* hibridizasyon, omik analizleri vb.) kullanılır.



5. TARTIŞMA

İlaç araştırmalarının amacı, hastalıkları tedavi etmek için etkin ve güvenli tedavi edici molekülleri keşfetmektir. *İn vitro* analizlere kıyasla *in vivo* hayvan modellerinde yapılan ilaç araştırmaları birçok avantajı nedeni ile tercih edilmektedir. Zebra balığı prelinik ilaç araştırmalarında düşük maliyette ancak yeterince güçlü olmayan veri sunan *in vitro* analizler ile yüksek maliyette olmakla birlikte güçlü veri sunan memeli modelleri arasında köprü oluşturan bir modeldir. Zebra balığının pestisitler ve ağır metaller gibi çevre kirleticilere, hormonlar, kanser ilaçları ve antibiyotikler gibi tıbbi ilaçlara maruz kaldıklarında memelilere çok benzer fizyolojik yanıtlar oluşturdıkları gösterilmiştir. Zebra balığında yapılan toksisite deneylerindeki fizyolojik etkiler, yüksek omurgalıları da temsil eden sonuçları içermektedir. Bu nedenle, ilaç araştırmalarında zebra balığının kullanımı, *in vitro* sisteme göre insan biyolojisine daha yakın bir durum sunmaktadır (92).

Bu tez çalışması sonunda zebra balığı embriyolarında ve erişkinlerde etkin ve organizmaya toksik olmayacak ilaç konsantrasyonunu belirlemek için gerçekleştirilen toksisite deneyleri ile ilgili deney düzenekleri, embriyolarda ilaç uygulamasının standart koşulları ve gerekli düzenekler; yetişkin zebra balıklarında kas içine enjeksiyon yöntemi ile ilaç uygulanmasının optimizasyonu sağlanmıştır. Bu sürecin her aşamasında karşılaşılan zorluklar olmakla beraber bulunan alternatif yöntemler ile izlenecek algoritma oluşturulmuş ve teknik altyapının optimizasyonunu sağlanmıştır. Tüm aşamalarda OECD kılavuzunun tavsiye kararlarına, 4R ve hayvan etiği kurallarına uygun davranılmıştır (87, 88, 93).

Tez çalışmasında embriyolarda ilaç adayı küçük molekül, embriyoların içinde bulunduğu solüsyona eklenmiştir. Genellikle zebra balığı embriyolarında ilaç araştırmalarında en sık kullanılan uygulama bu şekildedir. Erişkinlerde ise yine en sık kullanılan balığın sulu ortamına ilacın verilmesidir. Her iki durumda da ilaç bileşikleri doğrudan balığın su ortamına verildiğinden organizma tarafından absorblanan bileşik miktarı bilinmemektedir (94). Bu durumda bileşiklerin ADME profillerinin saptanması mümkün olmaz. Bu nedenle ilaç adayı molekülün etkinliğinin kasta oluşması beklendiğinden doğrudan mikroenjeksiyon iğnesi ile erişkin balığın kas içine enjeksiyon yapılmıştır.

Tez çalışmasında karşılaşılan en büyük zorluklardan biri, kullanılan molekülün yüksek hidrofobisite göstermesi olmuştur. Bu durum ilaç adayı molekülün çözünürlüğünü etkilediğinden uygulanması gereken ilaç dozunun uygulanamamış olmasına neden olmaktadır. İlaç adayı molekül su ortamından yeterince alınamazsa, gerçekte uygulanmış olan doz daha az olacaktır. Bu durum, ilaç adayı molekülün etkin olup olmadığının anlaşılması sürecini de etkileyecektir. İlacın uygulanmadığı embriyolar (bu çalışmada negatif kontrol ve çözücü kontrolü) ile uygulandığı embriyolar üzerinde ilacın etki mekanizmasına bağlı olarak yapılan moleküler değerlendirilmeler ile fark elde edilmesi sonucunda ilacın etkinliği konusunda bilgi alınabilecektir. Diğer durumda ise ilacın etkin olmadığını ifade etmek doğru olmayacaktır. Tedavi amaçlı yapılacak prelinik uygulamalarda, embriyolarda da mikroyenjeksiyon iğnesi ile ilacın uygulanması doğru ilaç dozunun verilmesini sağladığından tercih edilmesi daha uygun olabilecektir. Kimyasal çözünürlük, stabilite ve uygulanacak ilaç dozu önemliyse veya protein gibi büyük moleküllu ilaçlar kullanılıyorsa, embriyoya uygun kantitatif mikroyenjeksiyon kullanılabilir. Bu yüzden çözünmeyen bileşikler, makromoleküller veya proteinler embriyoda doğrudan besin kesesine, sinüs damarına veya kan dolaşımına enjeksiyonla da verilebilir (94). Ancak, en sık uygulanması nedeniyle tez çalışmasında embriyolara ilaç uygulaması embriyoların bulundukları su ortamına verilerek gerçekleştirilmiştir.

İlaç adayı olmuş bir molekül toksisite testlerini geçmiştir. Ancak zebra balığına ilaç adayı molekülünün uygulanmasından önce ilaç adayının uygulanacak konsantrasyonu bilinmiyorsa toksisite deneyleri ile toksik olmayan uygulama konsantrasyonu belirlenmelidir. Bu çalışmada kullanılan ilaç adayı molekülün daha önce zebra balığında denenmemiş olması ve bu tezin temel amacının bir algoritma oluşturmak olması sebebiyle toksisite testleri yapılmıştır. OECD kılavuzuna göre toksisite deneyleri minimum 192 embriyo ile gerçekleştirilmelidir ve ilaç adayı molekülün en az 5 farklı konsantrasyonunun denenmesi tavsiye edilmektedir. Bu tez çalışmasında toksisite testi için toplam 312 embriyo kullanılmıştır ve 10 farklı ilaç konsantrasyonu denenmiştir. Denenen 10 farklı konsantrasyonda da toksik bir etki görülmemiştir. Erişkinlerde ise toplam 20 balık kullanılmıştır ve üç farklı ilaç konsantrasyonu denenmiştir. Denenen üç farklı konsantrasyonda da toksik bir etki

görülmemiştir. Toksikite testlerinin yapılmasının nedeni LC50'nin (%50'sini öldüren doz) belirlenmesi içindir. LC50 dozu çalışılan organizma popülasyonunun yarısını öldüren dozdur. Belirlenen LC50'den düşük olan ilaç dozu, balıklara uygulanacak dozdur. Bu çalışmada olduğu gibi bazı durumlarda LC50 belirlenemeyebilir. Bu aslında beklenen bir durumdur. İlaç adayı olarak sunulan bir molekülün ilaç araştırmalarının çok erken bir döneminde toksik olup olmadığı gösterilmelidir. Nitekim bu tez çalışmasında kullanılan ilaç adayı molekül farelerde tedavi amacıyla uygulanmıştır (14). Tez çalışmasında embriyolarda su ortamına uygulanan en yüksek konsantrasyon 100 mg/L'dir. Erişkinlerde ise vücut ağırlığına göre su ortamındaki konsantrasyona eşdeğer olan 0.05 mg/kg uygulanmış ve bu konsantrasyonda dahi toksik etki görülmemiştir. Ancak OECD kılavuzunda toksisite testi için uygulanacak konsantrasyonlarda 100 mg/L üst sınır olabilecek konsantrasyon olarak belirtilmiştir. Bunun sebebi ise bir molekülün yüksek oranda toksik olup olmadığının 10-100 mg/L konsantrasyon aralığında bulunabileceğinden dolayıdır. LC50, 100 mg/L'nin ne kadar üzerinde ise molekülün toksik özelliğinin o kadar az olduğunu gösterir (94). Sonuç olarak toksisite deneyinde ilaç adayı molekülün 100mg/L konsantrasyonunda uygulanmasına rağmen LC50 saptanamamıştır. Bu nedenle embriyolara 100 mg/L, erişkinlere ise 0.05 mg/kg uygulanacak ilaç dozu olarak belirlenmiştir. Bu uygulanan ilaç dozu, Fan ve ark.(14) çalışmasında farelere uygulanan ilaç dozunun (1-3mg/kg) balığın vücut ağırlığına oranlanarak hesaplanan değeri olan 0.02-0.06 mg/kg'a karşılık gelmekte olup bu değer erişkin balıklarda uygulanan 0.05 mg/kg değeri ile aynıdır. Aslında 100 mg/L uygulandığında dahi LC50'nin hesaplanamamış olması, daha yüksek konsantrasyonlarda uygulansa bile ilacın toksik olmayacağını ve LC50'nin 100 mg/L'den büyük olduğunu göstermektedir. İlaveten, organizmalar arası aynı ilaç adayı molekülün bir türdeki toksik değerinin bir başka türde on kata kadar daha yüksek olabileceği verisi de göz önüne alındığında balıklara uygulanan konsantrasyonun (embriyolara 100 mg/L, erişkinlere ise 0.05 mg/kg) üzerine çıkılabildi (94). Ancak OECD kılavuzuna göre 100 mg/L'nin bir sınır konsantrasyon olarak belirtilmiş olması sebebiyle daha yüksek konsantrasyonlar denenmemiştir.

İlaç adayı moleküller erişkin balıkların su ortamına verilebilir ya da enjeksiyon ile uygulanabilir. Erişkin zebra balıklarına kas içi enjeksiyon için kullanılan literatürde tavsiye edilen iğnelerden biri olan 30G (0,3 mm x13 mm) iğne denenmiştir. Ancak, balıkların akvaryum tanklarının dibinde uzun süre hareketsiz kalmaları ve yalpalayarak yüzme davranışı göstermeleri nedeniyle 30G iğneden vazgeçilerek mikroenjeksiyon iğnesi ile enjeksiyon denenmiştir. Bu iğnenin kullanımındaki iki zorluktan biri, balığın pulları nedeniyle dokuya girişte zorlanması olmuştur. Erişkin balığın sırt bölgesinde milimetrik hareketler ile sağa-sola gidilerek iğne batırılmaya devam edilmiştir. Bu şekilde devam eden birkaç deneme sonrası pulların daha az yoğunlukta olduğu bölge belirlenmiştir. Mikroenjeksiyon iğnesinin oldukça kolay kırıldığı bu nedenle enjeksiyon işleminde dikkatli olunması ancak bu sırada erişkin balığında anestezide olduğu ve su ortamında olmadığı da unutulmadan hızlı hareket edilmesi gerektiği anlaşılmıştır. İkinci zorluk ise mikroenjeksiyon iğnesinin çapının çok küçük olmasından dolayı yaşanmıştır. İlacın suda çözünmemesi nedeniyle oluşan ilaç tortuları mikroenjeksiyon iğnesinin tıkanmasına ve ilaç verilememesine neden olmuştur. Literatürde ilaç adayı molekül olarak kullanılan XMU-MP-1'in keşfedildiği çalışmada farelerde periton içi uygulama yapılırken ilaç adayı, %20 Kolliphor HS 15 içeren %0.1'lik sitrik asit çözeltisinde çözülmüştür (14). Belirtilen bu çözücü tez çalışmasında da kullanılmış ancak ilaç adayı molekülün çözülmesine herhangi bir katkısı olmamıştır. Bu nedenle ilaç adayı molekül ana stok solüsyondan (yaklaşık %99.9 saflıkta DMSO içerisinde) alınarak doğrudan enjeksiyon yapılmıştır. Bu şartlarda yapılan zebra balığı erişkin toksisite testiyle 96 saat boyunca balıkların yaşamlarını sürdürdükleri gözlenmiştir. 96 saat sonunda bu balıklar öldürüldüğünden DMSO'nun ilerleyen zamanlarda balığa herhangi bir toksik etkisi olup olmadığı gözlenememiştir. Buna ilave olarak (%20 Kolliphor HS 15 içeren %0.1'lik sitrik asit çözeltisi embriyolara farklı konsantrasyonlarda verilerek toksik etkisine bakılmıştır. Kolliphor HS 15 yabancı tip embriyolarda toksik etki göstermiştir. Toksik etki ancak %0.1'lik sitrik asit çözeltisine %0.002 Kolliphor HS 15 konularak hazırlanan sulu çözeltide görülmemiştir (EK-8'de detaylı olarak sunulmuştur). Ancak ilaç adayı molekül yine tamamen çözülmediğinden bu çözelti ile çalışılmamıştır.

Bu tez çalışmasında çözücü kontrol olarak kullanılan DMSO amfipatik özellikli kompleks bir çözücü olup fizyolojik sistemlerde birçok etkisi mevcuttur. Farklı DMSO konsantrasyonlarının (%0.5, %1 ve %2) farenin embriyonik gelişiminde etkilerinin incelendiği bir çalışmada, %0.5 DMSO blastosit evresine kadar önemli bir etki göstermemiştir. %1 DMSO embriyonik gelişimde morula aşamasında %31, erken blastosit evresinde %59 oranında gelişimi engellemiştir. %2 DMSO ise, 2-hücreli embriyonik aşamadan itibaren gelişimi önemli derecede engellemiştir. Buna bağlı olarak, morula evresi ve blastositler oluşmamıştır. DMSO'nun zigotlarda oksidatif stres üzerindeki etkisini aynı dozlarda araştırmak için zigotlar 30 dk DMSO'ya maruz bırakılmıştır. Hücre içinde doza bağlı ROS artışı 2 saate kadar sürmüştür. Özellikle, %2 DMSO uygulanan grupta birkaç embriyoda anormal şekilde kümelenmiş ROS birikimleri görülmüştür. Aynı zamanda pro-oksidant genlerin (*Nox1*, *Nox2*, *Nox3*, *Nox4*, *Duox1*, *Duox2*, *Ncf1*, *Ncf4*) mRNA seviyeleri artmıştır. Bazı anti-oksidant genlerin (*Gsr*, *Gpx3*, *Sod2*) mRNA seviyeleri artış göstermiştir (96). Tez çalışmasında embriyo toksisite deneylerinde %1'lik DMSO kullanılmış ve toksik etki görülmemiştir. DMSO'nun hücresel süreçlerdeki değişiklikleri indüklemeye yeteneği olup mümkünse kullanımından kaçınmak gerektiği ile ilgili veriler literatürde mevcuttur (96). Özellikle aday ilaç moleküllerinin doğrudan balığa enjeksiyon yapılması gereken durumlarda suda çözünebilir formülasyonlarda olması tercih edilmelidir. Nitekim tez çalışmasında erişkinlerde mikroenjeksiyon iğnesi kullanılarak yapılan uygulamada ilaç adayı molekülün %99.9 DMSO içerisinde çözünmüş olması, erişkin zebra balıklarında *ankrd1a* ifadesinde DMSO kaynaklı artışa sebep olmuştur (Bulgular Şekil 4.6.)

Tez çalışmasında ilaç adayı molekül hem yabanıl tip hem de mutant zebra balıklarına uygulanmıştır. Uygulama iki nedenden dolayı bu şekilde yapılmıştır: 1) *desma* mutant kg 155 (-/-) balıkların sayıca az olması. Mikroenjeksiyon iğnesi ile kas içi ilaç uygulama tecrübesinin kazanılması için yabanıl tip zebra balıkları kullanılmıştır. 2) İlaç adayı molekülün beklenen hedefi dışında başka bir hedefinin olup olmadığının mutlaka gözönüne alınması gerektiğinin varsayımsal olarak gösterilmesi. Bunun gerekliliği aşağıdaki şekilde açıklanabilir. Örneğin ilaç adayı molekülün hedefi protein A'nın inhibisyonu olsun. Protein A için mutant olan bir zebra balığının gösterdiği fenotip ile yabanıl tip zebra balığına ilaç adayı molekül

uygulandığında görülen fenotip aynı olmalıdır. Çünkü ilaç adayı molekül yabancı balıkta protein A'yı inhibe edecektir. Yabancı tip zebra balığına ilaç adayı molekül uygulandığında mutant organizmada gözlenen fenotipten farklı olarak gözlenen etki, ilaç adayı molekülün ilave hedefi olabileceğini göstermektedir. Klonlanmış zebra balığı mutantlarının veya morfolino *knockdown* hayvanların fenotip özelliklerinin detaylı olarak katologlanması ikincil ilaç etkilerinin tanımlanmasına yardım edebilir (www.zebrafish.org ve www.zfin.org). Bu durumda, *in vitro* ilaç taramalarının zayıf hedef özgüllüğünün ve düşük biyoyararlanımının ve toksisitesinin bulunması yanında zebra balığı embriyolarının, ilaç adayı molekülün hedef dışı etkilerinin saptanmasında kullanılabilecek olması ve zebra balığının birçok hedefi olan bir bileşikten tek bir hedefi olan türevlerin geliştirilmesine de katkı sağlaması ilaç araştırmalarında zebra balığının tercih edilmesinin nedenlerindendir (37).

Embriyolarda yapılan toksisite deneylerinde negatif kontrol için 21 embriyo, kuyucuklu kapların kendi içinde olası kontaminasyonunu kontrol etmek için 39 embriyo, çözücü kontrolü için 21 embriyo, pozitif kontrol için 21 embriyo ve ilaç aday molekülünün farklı konsantrasyonları için 210 embriyo olmak üzere 312 embriyo kullanılmıştır. İlaç molekülünün uygulanmasında ise yabancı tip ve *desma* mutant kg155 (-/-) embriyolarda negatif kontrol için 60 embriyo, çözücü kontrol için 60 embriyo ve ilaç adayı molekül için 60 embriyo olmak üzere 360 embriyo (180 yabancı tip + 180 *desma* mutant) kullanılmıştır. RNA izolasyonu için minimum 20 embriyo gerekli olduğundan, 20 embriyo birleştirilerek bir havuz oluşturulmuş ve bir biyolojik tekrar olarak sayılmıştır. İstatiksel analizler sonucunda negatif kontrol, çözücü kontrolü ve ilaç adayı molekülün uygulandığı embriyo grupları arasında *ankrd1a* ifadesinde farklılık görülmemiştir ($p < 0.05$).

Yabancı tip erişkinlerde negatif kontrol için üç, çözücü kontrolü için üç ve ilaç adayı molekülün uygulanması için üç olmak üzere toplam dokuz erişkinin kas içine enjeksiyonu yapılmıştır. Ayrıca, kas içi enjeksiyon el becerisinin kazanılması için toplam altı yabancı tip erişkin balık kullanılmış olup bu balıkların verileri bulgulara dahil edilmemiştir. *Desma* mutant kg155 (-/-) erişkinlerde negatif kontrol için üç, çözücü kontrolü için üç ve ilaç adayı molekülün uygulanması için üç olmak üzere toplam dokuz erişkinin kas içine enjeksiyon yapılmıştır. Bu çalışmada, hem

yabanıl tip hem de *desma* mutant kg155 (-/-) erişkin balıklarda negatif kontrole kıyasla çözücü kontrolün ve ilaç adayı molekülün uygulandığı erişkin balıklarda *ankrd1a* ifadesinde artış görülmüştür ($p=0,1$). Çözücü kontrolü ile ilaç adayı molekülün uygulandığı erişkin balıklarda *ankrd1a* ifadesinde farklılık görülmemiştir. Bu yüzden görülen artışın sebebi DMSO kaynaklıdır. *ankrd1a* ifade artışının $p=0,1$ değerinde değerlendirilmesinin sebebi tez çalışmasında, mevcut *desma* mutant kg155 (-/-) balık sayısının çok az olması nedeniyle kontrollerde dahil olmak üzere toplam 9 mutant balık kullanılmasından dolayıdır (Bulgular Şekil 4.6.). 2007’de yayınlanan CHMP (Commitee For Medicinal Products for Human Use)’un ‘‘Küçük Popülasyonlarda Klinik Denemeler Rehberi’’nde kısıtlı hasta sayısı ile yapılan çalışmalarda sayıca fazla hastayı çalışmaya dahil etmenin mümkün olmadığı tartışılmıştır. Yeteri kadar büyük bir popülasyon ile çalışıldığında güven aralığı daralır ve istatistiksel olarak anlamlılık seviyesi de artar. Ancak nadir hastalıklarda istatistiksel anlamlılık için ortak kabul edilen $p < 0,05$ eşik değerinin uygulanmasının uygun olmadığı ve nadir hastalıklarla ilgili yapılan çalışmalarda neredeyse bütün vakalarda gözle görülen anlamlılığın p değerinden daha bilgilendirici olduğu sonucuna varılmış ve istatistiksel anlamlılık eşik değeri olarak $p=0,1$ belirlenmiştir (91).

Tez çalışmasında kullanılan ilaç adayı molekülü MST1/2 kinaz inhibitörüdür. MST1/2 kinaz inhibisyonu ile Hippo yolağı baskılanır, fosforillenmemiş YAP çekirdeğe geçer. YAP çekirdekte yerleştiğinde YAP ile ilişkili mekanosensitif genler aktifleşir. Mekanosensitif genlerden biri olan *ankrd1a*’nın iskelet kası ile ilişkisi ve YAP ile doğrudan ilişkili olduğu literatürde gösterilmiştir (83). YAP, mekanotransdüksiyonun düzenlenmesinde temel rol oynamaktadır. Dolayısıyla YAP aktifleştiğinde *desma* mutant kg155 (-/-) balıklarda mekanotransdüksiyon hasarının azalması öngörülmektedir. Bu yüzden YAP yerleşimini tespit edebilmek ilacın etkinliğinin değerlendirilmesinde çok önemli diğer bir veri sağlayacaktır. Bu nedenle YAP ve p-YAP antikoru ile immünfloresan boyama yapılmış ve Western Blot deneyleri gerçekleştirilmiştir. Ancak ticari olarak bulunan hiçbir antikor zebra balığı kas dokusunda çalışmamıştır. İmmünfloresan boyamalar ve Western Blot çalışmaları yapılamadığı için ilaç adayı molekülün uygulanmasından önce ve sonrasındaki YAP ve p-YAP lokalizasyonları ve miktarları bilinmemektedir. Dolayısıyla *ankrd1a*

ifadesinde herhangi bir artış veya azalış görülmemesi, ilaç adayı molekülün MST1/2 kinazın inhibisyonuna sebep olmaması ve buna bağlı olarak da YAP'ın aktivasyonunun gerçekleşmemesi sebebiyle olabilir.

Bu tezin amacı zebra balığı embriyolarına ve erişkinlerine ilaç uygulaması yapılabilmesi için gereken algoritmanın oluşturulması ve teknik altyapının standardizasyonunun sağlanmasıdır. Bu süreçte ilaç uygulamasının yapılacağı herhangi bir yabancı veya mutant balık suşu kullanmak yerine TÜBİTAK 214S174 no'lu proje kapsamında oluşturulmuş olan *desma* mutant kg155 (-/-) zebra balıkları kullanılmıştır. Bu balıklardaki olası mutant fenotipin mekanotransdüksiyon hasarı olduğu öngörüsüyle ilaç adayı küçük molekül olarak mutant balıktaki patogenezin geri döndürülmesi ile ilişkili olabileceği öngörülen Hippo yolağını baskılayan MST1/2 kinaz inhibitörü olan XMU-MP-1 kullanılmıştır. Bu molekülün mutant balık üzerindeki etkisinin biyolojik sonucunu gözlemek için mekanosensitif bir gen olan ve ilaç adayının mekanotransdüksiyon hasarını düzeltmesi durumunda ifadesinin artacağı öngörüsüyle *ankrd1a* geni seçilmiştir. Mutant zebra balığı modeli, ilaç adayı molekül ve bu molekülün etkisinin biyolojik sonucu olarak ifadesinin artacağı öngörülen gen, kuramsal temelli en olası hipotez üzerinden tez çalışmasının yürütülmesi için seçilmişlerdir. Bu nedenle tez çalışması sonunda hastalık, ilaç adayı molekül ve bu molekülün organizma üzerindeki etkilerinin biyolojik sonuçları arasındaki ilişki kapsamlı olarak araştırılmamıştır. Ancak bu konuda yapılmak istenen araştırma konuları detaylı olarak öneriler kısmında sunulmuştur.

Zebra balığı, gerek test edilen ilaç adayı molekülün düşük miktarlarda kullanılmasına, deney süresinin kısalmasına ve gerekse geleneksel hayvan modellerindeki ilaç araştırmalarına göre daha basit bir ilaç araştırma ve geliştirme süreci sunmaktadır (22). Ayrıca, hastalık modellerinde, geniş biyoaktif madde kütüphanelerinin hızlıca taranarak ilaç keşfini sağlaması ve yüksek özgüllük ve çok düşük hedef dışı etkisi olan ilaç adaylarının tanımlanmasına da katkıda bulunmaktadır.

Nadir hastalıkların patogenezinin araştırılması için CRISPR-Cas9 genom düzenleme aracı ile laboratuvarımızda zebra balığı hastalık modelleri

oluşturulmaktadır. Bu modellerde ilaç adayı olabilecek küçük moleküllerin taranabilmesi amacıyla gereken algoritmanın oluşturulması ve ilaç teknik altyapısının kurulması için gerçekleştirilen bu tez çalışması, gerek embriyolarda gerekse erişkin zebra balıklarında, toksisite ve ilaç uygulaması için çok detaylı olarak sunduğu ilaç algoritması ve tamamlanmış teknik altyapısı ile küçük ölçekli ilaç araştırmaları yapılabilmesini mümkün kılmasının yanında düşük maliyetli ve yüksek ölçekli ilaç taramalarına geçilebilmesi için de sağlam bir zemin oluşturmuştur.



6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasının amacı embriyo ve erişkin zebra balıklarına ilaç adayı molekülün uygulanması için gereken algoritmanın oluşturulması ve ilişkili teknik altyapının optimizasyonudur. TÜBİTAK 214S274 no'lu proje kapsamında oluşturulan *desma* mutant kg155 (-/-) zebra balıkları ilaç uygulaması için kullanılmıştır. *Desma* mutant kg155 (-/-) zebra balıklarında mutant fenotip olarak olduğu öngörülen mekanotransdüksiyon hasarını YAP proteininin çekirdeğe geçmesiyle mekanosensitif genlerin ifadesini artırarak düzenleyebileceği yaklaşımıyla bir ilaç adayı küçük molekülü olan XMU-MP-1 seçilmiştir. Bu ilaç MST1/2 kinaz inhibitörü olup Hippo yolağını baskılamaktadır. XMU-MP-1 uygulanması sonrasında ifade artışının beklendiği mekanosensitif gen olarak *ankrd1a* seçilmiştir.

6.1. Sonuçlar

1. Yabani tip embriyolarda yapılan toksisite deneyi ile en yüksek 100 mg/L, en düşük 2.59 mg/L konsantrasyon olmak üzere 10 farklı ilaç konsantrasyonu denenmiş olup ilacın embriyolar üzerinde herhangi bir toksik etkisi görülmemiştir. İlave olarak çözücünün toksik etkisinin kontrol edildiği embriyo örneklerinde de %1 DMSO'dan kaynaklı herhangi bir toksik etki gözlenmemiştir.
2. Erişkin zebra balığı toksisite deneylerinde kullanılan 0.05 mg/kg, 0.025 mg/kg ve 0,0125 mg/kg ilaç konsantrasyonlarında balıklarda herhangi bir toksik etki görülmemiştir. Ancak, ilacın mikroyenjeksiyon iğnesi ile uygulanabilmesi için %99.9 saflıkta DMSO kullanılmıştır. 4 gün boyunca balıklar izlenmiş ve sağlıklı oldukları gözlenmiştir. 4. günün sonunda balıklara ötanazi uygulandığı için süreç daha uzun süreli takip edilememiştir.
3. Embriyolarda XMU-MP-1'in toksik olmayan en yüksek değeri olan 100 mg/L, erişkinlerde ise 0.05 mg/kg, ilaç uygulama dozu olarak seçilmiştir.
4. Erişkin zebra balığına mikroyenjeksiyon iğnesi kullanılarak enjeksiyon yapılmasının hem maliyet hem de balığın sağlıklı yaşam idamesi açısından elverişli bir yöntem olduğu gösterilmiştir. Erişkin balıklarda,

mikroenjeksiyon iğnesi ile ilaç adayı molekülün kas içine enjeksiyonunun yapılabilmesi ile ilişkili düzenek oluşturulmuştur. Mikroenjeksiyon iğnesi ile kas içine enjeksiyon yapıldığından, enjeksiyonun tek başına balık üzerinde stres oluşturmadığı gösterilmiştir.

5. İlaç uygulaması sonrasında, yabanıl tip ve *desma* mutant kg155 (-/-) embriyolarda *ankrd1a* ifadesinde herhangi bir farklılık gözlenmezken, hem yabanıl tip hem de *desma* mutant kg155 (-/-) erişkin balıklarda %99.9 saflıkta DMSO kullanılmasına bağlı olarak *ankrd1a* ifadesinde artış görülmüştür ($p=0,1$).
6. Embriyolarda ve erişkin zebra balıklarında ilaç uygulaması ile ilgili algoritma (Şekil 4.7.a-b) oluşturulmuştur
7. Toksisite ve ilaç uygulaması ile ilişkili teknik altyapının optimizasyonu sağlanmıştır.

6.2. Öneriler

Tez çalışması kapsamında zebra balıklarında ilaç uygulama algoritması oluşturulmuş ve gereken teknik altyapı kurulmuştur. Öneriler, bu nedenle ilaç adayı olan XMU-MP-1 küçük molekülünün etkinliğinin araştırılması üzerine yoğunlaşmıştır.

1. İlaç adayı molekülün suda çözünürlüğünün az olması sebebiyle embriyo deneylerinde uygulanmak istenen dozdan daha az miktarda ilaç adayı molekülün embriyo tarafından alınmış olma olasılığı yüksektir. Ayrıca erişkin balığa ilaç uygulamalarında ilacın suda çözünmemesi nedeniyle oluşan ilaç tortuları ilacın mikroenjeksiyon iğnesinden geçmesini engellemiştir. Erişkinlerde %99.9 saflıkta DMSO kullanıldığında ise izlenen süreçte bir toksisite görülmemiş olmasına rağmen *ankrd1a* ifadesini DMSO'nun arttırdığı gözlenmiştir. Bundan dolayı, ilaç adayı molekülün suda çözünürlüğünü arttıran, toksik olmayan ve mikroenjeksiyon iğnesinden geçebilecek bir çözücü solüsyonun varlığında *desma* mutant kg155 (-/-) zebra balığı embriyolarına ve erişkin balıkların kası içine ilaç adayı molekülün uygulanması,
2. Aday küçük molekülün keşfedildiği çalışmada (14) ilacın etkisinin 1.5 ile

6 saat arasında sürdüğü bildirilmiştir. Bu küçük molekül daha önce zebra balığında hiç denenmediği için matematiksel olarak ortalama değer olan 3.5 saatte karar kılınarak embriyo solüsyonu içinde embriyolar 3.5 saat boyunca ilaca maruz bırakılmıştır. Daha yüksek zaman dilimlerinde ilaç adayına maruz bırakılarak *ankrd1a* ifadesine tekrar bakılması ve eğer bir farklılık gözlenirse erişkin balıklar için de ilaç adayını moleküle maruz bırakılma süresinin farklı aralıklarla denenmesi. İlaç adayını molekülün uygulama dozu embriyolarda 100 mg/L, erişkinlerde ise 0.05 mg/kg'dır. OECD kılavuzuna istinaden bu konsantrasyonlar arttırılmamıştır ancak denen en yüksek konsantrasyonda toksik etkinin görülmemiş olması sebebiyle bu konsantrasyonlar arttırılarak LC50 değerinin hesaplanması ve embriyo ve erişkinlerde ilaç adayını molekülün mikroenjeksiyon iğnesi kullanılarak uygulandığı deneylerin tekrarlanması,

3. İlaç adayını molekülün Hippo yolağı'nda MST1/2 kinazın seçici bir inhibitörü olması sebebiyle ilacın uygulanması sonrasında Hippo yolağının inhibisyonunu takiben YAP'ın çekirdeğe taşınmasının zebra balığı kas dokusunda yapılan immünfloresan boyamalar ve Western Blot analizleri ile gösterilmesi planlanmış ve bu tez kapsamında denenmiştir. Ancak, antikolar zebra balığı dokusunda çalışmamıştır. Zebra balığında yeni antikoların keşfedilmesiyle bu çalışmaların denenmesi,

Ayrıca; karaciğer rejenerasyonunda etkinliği gösterilmiş olan XMU-MP-1 molekülünün, kas rejenerasyonundaki rolünün YAP proteini üzerinden aydınlatılması amacıyla *in vitro* çalışmalarımız devam etmektedir. Bu çalışmalar kapsamında ticari olarak edinilen ölümsüzleştirilmiş miyoblast hücreleri kullanılmaktadır. Elde ettiğimiz ön verilerimiz, XMU-MP-1 molekülünün miyoblast hücrelerinin rejenerasyonu üzerinde etkili olabileceği yönündedir (yayınlanmamış veri). Bu amaçla çalışmalarımız devam etmektedir.

7. KAYNAKLAR

1. Miyawaki I. Application of zebrafish to safety evaluation in drug discovery. *J Toxicol Pathol.* 2020. 33(4): p. 197-210.
2. Chakraborty C. et al. Zebrafish: a complete animal model for in vivo drug discovery and development. *Curr Drug Metab.* 2009. 10(2): p. 116-24.
3. Das B.C. et al. Use of zebrafish in chemical biology and drug discovery. *Future Med Chem* 2013. 5(17): p. 2103-16.
4. Bhusnure C. G. M.J.M. Gholve S. B. Thonte S. S. Giram P. S. Sangshetti J. N. et al. Drug Target Screening and its Validation by Zebrafish as a Novel Tool. *Pharm Anal Acta* 2015. 6(10): p. 426.
5. Tan J.L. and L.I. Zon Chemical screening in zebrafish for novel biological and therapeutic discovery. *Methods Cell Biol* 2011. 105: p. 493-516.
6. Goldberg AL. Protein synthesis during work-induced growth of skeletal muscle. *The Journal of cell biology.* 1968;36(3):653.
7. Hornberger TA. Mechanotransduction and the regulation of mTORC1 signaling in skeletal muscle. *The international journal of biochemistry & cell biology.* 2011;43(9):1267-76.
8. Burkholder TJ. Mechanotransduction in skeletal muscle. *Frontiers in bioscience: a journal and virtual library.* 2007;12:174.
9. Riazifar M. et al. Stem Cell Extracellular Vesicles: Extended Messages of Regeneration. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2017. 57: p. 125-154.
10. Fischer M Rikeit P Knaus P Coirault C. YAP-mediated mechanotransduction in skeletal muscle. *Frontiers in physiology.* 2016;7:41.
11. Cetin N. et al. A novel desmin mutation leading to autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophy: distinct histopathological outcomes compared with desminopathies. *J Med Genet* 2013. 50(7): p. 437-43.
12. Dinçer R.P. Desmin Mutasyonunun Protein İşlevi Üzerindeki Etkisinin Zebra Balığı Modelinde Araştırılması TUBİTAK 1001 Proje No: 214S174 2018.
13. Ünsal Ş. Limb-Girdle Kas Distrofisi 2R (LGMD2R)'de Mekanotransdüksiyonun Rolünün Araştırılması [Yüksek Lisans Tezi] Hacettepe Üniversitesi 2019.
14. Fan F. et al. Pharmacological targeting of kinases MST1 and MST2 augments tissue repair and regeneration. *Sci Transl Med* 2016. 8(352): p. 352ra108.
15. Bradford Y.M. et al. Zebrafish Models of Human Disease: Gaining Insight into Human Disease at ZFIN. *ILAR J* 2017. 58(1): p. 4-16.
16. Howe K. et al. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature* 2013. 496(7446): p. 498-503.
17. Wixon J. Featured organism: Danio rerio the zebrafish. *Yeast* 2000. 17(3): p. 225-31.
18. Holtzman N.G. et al. Learning to Fish with Genetics: A Primer on the Vertebrate Model Danio rerio. *Genetics* 2016. 203(3): p. 1069-89.
19. Varga Z.M. Aquaculture husbandry and shipping at the Zebrafish International Resource Center. *Methods Cell Biol* 2016. 135: p. 509-34.
20. Zheng W. N. Thorne and J.C. McKew Phenotypic screens as a renewed approach for drug discovery. *Drug Discov Today* 2013. 18(21-22): p. 1067-73.

21. Lam P.Y. and R.T. Peterson Developing zebrafish disease models for in vivo small molecule screens. *Curr Opin Chem Biol* 2019. 50: p. 37-44.
22. Terriente J. and C. Pujades Use of zebrafish embryos for small molecule screening related to cancer. *Dev Dyn* 2013. 242(2): p. 97-107.
23. Zon L.I. and R.T. Peterson In vivo drug discovery in the zebrafish. *Nat Rev Drug Discov* 2005. 4(1): p. 35-44. Kithcart A. and C.A. MacRae Using Zebrafish for High-Throughput Screening of Novel Cardiovascular Drugs. *JACC Basic Transl Sci* 2017. 2(1): p. 1-12.
24. Chahardehi A.M. H. Arsad and V. Lim Zebrafish as a Successful Animal Model for Screening Toxicity of Medicinal Plants. *Plants (Basel)* 2020. 9(10).
25. Truong L. S.L. Harper and R.L. Tanguay Evaluation of embryotoxicity using the zebrafish model. *Methods Mol Biol* 2011. 691: p. 271-9.
26. Bowman T.V. and L.I. Zon Swimming into the future of drug discovery: in vivo chemical screens in zebrafish. *ACS Chem Biol* 2010. 5(2): p. 159-61.
27. Peterson R.T. et al. Chemical suppression of a genetic mutation in a zebrafish model of aortic coarctation. *Nat Biotechnol* 2004. 22(5): p. 595-9.
28. Barros T.P. et al. Zebrafish: an emerging technology for in vivo pharmacological assessment to identify potential safety liabilities in early drug discovery. *Br J Pharmacol* 2008. 154(7): p. 1400-13.
29. Dayal N. Joshi D. S. Thakur mansee soparkar ameya doktor masooma patil poonam effective method to deliver test substance in Adult Zebrafish (*Danio Rerio*). *International Journal of Approximate Reasoning* 2016. 4.
30. Burns C.G. et al. High-throughput assay for small molecules that modulate zebrafish embryonic heart rate. *Nat Chem Biol* 2005. 1(5): p. 263-4.
31. Berghmans S. et al. Zebrafish based assays for the assessment of cardiac visual and gut function potential safety screens for early drug discovery. *J Pharmacol Toxicol Methods* 2008. 58(1): p. 59-68.
32. Kinkel M.D. et al. Intraperitoneal injection into adult zebrafish. *J Vis Exp* 2010(42).
33. Pugach E.K. et al. Retro-orbital injection in adult zebrafish. *J Vis Exp* 2009 (34).
34. Tan J.H. and W.K. Chan Efficient gene transfer into zebrafish skeletal muscle by intramuscular injection of plasmid DNA. *Mol Mar Biol Biotechnol* 1997. 6(2): p. 98-109.
35. Dang M. et al. Long-term drug administration in the adult zebrafish using oral gavage for cancer preclinical studies. *Dis Model Mech* 2016. 9(7): p. 811-20.
36. Cornet C. V. Di Donato and J. Terriente Combining Zebrafish and CRISPR/Cas9: Toward a More Efficient Drug Discovery Pipeline. *Front Pharmacol* 2018. 9: p. 703.
37. Strahle U. and C. Grabher The zebrafish embryo as a model for assessing off-target drug effects. *Dis Model Mech* 2010. 3(11-12): p. 689-92.
38. Frontera W.R. and J. Ochala Skeletal muscle: a brief review of structure and function. *Calcif Tissue Int* 2015. 96(3): p. 183-95.
39. Allen D.L. et al. Plasticity of myonuclear number in hypertrophied and atrophied mammalian skeletal muscle fibers. *J Appl Physiol* (1985) 1995. 78(5): p. 1969-76.

40. Hikida R.S. Aging changes in satellite cells and their functions. *Curr Aging Sci* 2011. 4(3): p. 279-97.
41. Macaluso F. and K.H. Myburgh Current evidence that exercise can increase the number of adult stem cells. *J Muscle Res Cell Motil* 2012. 33(3-4): p. 187-98.
42. Boldrin L. F. Muntoni and J.E. Morgan Are human and mouse satellite cells really the same *J Histochem Cytochem* 2010. 58(11): p. 941-55.
43. Devoto S.H. et al. Identification of separate slow and fast muscle precursor cells in vivo prior to somite formation. *Development* 1996. 122(11): p. 3371-80.
44. Tabebordbar M. E.T. Wang and A.J. Wagers Skeletal muscle degenerative diseases and strategies for therapeutic muscle repair. *Annu Rev Pathol* 2013. 8: p. 441-75.
45. Juan W.C. and W. Hong Targeting the Hippo Signaling Pathway for Tissue Regeneration and Cancer Therapy. *Genes (Basel)* 2016. 7(9).
46. Yu F.X. B. Zhao and K.L. Guan Hippo Pathway in Organ Size Control Tissue Homeostasis and Cancer. *Cell* 2015. 163(4): p. 811-28.
47. Meng Z. T. Moroishi and K.L. Guan Mechanisms of Hippo pathway regulation. *Genes Dev* 2016. 30(1): p. 1-17.
48. Poon C.L. et al. The sterile 20-like kinase Tao-1 controls tissue growth by regulating the Salvador-Warts-Hippo pathway. *Dev Cell* 2011. 21(5): p. 896-906.
49. Boggiano J.C. P.J. Vanderzalm and R.G. Fehon Tao-1 phosphorylates Hippo/MST kinases to regulate the Hippo-Salvador-Warts tumor suppressor pathway. *Dev Cell* 2011. 21(5): p. 888-95.
50. Callus B.A. A.M. Verhagen and D.L. Vaux Association of mammalian sterile twenty kinases Mst1 and Mst2 with hSalvador via C-terminal coiled-coil domains leads to its stabilization and phosphorylation. *FEBS J* 2006. 273(18): p. 4264-76.
51. Praskova M. F. Xia and J. Avruch MOBKL1A/MOBKL1B phosphorylation by MST1 and MST2 inhibits cell proliferation. *Curr Biol* 2008. 18(5): p. 311-21.
52. Hergovich A. D. Schmitz and B.A. Hemmings The human tumour suppressor LATS1 is activated by human MOB1 at the membrane. *Biochem Biophys Res Commun* 2006. 345(1): p. 50-8.
53. Hoa L. et al. The characterisation of LATS2 kinase regulation in Hippo-YAP signalling. *Cell Signal* 2016. 28(5): p. 488-497.
54. Zhao B. et al. A coordinated phosphorylation by Lats and CK1 regulates YAP stability through SCF(beta-TRCP). *Genes Dev* 2010. 24(1): p. 72-85.
55. Liang N. et al. Regulation of YAP by mTOR and autophagy reveals a therapeutic target of tuberous sclerosis complex. *J Exp Med* 2014. 211(11): p. 2249-63.
56. Vassilev A. et al. TEAD/TEF transcription factors utilize the activation domain of YAP65 a Src/Yes-associated protein localized in the cytoplasm. *Genes Dev* 2001. 15(10): p. 1229-41.
57. Gupta M.P. et al. Transcription enhancer factor 1 interacts with a basic helix-loop-helix zipper protein Max for positive regulation of cardiac alpha-myosin heavy-chain gene expression. *Mol Cell Biol* 1997. 17(7): p. 3924-36.

58. Jacquemin P. et al. A novel family of developmentally regulated mammalian transcription factors containing the TEA/ATTS DNA binding domain. *J Biol Chem* 1996. 271(36): p. 21775-85.
59. Jacquemin P. et al. Differential expression of the TEF family of transcription factors in the murine placenta and during differentiation of primary human trophoblasts in vitro. *Dev Dyn* 1998. 212(3): p. 423-36.
60. Kaneko K.J. et al. Transcription factor mTEAD-2 is selectively expressed at the beginning of zygotic gene expression in the mouse. *Development* 1997. 124(10): p. 1963-73.
61. Von Gise A. et al. YAP1 the nuclear target of Hippo signaling stimulates heart growth through cardiomyocyte proliferation but not hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012. 109(7): p. 2394-9.
62. Del Re D.P. et al. Yes-associated protein isoform 1 (Yap1) promotes cardiomyocyte survival and growth to protect against myocardial ischemic injury. *J Biol Chem* 2013. 288(6): p. 3977-88.
63. Dong J. et al. Elucidation of a universal size-control mechanism in *Drosophila* and mammals. *Cell* 2007. 130(6): p. 1120-33.
64. Sun C. et al. Common and Distinctive Functions of the Hippo Effectors Taz and YAP in Skeletal Muscle Stem Cell Function. *Stem Cells* 2017. 35(8): p. 1958-1972.
65. Mateus R. et al. Control of tissue growth by YAP relies on cell density and F-actin in zebrafish fin regeneration. *Development* 2015. 142(16): p. 2752-63.
66. Ingber D.E. Cellular mechanotransduction: putting all the pieces together again. *FASEB J* 2006. 20(7): p. 811-27.
67. Dupont S. et al. Role of YAP/TAZ in mechanotransduction. *Nature* 2011. 474(7350): p. 179-83.
68. Crisp M. et al. Coupling of the nucleus and cytoplasm: role of the LINC complex. *J Cell Biol* 2006. 172(1): p. 41-53.
69. Driscoll T.P. et al. Cytoskeletal to Nuclear Strain Transfer Regulates YAP Signaling in Mesenchymal Stem Cells. *Biophys J* 2015. 108(12): p. 2783-93.
70. Haque F. et al. SUN1 interacts with nuclear lamin A and cytoplasmic nesprins to provide a physical connection between the nuclear lamina and the cytoskeleton. *Mol Cell Biol* 2006. 26(10): p. 3738-51.
71. Bertrand A.T. et al. Cellular microenvironments reveal defective mechanosensing responses and elevated YAP signaling in LMNA-mutated muscle precursors. *J Cell Sci* 2014. 127(Pt 13): p. 2873-84.
72. Gurtner G.C. et al. Wound repair and regeneration. *Nature* 2008. 453(7193): p. 314-21.
73. Riazifar M. et al. Stem Cell Extracellular Vesicles: Extended Messages of Regeneration. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2017. 57: p. 125-154.
74. Trounson A. and C. McDonald Stem Cell Therapies in Clinical Trials: Progress and Challenges. *Cell Stem Cell* 2015. 17(1): p. 11-22.
75. Zhang Y. et al. Tissue Regeneration. Inhibition of the prostaglandin-degrading enzyme 15-PGDH potentiates tissue regeneration. *Science* 2015. 348(6240): p. 2340.
76. Polizzotti B.D. et al. Neuregulin stimulation of cardiomyocyte regeneration in mice and human myocardium reveals a therapeutic window. *Sci Transl Med* 2015. 7(281): p. 281ra45.

77. Tian Y. et al. A microRNA-Hippo pathway that promotes cardiomyocyte proliferation and cardiac regeneration in mice. *Sci Transl Med* 2015. 7(279): p. 279ra38.
78. Triastuti E. et al. Pharmacological inhibition of Hippo pathway with the novel kinase inhibitor XMU-MP-1 protects the heart against adverse effects during pressure overload. *Br J Pharmacol* 2019. 176(20): p. 3956-3971.
79. Piccolo S. S. Dupont and M. Cordenonsi The biology of YAP/TAZ: hippo signaling and beyond. *Physiol Rev* 2014. 94(4): p. 1287-312.
80. Sansores-Garcia L. et al. Mask is required for the activity of the Hippo pathway effector Yki/YAP. *Curr Biol* 2013. 23(3): p. 229-35.
81. Kojic S. D. Radojkovic and G. Faulkner Muscle ankyrin repeat proteins: their role in striated muscle function in health and disease. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2011. 48(5-6): p. 269-94.
82. Miller M.K. et al. The muscle ankyrin repeat proteins: CARP ankrd2/Arpp and DARP as a family of titin filament-based stress response molecules. *J Mol Biol* 2003. 333(5): p. 951-64.
83. Boskovic S. et al. Characterization of zebrafish (*Danio rerio*) muscle ankyrin repeat proteins reveals their conserved response to endurance exercise. *PLoS One* 2018. 13(9): p. e0204312.
84. Nigro V. and M. Savarese Genetic basis of limb-girdle muscular dystrophies: the 2014 update. *Acta Myol* 2014. 33(1): p. 1-12.
85. Kural E. Desmin ve Lamin B etkileşimin Zebra balığında araştırılması. [Yüksek Lisans Tezi] Hacettepe Üniversitesi 2017.
86. Russell W. M. S. Bruch R.L. The Principles of Humane Experimental Technique Universities federation for animal welfare 1959.
87. Forni M. Laboratory animal science: a resource to improve the quality of science. *Vet Res Commun* 2007. 31 Suppl 1: p. 43-7.
88. Mandal J. and S.C. Parija Ethics of involving animals in research. *Trop Parasitol* 2013. 3(1): p. 4-6.
89. Hoyberghs J. et al. Refinement of the zebrafish embryo developmental toxicity assay. *MethodsX* 2020. 7: p. 101087.
90. Kimmel C.B. et al. Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev Dyn* 1995. 203(3): p. 253-310.
91. Hoppu K. Paediatric clinical pharmacology at the beginning of a new era. *European journal of clinical pharmacology*. 2008;64(2):201-5.
92. Zakaria Z.Z. et al. Using Zebrafish for Investigating the Molecular Mechanisms of Drug-Induced Cardiotoxicity. *Biomed Res Int* 2018. 2018: p. 1642684.
93. OECD Guidelines for the testing of Chemicals Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test – Fish Acute Toxicity Test 2013 draft revised version 2018.
94. Kari G. U. Rodeck and A.P. Dicker Zebrafish: an emerging model system for human disease and drug discovery. *Clin Pharmacol Ther* 2007. 82(1): p. 70-80.
95. Saygı Ş. Deneysel Toksikolojide Toksisite Testleri ve Test Sonuçlarının Önemi *Gülhane Tıp Dergisi* 45 (3) : 291 - 298 (2003).
96. Kang M.H. et al. The cytotoxic effects of dimethyl sulfoxide in mouse preimplantation embryos: a mechanistic study. *Theranostics* 2017. 7(19): p. 4735-4752.

8. EKLER

EK-1. Tez Çalışması İle İlgili Etik Kurul İzni



T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu

Sayı : 52338575 - 73

HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURUL KARARI

TOPLANTI TARİHİ	: 10.07.2018 (SALI)
TOPLANTI SAYISI	: 2018/07
DOSYA KAYIT NUMARASI	: 2018/33
KARAR NUMARASI	: 2018/33 – 10
ARAŞTIRMA YÜRÜTÜCÜSÜ	: Prof. Dr. Pervin DİNÇER
HAYVAN DENEYLERİNDE	: Zeynep ÇINAR
GÖREVLİ ARAŞTIRMACILAR	:
DİĞER YARDIMCI	:
ARAŞTIRMACILAR	:
ONAYLANAN HAYVAN TÜRÜ ve	: 134 Adet <i>Danio Rerio AB Zebra Balığı</i> (5-6 Aylık)
SAYISI	:

Üniversitemiz Tıp Fakültesi Biyoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Prof. Dr. Pervin DİNÇER'in araştırma yürütücüsü olduğu 2018/33 kayıt numaralı "*Desma Mutant Zebra Balığı Modelinde Tedavi Amaçlı XMU-MP-1 İlaç Uygulaması*" isimli çalışma Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesi'ne göre uygun bulunarak oy birliği ile onaylanmasına karar verilmiştir.

Araştırma yürütücüsü Kurulumuza araştırma projesinin bitiş tarihini bildirmek ve proje sonuç raporunu sunmak ile yükümlüdür.

Prof. Dr. Sema ÇALIŞ
Etik Kurul Başkanı

HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU GÜNDEMİ - İMZA SİRKÜLERİ
TOPLANTI TARİHİ : 10.07.2018 (SALI)
TOPLANTI SAYISI : 2018/07
TOPLANTI SAATİ : 13.30

Prof. Dr. Sema ÇALIŞ (Başkan)	Prof. Dr. Nüket Örnek BÜKEN (Üye)	(İZİNLİ) Prof. Dr. M. Yıldırım SARA (Üye)
Prof. Dr. Mehmet Ali ONUR (Üye)	(İZİNLİ) Prof. Dr. Güneş ESENDAĞLI (Üye)	Doç. Dr. Meltem TUNCER (Üye)
Doç. Dr. A. Cevdet AKMAN (Üye)	(İZİNLİ) Doç. Dr. Aytekin AKYOL (Üye)	Doç. Dr. Esra KÖR (Üye)
İZİNLİ Doç. Dr. İlyas ONBAŞILAR (Üye)	Doç. Dr. Mehmet Alper ÇETİNKAYA (Üye)	Dr. Öğr. Üyesi Banu Cahide TEL (Üye)
Mevlüt ÖKSÜZOĞLU (Üye)	İ. Serdar ÇAKIROĞLU (Üye)	Avukat Yasemin ÖZSELÇUK (Üye)

EK-2. Toksisite testi öncesi ve sonrası erişkin balıkların bulundukları su ortamında toplam sertlik su oksijen seviyesi ölçümleri. (Hava: test öncesi %70.2 test sonrası %48.6)

	Toksisite testi öncesi		Toksisite testi sonrası (96.saatte)	
	Su oksijen seviyesi	Sudaki toplam sertlik (dGH)	Su oksijen seviyesi	Sudaki toplam sertlik (dGH)
100 mg/L	%52	3 °	%44.1	3 °
50 mg/L	%52	3 °	%44.9	3 °
25 mg/L	%52	3 °	%38.0	3 °
Çözücü kontrolü	%52	3 °	%44.3	3 °

EK-3. RNA konsantrasyon ve saflık değerleri

Yabanıl Tip embriyo n 1	330,25	1,9	1,7
Yabanıl Tip embriyo n 2	630,3	2,32	1,73
Yabanıl Tip embriyo n 3	366,7	1,97	1,35
Yabanıl Tip embriyo s 1	335,8	1,97	1,35
Yabanıl Tip embriyo s 2	264,9	1,9	1,25
Yabanıl Tip embriyo s 3	356,0	1,9	1,73
Yabanıl Tip embriyo i 1	200,5	1,8	1,23
Yabanıl Tip embriyo i 2	279,6	1,9	1,30
Yabanıl Tip embriyo i 3	235,4	1,9	1,60
Kg155 (-/-) embriyo n 1	160,6	1,7	1,38
Kg155 (-/-) embriyo n 2	344,3	1,8	1,73
Kg155 (-/-) embriyo n 3	223,7	1,7	1,61
Kg155 (-/-) embriyo s 1	420,2	1,5	1,46
Kg155 (-/-) embriyo s 1	317,9	1,93	0,76
Kg155 (-/-) embriyo s 2	355,2	1,81	1,10
Kg155 (-/-) embriyo i 1	368,3	1,80	1,07
Kg155 (-/-) embriyo i 2	237,5	1,36	1,46
Kg155 (-/-) embriyo i 3	201,1	1,69	1,49
Yabanıl Tip erişkin n 1	159,1	1,92	1,52
Yabanıl Tip erişkin n 2	261,2	1,92	1,48
Yabanıl Tip erişkin n 3	172,2	1,80	1,85
Yabanıl Tip erişkin s 1	186,5	1,70	1,59
Yabanıl Tip erişkin s 2	157,8	1,83	1,40
Yabanıl Tip erişkin s 3	271,5	1,79	1,01
Yabanıl Tip erişkin i 1	231,2	1,93	1,79
Yabanıl Tip erişkin i 2	135,0	1,94	1,83
Yabanıl Tip erişkin i 3	283,0	1,87	1,72
Kg155 (-/-) erişkin n 1	255,7	1,89	1,74
Kg155 (-/-) erişkin n 2	190,7	1,89	1,74
Kg155 (-/-) erişkin n 3	127,7	1,88	1,24
Kg155 (-/-) erişkin s 1	153,0	1,83	0,98
Kg155 (-/-) erişkin s 2	154,0	1,91	1,14
Kg155 (-/-) erişkin s 3	186,4	1,77	1,47
Kg155 (-/-) erişkin i 1	299,6	1,87	1,44
Kg155 (-/-) erişkin i 2	185,5	1,52	0,83
Kg155 (-/-) erişkin i 3	152,1	1,88	1,47

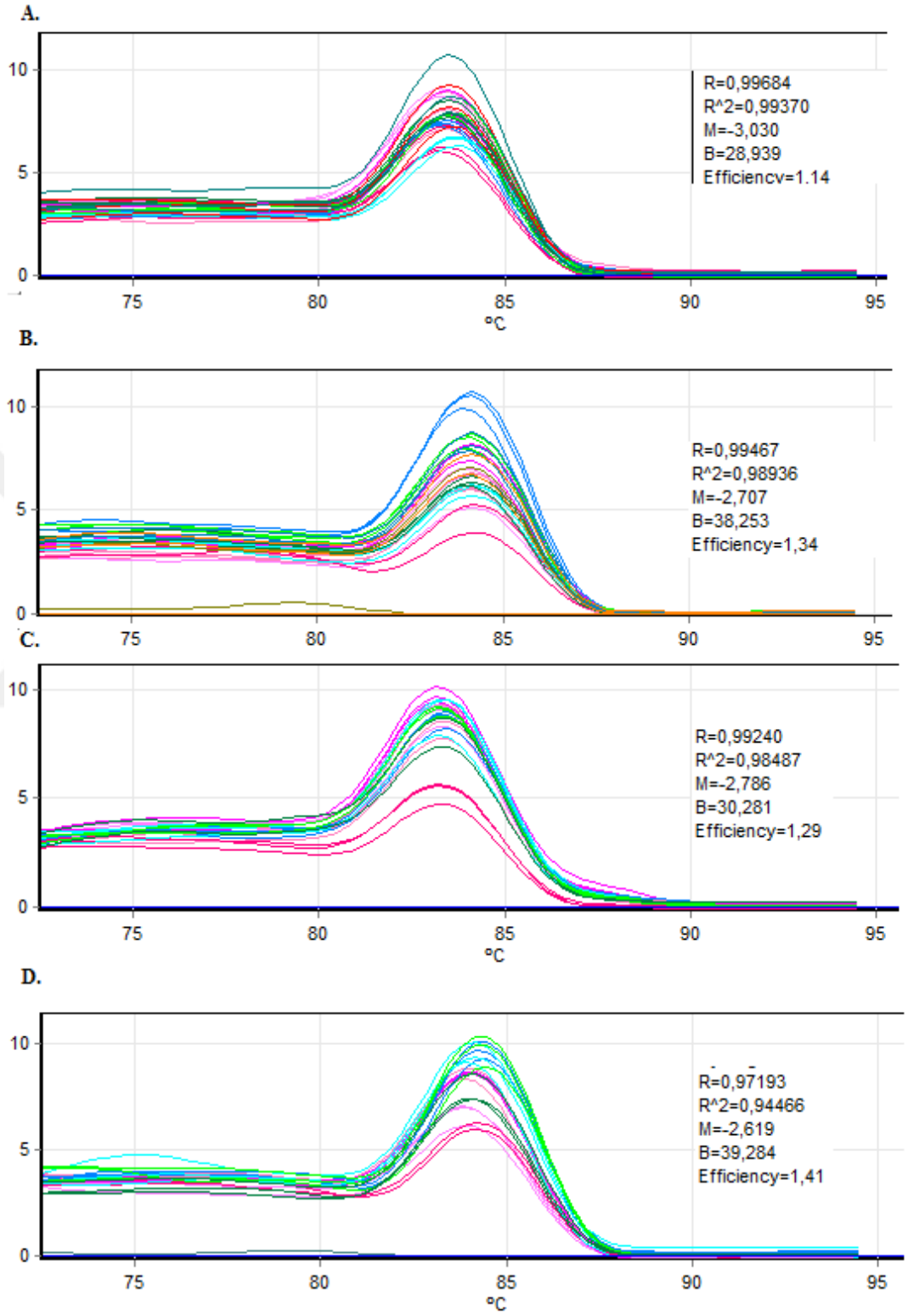
EK-4. Yabanıl tip ve mutant embriyolarda *ankrd1a* ifadesinin *actb* ile oranlanarak elde edilen kat değişimleri.

Yabanıl tip negatif kontrol	Yabanıl tip çözücü kontrolü	Yabanıl tip ilaç uygulaması	Mutant negatif kontrol	Mutant çözücü kontrolü	Mutant ilaç uygulaması
1,01	2,86	4,13	1,02	1,46	0,99
7,82	2,30	1,88	0,63	1,08	1,10
1,61	2,70	1,79	1,27	1,27	1,04

EK-5. Yabanıl tip ve mutant embriyolarda *ankrd1a* ifadesinin *actb* ile oranlanarak elde edilen kat değişimleri.

Yabanıl tip negatif kontrol	Yabanıl tip çözücü kontrolü	Yabanıl tip ilaç uygulaması	Mutant negatif kontrol	Mutant çözücü kontrolü	Mutant ilaç uygulaması
1,01	58,94	64,57	1,02	5,72	20,08
1,00	65,95	51,21	1,01	27,76	57,67
1,26	98,30	31,45	1,10	37,54	62,24

EK-6. Yabanıl tip ve mutant embriyolarda (A-B) /erişkinlerde (C-D) *actb* (A-C) ve *ankrd1a* (B-D) kGZ-PZR çalışmaları.



EK-7. Toksisite testinin sonrasında morfolojik değerlendirme, 96 saatin sonunda normal morfoloji gösteren embriyoya ait mikroskop görüntüsü



EK-8. Sitrik asit- Kolliphor HS 15 içeren çözücü optimizasyon çalışmaları

	%16 Kolliphor HS 15 içeren %0.1 sitrik asit sulu çözeltisi (embriyo mediumu içerisinde)	%12 Kolliphor HS 15 içeren %0.1 sitrik asit sulu çözeltisi (embriyo mediumu içerisinde)	%8 Kolliphor HS 15 içeren %0.1 sitrik asit sulu çözeltisi (embriyo mediumu içerisinde)	%4 Kolliphor HS 15 içeren %0.1 sitrik asit sulu çözeltisi (embriyo mediumu içerisinde)	%1 Kolliphor HS 15 içeren %0.1 sitrik asit sulu çözeltisi (embriyo mediumu içerisinde)
24 saat sonra zebrabalığı embriyoları canlılık durumu	Ölü	Ölü	Ölü	Ölü	Ölü

	%2 Kolliphor HS 15 içeren 50 mg sitrik asit sulu çözeltisi (Embriyo medium içerisinde)	%16 Kolliphor HS 15 içeren 50 mg sitrik asit sulu çözeltisi (Embriyo medium içerisinde)	%2 Kolliphor HS 15 içeren 10 mg sitrik asit sulu çözeltisi (Embriyo medium içerisinde)	%16 Kolliphor HS 15 içeren 10 mg sitrik asit sulu çözeltisi (Embriyo medium içerisinde)	%2 Kolliphor HS 15 içeren 1 mg sitrik asit sulu çözeltisi (Embriyo medium içerisinde)	%16 Kolliphor HS 15 içeren 1 mg sitrik asit sulu çözeltisi (Embriyo medium içerisinde)
24 saat sonra zebrabalığı embriyoları canlılık durumu	Ölü	Ölü	Ölü	Ölü	Ölü	Ölü

Deneme 1: %1, %0.5, %0.2 ve %0.1 Kolliphor HS 15 içeren embriyo medium çözeltileri hazırlanmıştır. Eş zamanlı olarak, %1, %0.5, %0.2 ve %0.1 Kolliphor HS 15 içeren 1 mg sitrik asit çözeltileri (embriyo mediumu içerisinde) de denenmiştir. 24 saat sonrasında, negatif kontrol embriyolar hariç, yukarda bahsedilen tüm çözeltilerin uygulandığı kuyucuklardaki embriyolar ölmüştür.

Deneme 2: %0.05, %0.02, %0.01, %0.002 ve %0.001 Kolliphor HS 15 içeren embriyo medium çözeltileri hazırlanmıştır. %0.002 ve %0.001 Kolliphor HS 15 içeren embriyo medium çözeltilerinin embriyolar için toksik olmadığına karar verilmiştir.

Son olarak, %0.002 Kolliphor HS 15 içeren embriyo mediumu içerisinde 1 mg sitrik asit çözeltisi de embriyolarda denenerek toksik olmadığı belirlenmiştir. Kullanılacak solvent %0.002 Kolliphor HS 15 içeren 1 mg sitrik asit (embriyo mediumu içerisinde) sulu çözeltisidir.

EK-9. Orjinallik Ekran Çıktısı

TEZİN TAM BAŞLIĞI: DESMA MUTANT ZEBRA BALIĞI
MODELİNDE TEDAVİ AMAÇLI XMU-MP- 1 UYGULAMASI

ÖĞRENCİNİN ADI SOYADI: Zeynep Çınar

DOSYANIN TOPLAM SAYFA SAYISI: 68

DESMA MUTANT ZEBRA BALIĞI MODELİNDE TEDAVİ AMAÇLI
XMU-MP- 1 UYGULAMASI

ORIJİNALLIK RAPORU

%5	%5	%1	%1
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	%3
2	openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<%1
3	www.61saat.com İnternet Kaynağı	<%1

4	www.sigmaaldrich.com İnternet Kaynağı	<% 1
5	saglikbilimleri.hacettepe.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1
6	Submitted to Tampereen teknillinen yliopisto Öğrenci Ödevi	<% 1
7	J. J. Franchina, M. H. Moore. "Strychnine and the Inhibition of Previous Performance", Science, 1968 Yayın	<% 1
8	Submitted to The Scientific & Technological Research Council of Turkey (TUBITAK) Öğrenci Ödevi	<% 1
9	Submitted to Hacettepe University Öğrenci Ödevi	<% 1
10	www.journalagent.com İnternet Kaynağı	<% 1
11	Masato Kinoshita, Kenji Murata, Kiyoshi Naruse, Minoru Tanaka. "Medaka", Wiley, 2009 Yayın	<% 1
12	katalog.hacettepe.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1
13	www.apotheekvelghe.be İnternet Kaynağı	<% 1
14	www.thno.org İnternet Kaynağı	<% 1

- 15 ÖNDER, Meltem, KALKANCI, Ayşe, KEVLEKÇİ, Canan, GÜRER, Mehmet Ali and SUGITA, Takashi. "Atopik dermatitli hastalarda malassezia yükünün moleküler yöntemler ile gösterilmesi", TUBITAK, 2011. <%1

- 16 ncu.repo.nii.ac.jp <%1
Internet Kaynağı

Alıntıları çıkart

üzerinde

Eşleşmeleri çıkar

< 5 words

Win
Wind

Bibliyografyayı Çıkart

üzerinde

EK-10. Dijital Makbuz



Dijital Makbuz

Bu makbuz ödevinizin Turnitin'e ulaştığını bildirmektedir. Gönderiminize dair bilgiler şöyledir:

Gönderinizin ilk sayfası aşağıda gönderilmektedir.

Gönderen: Zeynep Çınar
 Ödev başlığı: Zeynep Çınar
 Gönderi Başlığı: DESMA MUTANT ZEBRA BALIĞI MODELİNDE TEDAVİ AMAÇLI ...
 Dosya adı: Zeynep_NAR_Y_ksek_Lisans_Tezi_SON_-_Kopya.docx
 Dosya boyutu: 3.29M
 Sayfa sayısı: 68
 Kelime sayısı: 13,375
 Karakter sayısı: 95,226
 Gönderim Tarihi: 03-Mar-2021 08:58PM (UTC+0300)
 Gönderim Numarası: 1523325055

