

T.C.
AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ (TIP) YÜKSEK LİSANS PROGRAMI
THE-2019-0002

PORCUPINE İNHİBİTÖRÜ UYGULANMASI SONRASINDA
FETUS BEYİNLERİNDE SİNİR VE KÖK HÜCRE
BELİRTEÇLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Gözde ALKAN YEŞİLYURT
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Kemal ERGİN

Bu tez Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından TPF-16021 proje numarası ile desteklenmiştir

AYDIN-2019

KABUL VE ONAY SAYFASI

T.C. Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Hiyatoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Tezli Yüksek Lisans Programı çerçevesinde GÖZDE ALKAN YEŞİLYURT tarafından Hazırlanan “Porcupine İnhibitörü Uygulanması Sonrasında Fetus Beyinlerinde Sinir ve Kök Hücre Belirteçlerinin Araştırılması” başlıklı tez, aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: .../.../2019

Üye (T.D.) : Prof. Dr. Kemal ERGİN

Üye : Doç. Dr. Güneş ÖZHAN BAYKAN

Üye : Doç. Dr. Gizem DÖNMEZ YALÇIN

ONAY:

Bu tez Adnan Menderes Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun görülmüş ve Sağlık Bilimleri Enstitüsününtarih vesayılı oturumunda alınannolu Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Ahmet CEYLAN

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

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

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

Tez çalışmam süresince bana anlayış gösterip çalışmama izin verdiği ve bu süre zarfında anlayış gösterip bana yardımcı olan ADÜ- TARBIYOMER müdürü olan Doç. Dr. Zeynel DALKILIÇ'a çok teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimim boyunca sürekli yanımda olan bana manevi güç veren deneylerimde bana yardımcı olup ve desteklerini hep hissettiğim, onlarla çalışmaktan mutluluk duyduğum çok değerli arkadaşlarım Adem YAVAŞ, Esra Gökmen YILMAZ, Nezih ATA, Ayşenur BOSTANCI'ya destekleri ve yardımları için teşekkür ederim.

Tüm hayatım boyunca aldığım her kararda ve attığım her adımda bütün varlıkları ile hep yanımda olan sevgisini hep hissettiğim iyi ki varsınız dediğim ve beni bugünlere getiren sevgili anneme, babama, kardeşime ve değerli eşim Mehmet YEŞİLYURT'a tüm kalbimle teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY SAYFASI.....	i
TEŞEKKÜR	ii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	vi
RESİMLER DİZİNİ	viii
TABLolar DİZİNİ.....	xi
ÖZET	xii
ABSTRACT	xiii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Sinir Sisteminin Embriyonik Gelişimi	3
2.1.1. Gastrülasyon: Germ Tabakalarının Oluşumu.....	3
2.1.2. Primitif Çizgi Ve Notokordun Oluşumu	3
2.1.2. Notokord oluşumu	4
2.1.3. Nörülasyon: Nöral Tüpün Oluşumu	4
2.1.3.1. Nöral plak ve nöral tüp	5
2.2. Sinir Sistemi	5
2.2.1. Sinir Sisteminin Genel Özellikleri.....	5
2.2.2. Sinir Sisteminin Gelişimi	6
2.2.3. Merkezi Sinir Sistemindeki Hücreler	7
2.2.3.1. Glia hücreleri	7
2.2.3.2. Astrositler	7
2.2.3.2.1. Protoplazmik astrositler	8
2.2.3.2.2. Fibröz astrositler	8
2.2.3.3. Oligodentrositler	8
2.2.3.4. Ependim Hücreleri.....	8
2.2.3.5. Mikroglialar	9
2.2.4. Beyin Yapısı	9
2.3. Merkezi Sinir Sistemi Histolojisi	10
2.4. Beyin Gelişimi.....	10
2.4.1. Rombensefalon: Arka beyin	10
2.4.2. Myelensefalon	11
2.4.3. Metensefalon	11

2.4.4. Mezensefalon (Orta Beyin)	11
2.4.5. Prosensefalon: Ön beyin.....	12
2.4.6. Diyensefalon: Tavan Plağı ve Epifiz.....	12
2.4.7. Telensefalon.....	12
2.4.8. Beyin Gelişimindeki Tabakalar	13
2.5. Sinir Sistemindeki Belirteçler.....	14
2.5.1. Beyinde Sinir ve Kök Hücre Belirteçleri.....	14
2.5.1.2. S100 proteini	14
2.5.2. Beyine Özgü Proteinlerin Prenatal Dönemdeki Önemi.....	16
2.6. Embriyonik Farede Merkezi Sinir Sistemi ve Beyin Gelişimi.....	16
2.7. Wnt Sinyal Mekanizması	19
2.7.1. Wnt/ β -Katenin Bağımlı (Kanonik/Klasik) Sinyal Yolağı	23
2.7.2. Wnt /Ca ²⁺ ve Wnt/Planar Hücre Polaritesi (PCP) (non-canonical) Yolağı.....	25
2.7.3. β - katenin Molekülü	25
2.7.4. β - Katenin ve Adezyon İlişkisi	27
2.7.5. Lgr 5 (leucine rich repeat containing G protein coupled receptor 5)	28
2.8. Wnt' nin Beyin Gelişimine Etkisi	29
2.9. LGK974.....	31
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	32
3.1. Deney Hayvanlarının Temini ve Bakımı.....	32
3.2. Deney Grupların Planlanması.....	32
3.3. Wnt İnhibisyonu Oluşturma	33
3.4. Deneyin Sonlandırılması	34
3.5. Embriyoların Ağırlıkları ve Boy Ölçümü.....	34
3.6. Doku Takibi.....	34
3.7. Histokimyasal Boyamalar	35
3.8. İmmünohistokimya Boyama Prosudürü	35
3.9. İstatistiksel Analiz	36
3.9.1. Fetus Ağırlıkları ve Boy	36
3.9.2. İmmünohistokimyasal Değerlendirme	37
4. BULGULAR	38
4.1. Fetus Ağırlıkları ve Boy Ölçüleri	38
4.2. İmmünohistokimyasal Değerlendirmeler	39
4.2.1. Kontrol Grubundaki Sonuçlar	40

4.2.2. DMSO Grubundaki Sonuçlar	42
4.2.3. Porcupine İnhibitör Grubu.....	45
4.3. Gruplar Arasında İHC Skor Farklılığı Karşılaştırması.....	48
4.4. Histokimyasal Boyamaların Değerlendirilmesi	52
4.4.1. Hematoksilen-Eozin Değerlendirilmesi	52
4.4.2. Toluidin Blue Boya Değerlendirilmesi.....	53
5. TARTIşMA.....	55
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	59
KAYNAKLAR.....	60
ÖZGEçMİş.....	74



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AD	: Anterodorsal
AM	: Anteromedial
APC	: Adenomatöz polipozis coli
AV	: Anteroventral
BİP	: İmmunoglobulinheavy-chain-binding protein
BMP	: Bone morfojenetik protein
BOS	: Beyin omur ilik sıvısı
CaMK2	: Kalmodulin kinaz II
Cdc42	: Cell division control protein 42
CKI_g	: Kazein kinaz Ig
CRD	: Cystein-rich domain
Dlgn	: Dorsal lateral genikulat çekirdeği
Dsh/Dvl	: Dishevelled
EGFR	: Epidermal growth factor receptor
ER	: Endoplazmik retikulum
FGF	: Fibroblast growth factor
Frat-1	: Frequently rearranged in advanced T-cell lymphoma-1
Fz	: Frizzled
GABA	: α -aminobutirik asit
GAP-43	: Büyüme ile ilişkili protein
Gbx2	: The role of gastrulation brain homeobox 2
GFAP	: Glial fibriler asidik protein
GMP	: Granulosit/monosit prohenitör hücrelerinden
GPCR	: G-Protein Coupled Receptors
GSK3s	: Glikojen sentaz kinaz
Hsp	: Heat-shock proteini
IWR-1	: Wnt bloke edici ilaç
JNK	: Jun kinaz
Lgr 5	: Leucine rich repeat containing G protein coupled receptor 5
LRP5/6	: Low-density lipoprotein receptor-related protein
MBOAT	: Membran-bound Oaciltransferaz family
MBP	: Miyelin bazik proteini

MSS	: Merkezi sinir sistemi
NAA	: N-asetil-L-aspartat
OST	: Oligosakkaril-transferaz Kompleks
PCP	: The Planar Cell Polarity
PORCN	: Porcupine
PSS	: Periferik sinir sistemi
RAC	: Ras-related C3 botulinum toxin substrate
RhoA	: Ras homolog gene family member A
SHH	: Sonic hedgehog
TCF/LEF	: Transcription Factors



RESİMLER DİZİNİ

Resim 1. Beyin tabakalarının şematik gösterimi.....	14
Resim 2. (Wnt sinyal yolu. A: İnaktif form, B: Aktif form) (McDonald et al, Dev Cell, 2009, Jul; 17(1):9-26).	25
Resim 3. β -katenin ve ona bağlanan moleküller (Liu ve ark.2001)	26
Resim 4. Gebelikte kontrol edilen vajinal plağın tespiti	33
Resim 5. E13,5 günlük kontrol grubunu A'da, B; E13,5 günlük DMSO grubu, C; E13,5 günlük Porcupine inhibitör grubunu görüyoruz	38
Resim 6. E15,5 günlük kontrol grubunu A'da, B; E15,5 günlük DMSO grubu, C; E15, 5 günlük Porcupine inhibitör grubunu görüyoruz	39
Resim 7. E17,5 günlük kontrol grubunu A'da, B; E17,5 günlük DMSO grubu, C; E17, 5 günlük Porcupine inhibitör grubunu D; E17,5 günlük Porcupine inhibitör grubunun embriyoların oluşmadığı sadece plasentaların varlığını görüyoruz.....	39
Resim 8. A'da E13,5 günlük kontrol grubu beta katenin boyaması. B'de E15,5 günlük kontrol beta katenin boyaması. C 'de E17,5 günlük kontrol beta katenin boyamasını 4'lük büyütmede görülmektedir (*; ile gösterilen intermediate tabaka).....	40
Resim 9. A'da E13,5 günlük kontrol grubu S100B boyaması. B'de E15, 5 günlük kontrol S100B boyaması. C 'de E17,5 günlük kontrol S100B boyamasını 4'lük büyütmede görülmektedir	41
Resim 10. A'da E13,5 günlük kontrol grubu LGR5 boyaması. B'de E15,5 günlük kontrol LGR5 boyaması. C 'de E17,5 günlük kontrol LGR5 boyamasını 4'lük büyütmede görülmektedir. Ok ile gösterilen marginal tabaka, (*) ile gösterişen intermediate tabaka, (+) ile ventriküler ve subventriküler tabakayı göstermekteyiz.....	42
Resim 11. A'da E13,5 günlük DMSO grubu beta-katenin boyaması. B'de E15,5 günlük DMSO beta katenin boyaması. C'de E17,5 günlük DMSO beta katenin boyamasını 4'lük büyütmede görülmektedir.	43
Resim 12. A'da E13,5 günlük DMSO grubu S100B boyaması. B'de E15,5 günlük DMSO S100B boyaması. C 'de E17,5 günlük DMSO S100B boyamasını 4'lük büyütmede görülmektedir	44

- Resim 13.** A'da E13,5 günlük DMSO grubu LGR5 boyaması. B'de E15,5 günlük DMSO LGR5 boyaması. C 'de E17,5 günlük DMSO LGR5 boyamasını 4'lük büyütmede görülmektedir. (*); İntermediate zon, (+); ventriküler ve subventriküler tabakayı görüyoruz 45
- Resim 14.** A'da E13,5 günlük Porcupine inhibitör grubu Beta katenin boyaması. B'de E15,5 günlük Porcupine inhibitör grubu, Beta katenin boyaması. C 'de E17,5 günlük Porcupine inhibitör grubu, Beta katenin boyamasını 4'lük büyütmede görülmektedir. (*); İntermediate zon, (+); ventriküler ve subventriküler tabakayı görüyoruz 46
- Resim 15.** A'da E13,5 günlük Porcupine inhibitör grubu S100B boyaması. B'de E15,5 günlük Porcupine inhibitör grubu, S100B boyaması. C 'de E17, 5 günlük Porcupine inhibitör grubu, S100B boyamasını 4'lük büyütmede görülmektedir..... 47
- Resim 16.** A'da E13,5 günlük Porcupine inhibitör grubu LGR5 boyaması. B'de E15,5 günlük Porcupine inhibitör, LGR5 boyaması. C 'de E17, 5 günlük Porcupine inhibitör, LGR5 boyamasını 4'lük büyütmede görülmektedir. (*); İntermediate zon, (+); ventriküler ve subventriküler tabakayı görüyoruz 48
- Resim 17.** E13,5 günlük Beta-katenin boyamasında, A'da kontrol grubu, B'de DMSO grubunu, C'de ise Porcupine inhibitör rubunu x25'lik büyütmede görüyoruz. (M.Z; Marginal zon, İ.Z; İntermediate zon, V+SubV.Z; Ventriküler + Subventriüler zon) 49
- Resim 18.** E13,5 günlük S100B boyamasında, A'da kontrol grubu, B'de DMSO grubunu, C'de ise Porcupine inhibitör grubunu x25'lik büyütmede görüyoruz. (M.Z; Marginal zon, İ.Z; İntermediate zon, V+SubV.Z; Ventriküler + Subventriüler zon) 49
- Resim 19.** E13,5 günlük LGR5 boyamasında, A'da kontrol grubu, B'de DMSO grubunu, C'de ise Porcupine inhibitör grubunu x25'lik büyütmede görüyoruz. (M.Z; Marginal zon, İ.Z; İntermediate zon, V+SubV.Z; Ventriküler + Subventriüler zon) 50
- Resim 20.** E15,5 günlük Beta katenin boyamasında, A'da kontrol grubu, B'de DMSO grubunu, C'de ise Porcupine inhibitör grubunu x25'lik büyütmede görüyoruz. (M.Z; Marginal zon, İ.Z; İntermediate zon, V+SubV.Z; Ventriküler + Subventriüler zon) 50

Resim 21. E15,5 günlük S100B boyamasında, A'da kontrol grubu, B'de DMSO grubunu, C'de ise Porcupine inhibitör grubunu x25'lik büyütmede görüyoruz. (M.Z; Marginal zon, İ.Z; İntermediate zon, V+SubV.Z; Ventriküler + Subventriüler zon)	50
Resim 22. E15,5 günlük LGR5 boyamasında, A'da kontrol grubu, B'de DMSO grubunu, C'de ise Porcupine inhibitör grubunu x25'lik büyütmede görüyoruz. (M.Z; Marginal zon, İ.Z; İntermediate zon, V+SubV.Z; Ventriküler + Subventriüler zon)	51
Resim 23. E17,5 günlük Beta katenin boyamasında, A'da kontrol grubu, B'de DMSO grubunu, C'de ise Porcupine inhibitör grubunu x25'lik büyütmede görüyoruz. (M.Z; Marginal zon, İ.Z; İntermediate zon, V+SubV.Z; Ventriküler + Subventriüler zon)	51
Resim 24. E17,5 günlük S100B boyamasında, A'da kontrol grubu, B'de DMSO grubunu, C'de ise Porcupine inhibitör grubunu x25'lik büyütmede görüyoruz. (M.Z; Marginal zon, İ.Z; İntermediate zon, V+SubV.Z; Ventriküler + Subventriüler zon)	51
Resim 25. E17,5 günlük LGR5 boyamasında, A'da kontrol grubu, B'de DMSO grubunu, C'de ise Porcupine inhibitör grubunu x25'lik büyütmede görüyoruz. (M.Z; Marginal zon, İ.Z; İntermediate zon, V+SubV.Z; Ventriküler + Subventriüler zon)	52
Resim 26. A'da E13,5 günlük kontrol grubu, B'de DMSO grubu, C'de ise Porcupine grubunu x4'lük büyütmede görmekteyiz.....	52
Resim 27. A'da E15,5 günlük kontrol grubu, B'de DMSO grubu, C'de ise Porcupine grubunu x4'lük büyütmede görmekteyiz.....	53
Resim 28. A'da E17,5 günlük kontrol grubu, B'de DMSO grubu, C'de ise Porcupine grubunu x4'lük büyütmede görmekteyiz.....	53
Resim 29. A'da E13,5 günlük kontrol grubu, B'de Porcupine grubunu Toluidine boyamasını x4'lük büyütmede görmekteyiz.....	53
Resim 30. A'da E15,5 günlük kontrol grubu, B'de Porcupine grubunu Toluidine boyamasını x4'lük büyütmede görmekteyiz.....	54
Resim 31. A'da E17,5 günlük kontrol grubu, B'de Porcupine grubunu Toluidine boyamasını x4'lük büyütmede görmekteyiz.....	54

TABLULAR DİZİNİ

Tablo 1. Beyine özgü S100 protein'in biyokimyasal özelliği ve hücre içi fonksiyonu.....	16
Tablo 2. Manuel doku takibi işlemi	34
Tablo 3. Parafini tamamen eriyen preparatın Hematoksilen-Eozin boyama prosedürü	35
Tablo 4. Toluidine blue boyama prosedürü	35
Tablo 5. İmmünohistokimya protokolü	36
Tablo 6. Kilo ve boy ölçüm sonuçlarındaki farklılıklar.....	38
Tablo 7. Beta-katenin skor sonuçları	40
Tablo 8. S100B skor sonuçları.....	41
Tablo 9. LGR5 skor sonuçları.....	42
Tablo 10. Beta-katenin skor sonuçları	43
Tablo 11. S100B skor sonuçları.....	44
Tablo 12. LGR5 skor sonuçları.....	44
Tablo 13. Beta-katenin skor sonuçları	45
Tablo 14. S100B skor sonuçları.....	46
Tablo 15. LGR5 skor sonuçları.....	47

ÖZET

PORCUPINE İNHİBİTÖRÜ UYGULANMASI SONRASINDA FETUS BEYİNLERİNDE SİNİR VE KÖK HÜCRE BELİRTEÇLERİNİN ARAŞTIRILMASI.

**YEŞİLYURT A.G. Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji
Embriyoloji Yüksek Lisans Tezi, 2019.**

Organ gelişiminde ve pek çok moleküler biyolojik olaylarda Wnt β -katenin sinyal yolağının etkisi bilinmektedir. Wnt sinyal yolağı, hedef genlerin transkripsiyonunda ve bir çok genin ekspresyonunda görev almaktadır. Bu sebep ile Wnt sinyal yolağının aktivasyonun veya inhibisyonunun beyin kök hücre belirteçlerinin üzerinde etkisinin olduğu düşünülmektedir.

Bu çalışma da, Wnt β -katenin sinyal yolağının fetal sinir ve beyin kök hücre belirteçleri açısından bir fark oluşturup oluşturmadığının tespit edilmesi amaçlandı. Bu amaç ile, üç gruptan oluşan bir deney dizaynı oluşturuldu. Bu gruplar; gebe kontrol grubu, gebe DMSO grubu ve porcupine inhibitörü uygulanan gebe grubudur. Fetal gelişimin 13.5, 15.5, 17.5 gününde anne karnından alınan fetusların ağırlıkları ve boyları değerlendirildi. 13.5, 15.5, 17.5 günlük fetusların beyin dokularında Wnt/ β -katenin sinyal yolağının inhibitörü olan LGK 974 (Porcupine inhibitörü) uygulanması sonrasında, β -katenin ifadesinin değişimine, S100B beyin belirteci, Lgr5 kök hücre belirteci proteinlerine, immünohistokimya ile ifade düzeylerine bakıldı. Böylece Wnt/ β -katenin sinyal yolağının embriyonik sinir ve beyin gelişiminde etkisi değerlendirildi. Ayrıca beyin dokularına Toluidin blue ve Hematoksilen-Eozin boyaması yapılarak morfolojik olarak değerlendirildi.

Yapılan deney sonuçlarına göre, Porcupine inhibitörü uygulanan fetüslerin ağırlıkları ve boylarında diğer gruplara oranla istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş saptanmıştır. İmmünohistokimya sonuçlarına göre; Porcupine inhibitör grubunda, Kontrol ve DMSO gruplarına oranla β -katenin, S100B, Lgr5 ifadesinde istatistiksel olarak anlamlı değişikliklere rastlanmadı. Hematoksilen-Eozin ve Toluidin Blue boyama ile morfolojileri tüm gruplar arasında olağan görülmüştür.

Bu sonuçlar doğrultusunda Wnt/ β -katenin sinyal yolağının embriyo gelişimi üzerine anlamlı etkileri olduğu bulunurken, bu yolak ile ilgili beyin gelişiminde rol alan gen ifade düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik gözlenmedi.

Anahtar Kelimeler: Wnt – β katenin, Porcupine, Lgr5, S100B, Beyin

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE NERVE AND STEM CELL MARKERS IN FETUS BRAINS AFTER THE ADMINISTRATION PORCUPINE INHIBITOR

**YEŞİLYURT A.G. Adnan Menderes University Institute of Health Sciences Histology
Embryology Master Thesis, 2019.**

The effect of Wnt signaling pathway in organ development and many molecular biological events is also known. The Wnt signaling pathway is involved in the transcription of the target genes and expression of many genes. Therefore, activation or inhibition of the Wnt signaling pathway is thought to have an effect on brain stem cell markers.

In this study, it was aimed to determine whether Wnt signaling pathway made a difference in terms of fetal nerve and brain stem cell markers.

For this purpose, an experimental design consisting of three groups was formed. These groups are; pregnant control group, pregnant DMSO group and porcupine inhibitor applied pregnant group. The weights and lengths of fetuses taken from the mother's abdomen at 13.5, 15.5, 17.5-days of fetal development were evaluated. Immunohistochemical expression levels of β -catenin, S100B, Lgr5 genes were evaluated in the brain tissues of 13.5, 15.5, 17.5-day fetuses after the administration of LGK 974 (Porcupine inhibitor) which is an inhibitor of Wnt / β -catenin signaling pathway. Thus, the effects of the Wnt / β -catenin signaling pathway on the embryonic nerve and brain development was evaluated. In addition, Toluidin blue and Hematoxylin-Eosin staining were performed to brain tissues and evaluated morphologically.

According to the results of the experiment, the weight and lengths of the fetuses, treated with Porcupine inhibitor, decreased statistically significant compared to the other groups. According to the results of immunohistochemistry; in the porcupine inhibitor group, there were no statistically significant changes in β -catenin, S100B, Lgr5 expression compared to the control and DMSO groups. Morphology of all groups was common for hematoxylin-eosin and Toluidine Blue staining.

According to these results, we found that Wnt / β -catenin signaling pathway had significant effects on embryo development, but we could not observe any statistically significant change in gene expression levels involved in this pathway.

Key words: Wnt – β catenin, Porcupine, Lgr5, S100B, Brain

1. GİRİŞ

Sinir dokusunun oluşturmuş olduğu sinir sistemi merkezi sinir sistemi (MSS) ve periferik sinir sistemi (PSS) olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Merkezi sinir sistemini beyin, beyincik ve omurilikten oluşmaktadır. Periferik sinir sistemi ise gangliyonlar, periferik sinirler ve sinir sonlanmalarından oluşmaktadır. Bu sistemin ana görevi organizmanın iç ve dışında oluşan mekanik ve kimyasal değişimlerin meydana getirmiş olduğu bilgileri almak, analiz etmek değerlendirmek ve de yanıtlamak olarak özetlenebilir. Sinir sistemi çok komplike bir sistem olması ile beraber embriyonik gelişimde en önemli oluşumlardan biridir. Bu merkezi sinir sistemini ve periferik sinir sistemini embriyonik dönemde etkileyen moleküler sinyal iletim yolları mevcuttur. Bu yollar sinir sisteminin fonksiyonel, kimyasal ve de mekanik olarak gelişiminde oldukça büyük öneme sahiptir. Organizmalarda hem embriyonik dönemde hem de ergin dönemde görev alan çeşitli sinyal yolları bulunmaktadır. Bu sinyal yollarından bir tanesi de Wnt sinyal yoludur. Bu sinyal mekanizması evrimsel olarakta bir hayli korunmuştur. Wnt sinyal yolu kanonikal ve non-kanonikal yol olarak iki mekanizma üzerinden işlemektedir. Bu iki mekanizma hücre polaritesinin sağlanmasında, ergin dönemde kendini yenileyen hücrelerin adezyonunda, hedef hücre genlerinin transkripsiyonun kontrol edilmesinde, embriyonik dönemdeki hücrelerin, polaritesinin ve proliferasyonun sağlanmasında, farklılaşmada ve de hücre göçünde önemli rollere sahiptir. Embriyonik gelişimde uzuvların oluşumunda, organ gelişiminde oldukça büyük bir role sahip olduğu bilinmektedir. Wnt yolağı santral sinir sistemi patolojilerinde ve nörodejenerasyonda son yıllarda araştırmaların yoğunlaştığı önemli sinyal iletilerinden biridir. Bu sinyal yolağının sorunsuzca çalışması embriyogenezde beyin gelişimini etkilemektedir. Sinyal yolağın da gerçekleşen herhangi bir inhibisyon sonucun da fetus'ta beyin gelişiminin dejenerasyonu görülmektedir. Wnt yolağının hedef gen transkripsiyonunu gerçekleştirilememesi veya aşırı ekspresyonu ergin dönemde ve embriyonik dönemdeki gelişmeleri etkilemektedir.

Literatür araştırmaları yaptığımızda ergin beyinin yapısı ve histolojisiyle ilgili pek çok bilgi olmakla birlikte, Wnt ile ilişkili embriyonik beyin gelişimi, morfolojisi, histolojisi, fonksiyonel değişimlerin incelenmesi ve moleküler yolların aydınlatılması ile ilgili çok fazla kaynak bulunmasına rağmen 'Porcupine inhibitörü uygulanması sonrasında fetus beyinlerinde sinir ve kök hücre belirteçlerinin araştırılması' ile ilgili literatürde yanıtlanmamış sorular bulunmaktadır.

Bu tez çalışması ile, Wnt/ β -katenin yolağı porcupine inhibitörü ile susturularak fare embriyolarının beyin gelişiminin morfolojik ve fonksiyonel olarak değişikliklerinin Wnt/ β -katenin bağımlı yolağı ile bağlantısının olup olmadığının araştırılması amaçlanmıştır.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Sinir Sisteminin Embriyonik Gelişimi

2.1.1. Gastrülasyon: Germ Tabakalarının Oluşumu

Gastrulasyon embriyonik dokuların kaynağı olan germ tabakalarının oluşma ve şekillenme sürecidir (Moore ve ark, 2016). Gelişimin üçüncü haftasında gerçekleşen en önemli olaylardan biri de bu germ yapraklarının (ektoderm, mezoderm ve endoderm) oluşmasıdır (Sadler, 2011). Gastrulasyon aslında morfogenezin (vücut şeklinin gelişimi) başlangıcıdır. Bu süreçte embriyo gastrula olarak isimlendirilebilir. Kemik morfogenetik proteinleri, Shh (sonic hedgehog) ve Wnt gibi ve diğer sinyal molekülleri germ tabakalarının oluşumunda önemli rol oynamaktadır (Moore ve ark, 2016). Ektoderm, mezoderm ve endoderm özel doku ve organları oluşturur. Embriyonik ektoderm; epidermis, merkezi ve periferik sinir sistemi, göz, iç kulak ve nöral krest hücrelerinin büyük bölümünün kaynağını oluşturmaktadır. Embriyonik endoderm; solunum yolları, sindirim kanalını döşeyen epiteli, sindirim kanalına açılan bezleri, karaciğer ve pankreas gibi organların glandüler hücrelerini oluşturmaktadır. Embriyonik mezodermden iskelet kasları, kan hücreleri ve damar tabakaları, tüm visseral düz kas tabakaları, serozal örtü (vücut boşlukları), üreme sistemleri, boşaltım sistemlerinin kanallarını, organlarını oluştururken kardiyovasküler sisteminde büyük bir kısmını oluşturur. Embriyonik mezoderm stromada dahil bütün bağ dokusu yapılarının kaynağını oluşturmaktadır (Moore ve ark, 2016).

2.1.2. Primitif Çizgi Ve Notokordun Oluşumu

Embriyonik gelişimin, üçüncü haftası başlangıcında embriyonik diskin dorsalinde, orta çizgi üzerinde ve kaudalde epiblastta çizgisel bir kalınlaşma gözlemlenir ve bu yapıya primitif çizgi denmektedir. Epiblast hücrelerinin artmasıyla ve de embriyonun orta kısmına göçü ile primitif çizgi oluşmaktadır. Primitif çizgi, kaudal kısmına hücrelerin gelmesiyle uzarken, kraniyel uçta hücre artışıyla primitif düğüm oluşmaktadır. Primitif çizgide dar bir primitif oluk oluşur. Primitif çukur, primitif olukta gerçekleşen çöküntü ile devam eder. Primitif çizgi belli olduktan sonra kaudal eksenini, kraniyal kaudal kısmı, dorsal ve ventral yüzü belirlemek mümkündür. (Moore ve ark, 2016).

Primitif çizgi belirginleştğinde, çizgideki hücreler ayrılarak kollajen (retiküler) lifleri içeren embriyonik bağ dokusu dediğimiz (mezenkimi) oluşturur. Mezenkim

embriyonik bağ dokusu embriyonun pek çok yapılarını oluşturmaktadır. Bir çok bağ dokusu çeşidini, embriyo için destek dokuları gibi çeşitli yapıları meydana getirmektedir. Mezenkim intraembriyonik dediğimiz ya da embriyonik mezodermi oluşturan farklılaşmamış mezodermi mezoblastı meydana getirmektedir. Primitif çizginin diğer bölümlerindeki epiblast hücreleri hipoblastın arasından girerek vitellüs kesesini meydana getirirken, yukarıdaki hücreler ise embriyonik endodermi oluşturur. Geriye kalan hücrelerde embriyonik ektodermi meydana getirmektedir (Moore ve ark, 2016).

Primitif çizgi ilk haftalarda hücre göçleri ve proliferasyonu ile mezodermi geliştirirken dördüncü haftada mezoderm gelişimi yavaşlar, primitif çizginin boyutunda küçülme ve önemsiz bir yapı haline gelmektedir (Moore ve ark, 2016).

2.1.2. Notokord oluşumu

Primitif çizgideki yayılan prenotokordal hücreler kranial yöne ilerler. Bu hücreler hipoblastın içine karışarak embriyonun iki hücreli tabakası olan notokordal plağı oluşturur. Hipoblast yerini endoderm hücrelerine bırakırken, notokordal plaktaki hücrelerde profile olmasıyla endoderm yapısından ayrılırlar. Ayrılan bu hücreler daha sonra, nöral tüpün alt tabakasını döşeyen, aksiyal iskeletin yapısını oluşturacak olan içi hücre ile dolu olan kordonu yani nihai notokordu meydana getirirler. Notokordun uzamasında ilk olarak kranial uçtan kaudale doğru yani primitif çukura doğru bir uzama gerçekleşir. Primitif çukurun, epiblasta yapmış olduğu girintiyle nöroenterik kanal kısmi zamanlı bir şekilde yolk kesesi ve de amniyon boşluğunu birbirine bağlamaktadır. (Sadler, 2011).

Genel olarak notokord oluşumunun embriyonik dönemde katkısına bakacak olursak; embriyoda primordiyal longitudinal eksenini belirleyerek embriyoya sertlik kazandırır. İskelet ve kas sisteminin oluşumunu sağlamasıyla merkezi sinir sistemi (MSS) oluşumunu sağlayan embriyonik sinyal yollarının oluşumunu sağlar. Son olarak da intervertebral diskin yapısına katılmaktadırlar (Moore ve ark, 2016).

2.1.3. Nörülasyon: Nöral Tüpün Oluşumu

Nöral plak ve nöral kıvrımı birleşerek nöral tüpü oluşturması yani nörülasyon sırasında gerçekleşmektedir. Bu olay zinciri dördüncü haftanın sonunda kaudalde nöroporun kapanmasıyla tamamlanır (Moore ve ark, 2016).

2.1.3.1. Nöral plak ve nöral tüp

Notokord gelişirken, üstündeki embriyonik ektodermi uyararak kalınlaşmasını ve uzamasını sağlayarak kalınlaşan epitelyal hücre plağı olan nöral plağı oluşturur. Bu nöral plağın ektoderminden sinir sistemi elemanları (MSS, beyin ve medulla spinalis) gelişir. Diğer bir önemli gelişme ise nöroektoderminden retina gelişmesidir. Nöral plak notokord ile uyumlu olup aynı hat boyunca uzanmaktadır. Notokordun orofarengiyal membrana kadar ilerlemesi ile nöral plak genişler ve bu yöne doğru, notokordun ötesine uzanmaktadır (Moore ve ark, 2016).

Nöral oluk yaklaşık 18. günde, nöral plağın merkez eksenini boyunca invajine olması ile oluşmaktadır. Nöral oluk oluşurken embriyonun kranial ucundaki nöral kıvrımlar daha kabarık gözükür bu da beyin gelişiminin ilk belirtisidir. Nöral kıvrımlar üçüncü haftanın sonunda birbirine yaklaşarak birleşirler ve nöral plak MSS ilk hali olan nöral tüpe dönüşmektedir. Ardından nöral tüp yüzey ektoderminden ayrılır (Moore ve ark, 2016).

Nöral tüpün sefalik ve kaudal uçları kaynaşma tamamlana kadar amniyon boşluğuyla sırasıyla kranial ve kaudal nöroporlar yoluyla ilişkilerini sürdürürler. Kranial nöropor yaklaşık yirmi beşinci günde (18-20 somit evresi), posterior nöroporda yirmi sekizinci günde (25 somit evresi) kapanmaktadır. Nöroporların kapanmasının ardından nörolasyon tamamlanır. Santral sinir sistemi, dar bir kaudal kısım, genişlemiş omuriliğin içinde beyin keseciklerinin bulunduğu geniş bir sefalik parçadan oluşup kapalı tübüler bir yapı ile temsil edilmektedir (Sadler, 2011).

2.2. Sinir Sistemi

2.2.1. Sinir Sisteminin Genel Özellikleri

Anatomik olarak sinir sistemini incelediğimizde: merkezi sinir sistemi (MSS; omurilik, beyin ve gözün sınırları ile ilgili kısımlar) ve periferik sinir sistemi (PSS; sinirler, periferik gangliyonlar, gangliyonları MSS 'ne bağlayan sinir uçları, vücudun efektör yapıları ve de reseptörler). Merkezi sinir sistemi ile periferik sinir sistemi birbirinden farklıdır. Bu farklılıklar fizyolojik ve morfolojik olarak farklı olması nörofarmakoloji alanında oldukça büyük bir öneme sahiptir. Genel hatlar ile bakacak olursak merkezi sinir sistemi; nöron ve gliya hücreleri gibi iki temel hücreden oluşmaktadır. Periferik sinir

sistemine baktığımızda daha farklı hücrelerden oluşmaktadır. Bunlar; satellit hücreleri ve Schwann hücreleridir. Bu hücreler merkezi sinir sistemindeki gliya hücrelerine eş değerdir (Kierszenbaum, 2006).

2.2.2. Sinir Sisteminin Gelişimi

Sinir dokuları embriyonal ektodermden gelişmektedir. Notokordun altında bulunan sinir dokuları embriyonel ektodermin farklılaşması ve büyümesi ile geliştikten sonra ilk olarak nöral plak şekillenir, bu plak kalınlaşarak nöral oluğu oluşturmaktadır. Oluğun kenarları büyüyerek birleşir böylelikle nöral tüp oluşarak ependim hücrelerini, glia hücrelerini, koroid pleksusun ve de nöronları kapsayan merkezi sinir sistemini oluşturur. Nöral oluğun yan kısmında bulunan nöral kristanın oluşumunu sağlayan hücreler toplu şekilde göç ederek başka yapılarının oluşumunun haricinde, çevresel sinir sisteminin büyük bir kısmını oluşturur. Nöral krestten köken alan yapılar; kromafin hücreleri (böbrek üstü bezi medullasında), deride bulunan ve deri altında yer alan melanositler, odontoblast, piamater, araknoid hücreler, kafa ve omurilik duyu gangliyonlarının duyu nöronları, sempatik ve parasempatik gangliyonların gangliyon sonrası nöronları, schwann hücreleri (çevresel sinir sistemi), satelite hücreleri (uydu hücreleri) (Junqueira ve Carneiro, 2003)

Nöral tüpün gelişim evresindeki duvarı, psödostratifiye silindirik epitelden ve üç kısma ayrılmıştır: ventriküler bölge; burdaki öncül hücreler (progenitör) sinir dokusunda bulunan çoğu hücreleri oluşturmakta (mikroglia hücresi hariç), intermediyet (ara bölge); burada yer alan nöronlar kortikal plağa göç ederek fazladan oluşmuş nöronları apoptoz ile ortadan kaldırırlar, kortikal plak; serebral korteksin gri cevherini oluşturmaktadır. Gelişimini tamamlamayan nöronlar ventrikül bölgeden, ara bölgeye göç ederek fonksiyonel nöronlara farklılaşırlar. Ara bölgede oluşan postmitotik nöronlar, kortikal mantonun dış tabakalarına gidip farklılaşmaya devam ederler. Burdaki amaç nöron çeşitliliği oluşturmak için ya farklılaşır ya da kendini ayıklamasıyla ölüme giderler. Olgunlaşmayan nöronlar olgunlaşıp aktif hale geldikten sonra germinal veya ventriküler hücrelerden gliyoblastları, gliyoblastlar ise ependimoblast, oligodendrositlere ve astrositlere farklılaşmaktadırlar (Kierszenbaum, 2006).

Merkezi sinir sistemindeki astrositler kan damarlarına temas eden uzantıları oluştururlar. Kan hücreleri ve damar gelişimine paralel olarak monositlerden mikroglia hücreleri gelişmektedir. Bu gelişen mikroglia hücreleri fagositoz, hasarlara karşı cevap

verme özelliği kazanmaktadır. Merkezi sinir sistemi ve periferik sinir sisteminde destek hücreleri ve nöronların yanı sıra çok fazla damar mevcuttur. Kan damarları, sinir dokusundan bazal lamina ve damarın çapına göre değişiklik gösteren bir bağ dokusu ile birbirinden ayrılmıştır. Merkezi sinir sisteminde sinir dokusu – kan damarları arasındaki sınır, diğer dokulardan geçebilen maddelerin geçişini engeller ve kandaki maddelerin merkezi sinir sistemine geçişini engelleyen bu yapıya kan – beyin bariyeri denmektedir (Kierszenbaum, 2006; Ross ve Pawlina, 2014)

2.2.3. Merkezi Sinir Sistemindeki Hücreler

2.2.3.1. Glia hücreleri

Glia hücrelerinin sayısı memeli beynindeki nöron sayısının on katından daha fazla bulunup nöronların aralarına girip yerleşerek sinir hücresinin gövdesini, akson ve dendrit uzantılarının etrafının sararak bir nöronun etkinliğini gerçekleştirme için gerekli mikroçevreyi sağlamaktadır (Junqueira ve Carneiro, 2003)

Glial hücreler sadece mekanik desteklik sağlamlarının haricinde sinir hücrelerinin iletişimsel işlevlerini yerine getirmeye yardımcı olmaktadır (Fawcett, 1994).

Merkezi sinir sistemine ait hücreler olan; oligodendrositler, astrositler, mikrogliyalardan olmak üzere 4 çeşit glial hücre (nöroglia) bulunur (Ross ve Pawlina, 2014)

2.2.3.2. Astrositler

Astrositler uzantılara sahip, yıldız benzer şekile sahip olan hücrelerdir. Merkezi sinir sistemindeki nöronlara pek çok açıdan (fiziksel ve metabolit) desteklik sağlamaktadır. Nöronları kılcal kan damarlarına ve pia mater'e bağlamaktadır (Junqueira ve Carneiro, 2003)

Astrositlerin bir diğer görevi de merkezi sinir sistemindeki iç denge (homeostazinin) sağlanmasında yer almaktadır (Fawcett, 1994). Destek görevinden hariç iyonik kimyasal ortamını da kontrol eder (Junqueira ve Carneiro, 2003)

Nöral aktivitenin sonucu olarak ekstraselüler boşlukta biriken (potasyum iyonları, α -aminobutirik asit (GABA), glutamat) bu maddeler astrositler yardımı ile temizlendiği

düşünlmektedir. Glial hücrelerin arasında en fazla bulunan hücre astrositlerdir. Astrositler de kendine özgü farklılık ve çeşit göstermektedir (Fawcett, 1994).

2.2.3.2.1. Protoplazmik astrositler

Çok fazla kısa şekilde dallanma gösteren uzantılara sahip ve beyinde gri cevherde çok fazla bulunan astrositlere denmektedir (Junqueira ve Carneiro, 2003).

2.2.3.2.2. Fibröz astrositler

Beynin beyaz cevherinde çok sayıda mevcutken, uzun, az sayıda düz uzantılara sahip astrositlere denir (Ross ve Pawlina, 2014).

2.2.3.3. Oligodentrositler

Merkezi sinir sisteminde miyelin kılıfın oluşmasını sağlayan hücrelerdir. Miyelin kılıf, oligodendrositin plazma membranının konsantrik tabakalarından oluşmaktadır. Merkezi sinir sistemindeki kılıf oluşumu, periferik sinir sistemindekinden daha karmaşıktır. Oligodendrositler, astrositlerle kıyaslandığında daha az uzantılı olup ve sıklıkla aksonların arasında yer almış küçük hücrelerdir. Oligodendrositin tek biri bile uzantıları bir aksonu ya da yakın çevredeki birkaç aksonu miyelinize edebilir (Junqueira ve Carneiro, 2006, Ross ve Pawlina, 2014).

2.2.3.4. Ependim Hücreleri

Omurilik orta kanalı (merkezi kanal (canalis centralis)ya da santral kanal) döşeyen altında bazal lamina olmayan prizmatik epitel hücrelerdir. Bu hücrelerin üst (apikal) yüzeyinde bulunan silya ve mikrovilluslar sayesinde serebrospinal sıvının emilimi ve hareketinden sorumludur. Ependim hücresi beyin ventriküler sistemi içindeki, komşu kapiller halkalarından kaynaklanan maddelerin taşınmasını ve de sekresyonunu yaparak serebrospinal sıvıyı üretmek üzere bir modifikasyona uğramıştır. Bu modifikasyona; ependim hücresi ve bu hücreler ile ilişkili kapillere koroid pleksus adı verilir (Junqueira ve Carneiro, 2006, Ross ve Pawlina, 2014).

2.2.3.5. Mikroglialar

Bu hücreler merkezi sinir sistemine dağılmış küçük hücrelerdir. Oligodendrositlerle çok büyük benzerliklere sahip olmasına rağmen oligodendrositlerden daha küçük ve daha koyu renkte gözükmektedir (Fawcett, 1994).

Yetişkinlerdeki merkezi sinir sistemindeki gliyal hücrelerin %5'ini oluşturan fagositik hücrelerdendir. Mikroglialar herhangi bir hasarda ya da hastalıkta o bölgeye giderek profile olup fagositik hale geçerler ve bu mikroglialara reaktif mikroglial hücreleri denir. Mononükleer fagositik sistemin üyesi olan mikroglialar, granulosit/monosit progenitör hücrelerinden (GMP)'den köken almaktadır (Ross ve Pawlina, 2014).

Erişkin vücudundaki merkezi sinir sisteminde onarım ve inflamasyondan görevlidir. Mikroglialar aktifleştiklerinde, makrofajların morfolojik şekline girerek, fagositik ve antijen sunan hücrelermiş gibi davranırlar. Sitokin salgılayarak, merkezi sinir sistemindeki hücresel atıkları uzaklaştırarak bağışıklığı düzenleyici etkiye sahiptirlerdir (Junqueira ve Carneiro, 2006).

2.2.4. Beyin Yapısı

Beyindeki beyaz cevher iç merkezi kısmı (medullayı) oluştururken, gri cevher dış katmanı (korteks) meydana getirmektedir. Beynin en dış kısmını (katman) oluşturan serebral korteks, sinir hücre gövdelerini, aksonları, dendritleri, sinapsların yapıldığı bölge ve merkezi gliyal hücreleri içermektedir. Serebral korteksin yanı sıra beyin ve beyinciğin derin kısımlarında bulunan gri cevher adacıklarına çekirdek (nukleus) denmektedir (Ross ve Pawlina, 2014).

Kortekste bulunan gri cevher, farklı boylara, şekillere sahip hücrelerden altı tabaka oluşturur ve beyin korteksinde bazı yerlerde bulunan getirici nöronlar (duyusal) uyarılara yönelik olup, başka bölgelerdeki motor uyarıları oluşturur. Beyinciğin korteksinde dış kısımda moleküler tabaka, ortada purkinje hücrelerinden oluşan bir tabaka, en iç kısımda granüler tabaka olmak üzere üç tabaka bulunmaktadır. Hücre gövdesi belirgin, dendritleri açılmış bir yelpaze görüntüsü gibi gözükür purkinje hücreleri, beyin yapısında gelişmiştir. Moleküler tabakanın çoğunluğunu dendritler işgal ettiğinden, bu yüzden moleküler tabakada çekirdekleri seyrek olarak görüyoruz. Granüler tabakada ise vücuttaki en küçük hücreli

nöronlardan oluşur, bu nöronlar hücre yoğunluğu bakımından daha az olan moleküler tabakanın tam tersine daha düzenli bir görünüme sahiptir (Junqueira ve Carneiro, 2003).

Beyaz cevher sadece sinir hücrelerinin aksonlarını, aksonlarla bağlantılı gliyal hücreler ve kan damarlarından oluşmaktadır. Bu aksonlar özgün bir bölgeden gelen ya da başka bir özgün bölgeye giden, fonksiyonel ilişkili demetler halinde gruplanarak traktus adını alır (Ross ve Pawlina, 2014).

2.3. Merkezi Sinir Sistemi Histolojisi

Omurga ve kafatası, merkezi sinir sistemini korumaktadır. Beyin ve omuriliği üç bağ dokusu sarmaktadır. Bunlar; dura mater, araknoid ve pia materdir. (Junqueira ve Carneiro, 2003, Ross ve Pawlina, 2014). Dura mater, araknoid, pia mater beyin meninksleridir (beyin zarları) (Junqueira ve Carneiro, 2003).

2.4. Beyin Gelişimi

Sırasıyla motor ve duyu alanlarını temsil eden bazal ve alar plaklar, orta hattın her iki tarafında yer almış rombensefalon ve mezensefalon da bulunur. Embriyo beyni 5.'nci haftada büyür ve baş kıvrımı ile ventrale doğru bükülürken iki önemli bükülme (fleksura) ortaya gelir; mezensefalon bölgesinde bulunan orta beyin fleksur ile medulla spinalis ve rombensefalonun geçiş yerlerinde bulunan servikal fleksur'u meydana getirir (Moore ve ark, 2016).

2.4.1 Rombensefalon: Arka beyin

Rombensefalon, beyin veziküllerin en kaudalinde bulunan myelensefalon ve pontin fleksurdan rombensefalik istmusa kadar uzanmakta olan metensefalondan oluşur. Myelensefalon, medulla oblongata'yı, metensefalon ise pons ve serebellumu oluştururken, rombensefalon'un boşluğu ise 4.'ncü ventrikül ve santral kanal halini almaktadır (Moore ve ark, 2016, Sadler, 2011).

2.4.2. Myelensefalon

Medulla oblongata'yı oluşturmaları ile birlikte spinal kord'tan lateral duvarlarının ters dönmesi (everte olması) ile ayrılır. Myelensefalon'un kaudal kısmı hem gelişmesi hem yapısal olarak medulla spinalis ile benzerlik gösterir. Nöral tüpte ki nöral kanal, küçük santral kanalı meydana getirir. Medulla spinalis'tekilerden farklı olarak, myelensefalon'daki alar plak'tan kökenlenen nöroblastlar marginal tabakaya göç ederek lateral kısımda nucleus cuneatus, medial kısımda nucleus gracilis denilen izole gri madde alanlarını meydana getirir. Myelensefalon'un rostral dedğimiz kısmı (medulla'nın açık bölümü) geniş ve oldukça yassıdır. Medulla duvarlarının laterale hareketi ile alar plak'lar bazal plakların dış tarafında yer alırlar. Plakların yerleşimleri değişirken, motor çekirdekler duysal çekirdeklerin iç kısmında gelişirler (Moore ve ark, 2016).

Myelensefalon'un tavan plağı, tek katlı bir ependimal hücre tabakası ve de bu tabakanın üstünü örten vasküler mezenkimden yani pia mater'den oluşur. Pia mater'in aktif çoğalması (proliferasyonu) ile alt taraftaki ventriküler boşluk içine doğru kesecik benzeri invajinasyon (içine girme) ile uzanır. Bu püskül benzeri invajinasyonlar, beyin omurilik sıvısını üreten koroid pleksus'u oluşturur (Sadler, 2011).

2.4.3. Metensefalon

Bazal ve alar plaklarla karakterize edilir aynı myelensefalon gibi. Fakat bu bölgede iki yeni bileşen bulunur: (i) bir postür ve hareket koordinasyonu merkezi görevi yapmakta olan serebellum ve (ii) spinal kord ile serebral ve serebrallar korteksler arasında uzanmakta olan sinir liflerine zemin oluşturan pons (Sadler, 2011).

2.4.4. Mezensefalon (Orta Beyin)

Mezensefalon arka beynin en kaudal kısmı hariç, en az değişime uğramış olan beyin bölgesidir. Nöral tüpün kapanması ile 3. Ve 4. Ventrikülleri birbirine bağlayan bir kanal olan aqueductus cerebri'yi oluşturmaktadır. Mezensefalonun alar plakları, ilk başta birbirinden yüzeysel bir orta hat çöküklüğü ile ayrılmış iki uzunlamasına yükselti şeklinde belirir. Gelişimin ilerleyen evrelerinde, bu yükselti transver bir oluk yardımı ile anterior ve posterior kollikuluslara bölünür. Posterior kollikuluslar işitme reflekslerinin sinaps yaptığı bir ara istasyon olarak görev yaparken, anterior kollikuluslar görsel uyarıların bir

refleks ve korelasyon merkezi olmasını sağlar. Kolikuluslar, üst katmandaki marjinal bölgeye göç eden nöroblast dalgaları tarafından oluşturulurlar ve burada çok katmanlı tabakalar şeklinde düzenlenir (Moore ve Persaude, 2016, Sadler, 2011).

2.4.5. Prosensefalon: Ön beyin

Rostal nöropor kapatıldığında ön beynin iki tarafının üst kısmında optik vezikül adı verilen her iki lateral bölgede bir doku büyümesi görülür. Optik sinirleri ve retina'yı, optik vezikül meydana getirir. Telensefalik vezikül adı verilen ikinci bir çift divertikül dorsal ve rostral olarak ortaya çıkar ve bunlar serebral hemisferler'e ve içlerindeki boşluklar ise lateral ventriküller'e dönüşür. Prosensefalon'un primordiyal serebral hemisferleri de içine alan rostral veya ön bölümü telensefalon, kaudal ve arka bölümüne ise diyensefalon denmektedir. Diyensefalon boşluğu ise 3.'üncü ventriküle dönüşür (Moore ve Persaude, 2016).

2.4.6. Diyensefalon: Tavan Plağı ve Epifiz

Prosensefalanon'nun orta kısmında gelişen diensefalon, bir tavan ve iki alar plağına sahip olmasına rağmen taban ve bazal plakları olmadığı düşünülmektedir. Orta hat belirleyicisi olan sonic hedgehog yolağının diensefalon tabanının da eksprese edilmesi ilgi çekicidir. Tek sıralı halde endodermal hücre tabaka diziliminden diensefalon'un tavan plağı oluşmaktadır.

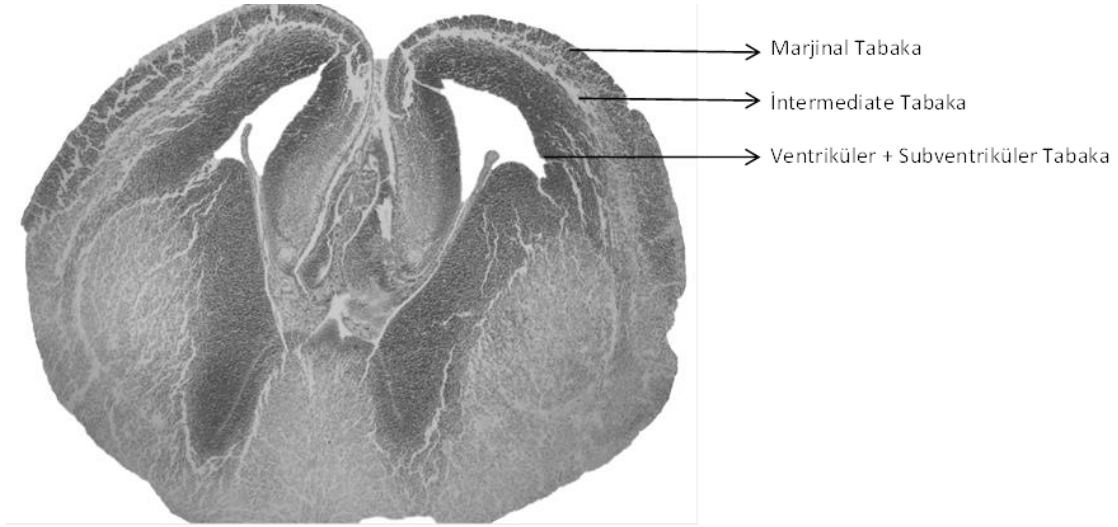
Prosensefalanon ve diensefalon katmanları, 3'ncü ventrikülün koroid pleksus'un oluşmasını sağlamaktadır. Tavan plağının kuyruk tarafı (kaudal) bölümünden pineal cisim veya epifiz gelişir (Sadler, 2011).

2.4.7. Telensefalon

Telensefalon denilen yapı, bir orta median bölüm ve serebral vezikül adı verilen iki lateral divertikülünden oluşmaktadır. Bu veziküller, serebral hemisferler'in ilk şekillerindedir. Telensefalon beyin veziküllerinin en rostralinde yer almaktadır. Hemisferin boşlukları yani lateral ventriküller, diensefalon'un lümenine foramen monro (interventriküler foramen) aracılığıyla bağlantı kurar (Moore ve Persaude, 2016, Sadler, 2011).

2.4.8. Beyin Gelişimindeki Tabakalar

- **Marjinal Tabaka:** Erken embriyonik dönemde özellikle kemirgenlerde bu tabakada mikrogliya hücrelerini ve gelişmekte olan akson demetlerini gördüğümüz bir tabakadır. Bu tabaka da mikrogliyal hücreler aksonların büyümesine yardımcı olurlar (Reemst K, . Noctor C S, Lucassen J.P, ve ark., 2016). Marjinal tabaka'nın bir diğer görevi kotirikal plakanın nöron göçlerinde ve de farklılaşmasında rol oynamaktadır. Marjinal tabaka primatlar ve insanlarınki haricindeki canlılarda belli bariz bir şekilde ayırt edilemez. İnsanlardaki ve primatlardaki marjinal tabakada ayırt edici morfolojik özelliklere rastlanır. Doğum öncesi beyinde en karmaşık organize olan tabakadır (Tkachenko LA, Zykin PA, ve ark, 2016).
- **Intermediate (Orta) Tabaka:** Bu tabakada nöronal göçün yoğun bir şekilde gerçekleştiği bir tabakadır (Kolasinski J, Takahashi E, ve ark., 2013). Bu orta tabaka da bazal gangliyonlar, uyarıcı nöranlar, duyuşal sinirlerinde bulunduğu bir tabakadır (Vasung L, Raguz M, Kostovic I, ve ark., 2017). Daha çok genç nöronların bulunduğu bir bölgedir (Montiel JF, Vasistha NA, ve ark., 2016).
- **Ventriküler + Subventriküler Tabaka:** Multipotent sinir kök hücrelerinin çoğalması, nöron ve gliyal hücrelerin meydana gelmesiyle bu tabakalar boyunca uzanarak oluşmaktadır (Rushing G, Ihrle RA., 2016). Nöroepitelyal hücrelerine sahip olduğu, nörogenezin ventriküler tabakaya yakın olduğu yerlerde başlaması ve bu bölgede yetişkinlere oranla embriyonik dönemdeki gen ekspresyonuna göre daha fazladır. Ventriküler tabakada hücrelerin birbirleri ile sıkı bağlanmışlardır. Subventriküler zonda ise sinüzoid kan damarları bulunur (Whish S, Dziegielewska KM, ve ark., 2015). Nörogenez memeli beyinde yetişkin subventriküler bölgede devam etmektedir. Subventriküler zon nöral kök hücre kaynaklarındandır (Capilla-Gonzalez V, Cebrian-Silla A, ve ark., 2014).



Resim 1. Beyin tabakalarının şematik gösterimi

2.5. Sinir Sistemindeki Belirteçler

Beyine özgü proteinler hücre içi ve dışı fonksiyonları nedeni ile travma, enfeksiyon ve hasar kaynaklı pek çok nöropatolojide sinir sistemindeki belirteç olarak kullanılmaktadır. Sinir sisteminde ki bu belirteçler risk tayininde, hastalık sürecinde ve tedavi hedeflerinin belirlenmesinde önemli bir yer tutmaktadır (Regan C.M., 1988).

2.5.1. Beyinde Sinir ve Kök Hücre Belirteçleri

14-3-3 Protein Ailesi, 14-3-2. Protein Ailesi, Büyüme ile ilişkili protein (GAP-43), Glial fibriler asidik protein (GFAP), N-asetil-L-aspartat (NAA), Miyelin bazık proteini (MBP), S100B proteini, Lgr5 gibi beyindeki sinir ve kök hücre belirteçlerinden en önemlilerindendir (Portakal O, Deren Ö., 2010).

2.5.1.2. S100 proteinleri

Küçük ve asidik proteinlerden meydana gelmektedir. S100B proteini omurgalı canlılarda kalsiyum bağlayıcı protein ailesine aittir (Donato R., 2001). Tahmin edilen en az 25 üyesi mevcuttur bunlar; S100A1-A18, profilagrin, trikohiyalin, repetin, S100P, Z, B ve G gibi çeşitlidir. Bu protein ailesi %25-65 oranında aminoasit dizileri bakımından benzerlik gösterir (Donato R., 2003).

Genellikle homodimerik yapı oluşturup ve dimerizasyon biyolojik aktiviteleri için önemlidir fakat bu S100 protein ailesinde buna uymayan tek S100G proteindir. S100 protein ailesi hücre büyüüp farklılaşmasında, hücre döngüsü aktifliğinde, transkripsiyon faktörlerinde, sinyal iletimi ve kalsiyumun hücre içi düzenlenmesinde rol almaktadırlar. Hücreler arası aktivasyonda nöronların, mikrogliaların, astrositlerin, enfektif hücrelerin, epitel ve endotel hücreleri üzerinde yoğunluğa bağlı olarak toksik etkileri vardır. Genellikle çoğu kalsiyum bağımlıdır, bu yüzden de biyolojik aktiviteleri için hücre içi yüksek kalsiyum yoğunluğu gerekmektedir (Donato R., 2001, Heizmann C., 2002).

S100B proteini en fazla beyinde astrositler tarafından eksprese edilmektedir. Yapı olarak homodimerdir ve hücre içinde konumlanır. S100B kalsiyum bağımlı etki göstererek kalsiyum bağlandıktan sonra konformasyon değişikliklere uğrayarak ve hedef proteinlere gidip etkileşim haline geçmektedir. Hücrelerin zarları ve iskelet elemanları ile ilişkisi bilinip; tip III ara filamentlerin ve mikrotübül gibi iskelet elemanlarının bir arada toplanmasında görev alır. Başka görevlerine bakıldığında enzim aktivitelerinde ve hücrelerin çoğalmasında ve de bunların düzenlenmesinde görev yapmaktadır (Heizmann C., 2002, Donato R. Ve ark., 2009).

S100B'yi hücreler arası yerlerde düşük konsantrasyonda, nöron büyümesi ve astrosit proliferasyonunu uyarır. Bu yapıcı etkisi bazı sinyal yollarının ileri glikozilasyonu yardımı ile nükleer translokasyonu üzerinden gerçekleşir. Fakat yüksek konsantrasyonlarda S100B, nöron ve astrositlerin apoptoz hücre ölümüne sebebiyet vermektedir (Donato R., 2003, Donato R, ve ark., 2009, Huttunen, HJ ve ark. 2000).

Tümör baskılayıcı bir protein olan p53, S100B 'nin p53 protein fonksiyonlarını inhibe ederek mitojenik kinazların aktifliğini artırarak hücre çoğalmasında ve de farklılaşmasında oldukça büyük bir rol oynar. Diğer başka rollerine baktığımızda sinaptik düzenlemeler, öğrenme yetisi ve bellek oluşumunda etkin olduğu bildirilmiştir (Donato R., 2001, Heizmann C., 2002 ve Donato R., 2003).

Tablo 1. Beyine özgü S100 protein'in biyokimyasal özelliği ve hücre içi fonksiyonu

Protein/aminoasit	Lokalizasyonu	Fonksiyonu ve İşlevi
S100B	Astrosit, Schwann hücreleri, hücre içi sinyal iletimi Melanosit, Adiposit, Plasenta hücreleri	Hücreler arası iletişim, hücre büyümesi,

Kaynak: Portakal O., Deren Ö., Beyine özgü proteinler ve tanıda kullanımları, *Hacettepe Tıp Dergisi*, 2010; 41:135-141, 136

2.5.2. Beyine Özgü Proteinlerin Prenatal Dönemdeki Önemi

Prenatal ve perinatal dönemdeki nörolojik anomalilerin çoğu çocukluk döneminde ki gelişmesinden kaynaklanmaktadır. Bazı rahatsızlar örneğin; gebelik esnasında ortaya çıkan diyabet, gebeliğe bağlı yüksek tansiyon, beyin hasarını tetikleyen risk faktörlerindedir. S100B belirtecini vazgeçilmez kılan en önemli özelliği beyin hasarını ortaya koymada oldukça önemlidir (Nagdyman N, 2001).

2.6. Embriyonik Farede Merkezi Sinir Sistemi ve Beyin Gelişimi

Farede merkezi sinir sisteminin gelişimi ektoderm'den gelişmektedir. Embriyonel 7. günde embriyonun dorsalinde ektoderm üzerinde bir kabarıklık ya da çıkıntı oluşur. Bu kabarıntı nöral plak isimlendirilir, zamanla gelişerek merkezi sinir sistemini oluşturur (Gilbert SF., 2000). Embriyonun orta bölümündeki epiblast hücrelerinin çoğalması ve göçünün ardından nöral plak belirgin hale gelir. Bu dönem primitif çizginin görüldüğü dönemdir. Çizginin kaudal ucuna hücre eklenmesi ile boyu uzar. Kranial uçtaki hücreler de çoğalarak primitif düğüm denen kabarıklığı oluşturur. Primitif çizginin orta bölümünde primitif oluk ve primitif çukur oluşur. Primitif çukurdan baş yönünde ilerleyen bazı mezenkimal hücreler, notokordal uzantı denilen orta hatta ilerleyen hücresel bir kordonu yapmaktadır. Daha sonra bu uzantının ortasında notokordal kanal adı verilen lümen ortaya çıkar. Böylelikle notokordal uzantı endoderm ve ektoderm arasında ilerler (Alberts B, ve ark., 2002).

Nörülasyon (nöral tüp gelişimi) embriyonel gelişimin önemli bir parçasıdır. Notokord baş yönünde büyürken NESTİN-NES, Vimentin-VİM genleri ve Wntless- type MMTV integration site family –Wnt gen ailesinde yer alan genlerin uyarısı ile ektodermi indükler, nöral plak, nöral oluk ve nöral katlantıları oluşturur. Bunların birleşmesi ile nöral tüpü ortaya çıkarırlar (Copp AJ ve ark., 2010). Nöral plak dorsal yüzey ektoderminin

kalınlaşır orta hatta katlanması ile devam eder. Yüzey ektodermi epidermise dönüşür. Memelilerde füzyon yukarıya (hindbrain-ardbeyin) ve aşağıya (spinal bölge) doğru olur. Bu katlanma sonucunda primer nörolasyon tamamlanır. Alt sakral ve kaudal bölgelerde omuriliğin (spinal kord) kapanması ile sekonder nörolasyon tamamlanır. Kaudal uçta olan tomurcuklanmada farklı yapıda bir multipotensiyel hücre subpopülasyonu ortaya çıkar ve lateral sklerotomal hücrelerin etrafında sakral ve koksigeal vertebra oluşumu için organize olmaktadır. Nöral tüp gelişimi tüm memeliler için benzer mekanizma ile olmaktadır. Evrimde korunmuş bu olayda bu nedenle farklı canlılarda etkilenen yollar ve etkilenen genlerin ortak olduğu düşünülmektedir (Detrait ER ve ark.2005).

Farede 8'nci embriyonik günde ilk somitler oluşur. Nöral kapanma 4'ncü ve 5'nci somitler hizasından itibaren başlamaktadır. Sekizinci günün sonunda anterior nöroporun kapanması tamamlanır. Dokuzuncu günde posterior nöropor kapanır. Ön beyin vezikülleri telesefalon ve diensefalon bölümlerine ayrılır. Dokuzuncu günde beyin de kranial motorlu çekirdekler ve tepe nöronlarda oluşmaya başlar. Embriyonik 10'ncu günde omurilik oluşmaya başlar. 10'cu ve 10, 5'ncu günde plaka yapısı nöron, alt oliver çekirdek, retina ganglion hücre üretimi - nöron başlangıcı, yüzeysel üstün kollikulus (SC) nöron laminae-başlangıç, dorsal lateral genikulat çekirdeği (dLGN) - nöron başlangıç, purkinje hücreleri oluşmaya başlar. 11'nci günde beyin gelişimi hızlanır (UNSW embryology, 2017, Finlay BL1, Darlington RB, 1995 ve Robinson SR ve Dreher B, 1990).

13,5 günlük fare embriyosunda nöron tepe - karmaşık rafe, koku çekirdeği ön - nöron zirve, anteroventral (AV), anterodorsal (AD) ve anteromedial (AM) talamik çekirdekler - nöron zirve, Pons çekirdekleri - nöron zirve, parasubiculum - nöron zirve, stria terminalis, presubiculum - nöron zirve oluşur ve görünür (Finlay ve Darlington, 1995 ve Ashwell K.W, Bobryshev Y.2002).

15. ve 15,5 gün de gelişen olayalar, nöron kortikal lamina IV - nöron başlar (VC), CA 1, CA 2 hipokampus - nöron zirve, retina amacrine hücreleri - nöron zirve, hipokampal commissure görünür. Nörogenez kortikal tabaka II / III - nöron zirve (VC) 15,5 günde ise optik aksonlar görsel merkezleri istilasını gerçekleştirir (Caviness VS. 2002, Finlay ve Darlington, 1995 ve Ashwell K.W, Bobryshev Y. 2002).

17. ve 17,5 günlerde; nörogenez kortikal tabaka IV - nöron zirve (VC), korpus kallosum görünür. Nörogenez kortikal tabaka IV - nöron ucu (VC) meydana gelir. 15.'nci

gün ve 17.'nci gün aralığının da korteksin büyük bir çoğunluğu tamamlanır (Caviness VS. 2002, Ashwell K.W, Bobryshev Y.2002 ve Bayer S.A., Altman J. 2007).

Fare beyni gelişimi evrelerinde iki farklı hücre yapılanması ön plana çıkar. Nöronal gelişimde nöronal kök hücreler, beyin destek dokusunu oluşturan glial yapılanmada glial kök hücreler oldukça yoğun bir aktifliğe sahiptir. Bu kök hücreler öncül formunu alır. Sonra erişkin nöron ve glial yapılara dönerler. Beyin dokusunun meydana gelme sürecinde farklı yerlerden aynı zaman diliminde başlayan hücrelerin farklılaşması ve de bu hücrelerin birbirleriyle olan düzeni ve de ilişkilerinden dolayı, sayesinde uyumlu bir şekilde gerçekleşir. Buna ek olarak beyin dokusunun meydana gelme sürecini, hücrelerin ilişkilerini ve düzenini hücreler arası veya içindeki sinyal yollarının tetiklemesi ile gelişmektedir. Hox gen ailesi embriyonal gelişimde vücuttaki bölümlerin oluşup, gelişmesi sürecinde aktif bir şekilde yer almaktadır. Bu oluşumlara göre organ yerleşkeleri oluşmaktadır. Beyin gelişimini yönlendirilmesinde ve bu yönlendirmeye bağlı olarak gelişimin düzenlenmesinde Wnt, Hedgehog ve de Notch gibi yollar bu düzenlemeyi ayarlamaktadır. Embriyonik gelişim sürecinde çok miktarda nöron ve glia oluşur. Beyin erişkin döneme gelirken dengeli bir programlanmış hücre ölümü (apoptoz) kaskadı ile yeniden şekillenme gerçekleşir. Erişkin beyinde embriyolojik aşamada var olan hücrelerin hemen hemen yarısı kaybedilir. Gelişen beyin hücreleri farklılaşırken, özelleşmiş görevlerini yerine getirebilmek için diğer hücrelerle doğru bağlantıları yapabilecekleri bölgelere göç ederler (UNSW embryology, 2017, Choudhry Z ve ark. 2014, Jackson FR ve ark. 2015).

Farelerde beyin üç parçadan oluşur; ön beyin (telensefalon, diensefalon), orta beyin (mezensefalon) ve arka beyin (metensefalon, myelensefalon). Ön beyni oluşturan telensefalon bölümünden serebral korteks, beyaz cevher ve bazal gangliyonlar; diensefalondan ise talamus, hipotalamus ve epitalamus farklanır. Orta beyni oluşturan mezensefalondan beyin sapının bir kısmı gelişir. Arka beyni oluşturan metensefalon pons ve beyinciğe; myelensefalon medulla oblongataya farklanır (Tamamki N1, Nakamura K ve ark.2001).

Embriyonal gelişim aşamasında ön-arka ve ventral-dorsal aksın, vücutta segmental yapılanmanın oluşması organ yerleşimleri için çok önemlidir. HOX gen ailesinin bu olay zincirinde aktif rolü vardır. Bu genlerin ürünleri nöral tüpün gelişimine katılır (Bel- Vialar S ve ark. 2002, Deutsch JS, 2010).

Sinir sisteminde intermediate filament olarak nöroflamentler, alfa-interneksin, glial fibrik asidik protein (GFAP), sinemin, nestin, periferin ve vimentin sayılabilir. Nestin sitoplazmik proteinlerden biridir. Bu protein nöroepitelyal kök hücrelerden sentezlenir. Kök hücre devamlılığını sağlamaktadır. NESTİN gen ekspresyonu olduğu sürece nöral hücreler farklılaşmamaktadır (Duggal N ve ark., 1997, Park D, Xiang AP ve ark., 2010).

Beynin gelişimi için vazgeçilmez olan bazı sinyal mekanizmaları vardır bunlar; Hedgehog, Notch ve Wnt'dir. Hedgehog sinyalinin en önemli görevlerinden biri de gelişim için gerekli olana bilgileri düzgün bir şekilde taşıyıp aktarmaktır (Bramanti V1, Tomassoni D ve ark. 2010, Gilbert SF, 2000). Sonic – Hedgehog- SHH geni embriyoda ventral nöral tüp, anterior- posterior uzuv aksı ve ventral somitlerin oluşumunda önemli bir etkidir (Ingham P. W, ve McMahon AP., 2001, Caviness VS Jr ve ark., 2009).

SHH ve BMP (bone morfogenetik protein) gen ailesi, yapılan çalışmalarda dorsal beyin yapılarında nöral öncül hücrelerin çoğalımında, embriyonik ve erişkin durumda bulunan kök hücre yerlerinin sayısını düzenleyip derlemede etkilidirler (Ruiz i Altaba A ve ark. 2002, ve Stecca B, 2005).

Notch sinyal hücrenin kaderinin belirlenmesinde, hücrenin farklılaşmasında, proliferasyonunda, hücre göçünde (migrasyonunda), adezyon, epitelyal – mezenkimal geçişte, programlanmış hücre ölümünde (apoptoziste) ve anjiyogenez de rol alır. Bu yolak nörogenez sırasın da proliferatif sinyalleri aktivite etmektedir. Notch sinyal yolağı nöral progenitör hücrelerin onarımı, kendini yenileme için büyük bir öneme sahiptir. Ayrıca bu yolak glial hücre özelleşmesi, nörit (nöron gövdesinden çıkan uzantılar) gelişimi ve öğrenme – bellek gibi başka fonksiyonları da vardır (Bolos V ve ark.2007, Zhong W, Jiang MM ve ark. 1997, Redmond L. 2000).

Wnt sinyal yolağında hücrenin devamlılığı, hücre hareketlerinde ve apoptozis da etkilidir. Wnt yolağı orta beyin gelişiminde ve art beyin gelişimini düzenlemektir (Andoniadou CL., Martinez – Barbera JP., 2013, Partanen J. 2007).

2.7. Wnt Sinyal İletimi

Wnt adını verilen gen, bir farenin memesindeki tümörde 'int-1 (1st common integransite)'adında klonlanılmış ve de bu isim verilmiştir (Nusse R, Varmus HE, 1982).

Ardından yapılan araştırmalarda *Drosophila* meyve sineği olarakta adlandırılan melanogaster deney hayvanında in-1 dediğimiz gene, dizisel olarak ve fonksiyonel olarak benzediğini bunada ‘wingless’ ismi verilmiştir (Sharma RP, Chopra VL, 1976). Bu benzerlikten dolayı bu gen isimleri birleştirilip günümüzde adlandırdığımız ‘Wnt geni’ olarak geçmiştir (Nusse ve Varmus 1992, Nusse R 2005, Nusse R, Brown A, ve ark, 1991). Günümüzden bugüne kadar gelmiş ve insanda tanımlanmış yaklaşık 19 adet Wnt geni bulunmaktadır. Bu gen’in sistein’ce zengin bölgeler içermesi reseptörlere bağlanmaya yardımcı olurken, ekstraselüler alana salınımı ve sinyal’in uyarılmasını sağlaması yapısında olan glikoprotein dolayı gerçekleşmektedir. Bu genler evrimsel açıdan oldukça korunmuştur. rnek vermek gerekirse insanda bulunan Wnt1 geni tarafından kodlanan proteinin, farelerde %98 oranında aminoasit benzerliği gösterdiği anlaşılmıştır (Nusse R., 2005, Miller JR. 2002). Bu protein, pek çok canlılarda bulunması ve embriyonik gelişimi kontrol etmesi buna ek olarak sisteinden oldukça bol içeren glikoliz ligandlarından oluşmaktadırlar. Wnt protein ailesi hücrenel bazda hücre proliferasyonu, dışsal yapı ve hareket etme yeteneği gibi hayatsal fonksiyonlarının düzenlenmesinde derlenemsinde ki rolü önemlidir. Son yıllarda insanlığın büyük problemi olan tümör oluşumunda rol aldıkları da gösterilmiştir (Cong F. ve ark. 2004).

Wnt’in polipeptid zincir oluşumu esnasında, N terminal ucunda bulunan suyu sevmeyen sinyal dizileri ile endoplazmik retikulum (ER)’a doğru son şeklini almak için yönelir. Son şeklini almaya gelmiş olan Wnt, endoplazmik retikuluma gelip lipid ve glikozilasyon modifikasyonları geçirerek sinyal iletiminde rol alacak şekilde son haline sahip olur (Coudreuse D.ve Korswagen HC. 2007, Hausmann G. ve ark. 2007).

İkincil bir modifikasyon ise, Endoplazmik retikulum hücre membranında bulunan ve Porcupine [membran-bound Oaciltransferaz family (MBOAT)] adlandırılmış transmembran proteini yönetimi eşliğinde, Wnt yapısında bulunup evrimsel sretede korunup günümüze kadar gelen sistein rezidülerine, palmitat adlı yağ grubunun bu modifikasyona eklenmesidir. Palmitat adlı yağ grubu bu diziye eklendikten sonra suyu seven yapıdaki Wnt, suyu sevmeyen özellik kazanır (Nusse R. ve Varmus H.E, 1992, Coudreuse D. ve Korswagen HC., 2007, He X. ve Axelrod D.J.A., 2006).

Başka araştırmacılar da yağ modifikasyonu geçiren Wnt’in burada hidrofobik özelliğini farklı şekilde ele alıp açıklamışlardır. Coudreuse ve Korswagen (2007), araştırmalarında Wnt’nin suyu sevmicek şekilde modifikasyon geçirmesi, sentezlenmiş

olduğu hücre içinde gideceği organeller arasında özellikle endoplazmik retikulumdan- golgi aygıtına, golgi aygıtından da sitoplazmaya hedef gideceği yeri belirlemede önemli olduğunu ele almışlardır. Buna ek olarak geçirilen bu modifikasyonların Wnt sinyalinin potansiyel olarak artış gösterdiğini ileri sürmüşlerdir (Coudreuse D. ve Korswagen HC. 2007).

Başka bir araştırmacının yapmış olduğu çalışmada Willert V.D.(2003) ise bu modifikasyonlarda palmitat grubuna eklenmiş olan sistein grubunda oluşabilecek herhangi bir mutasyon halinde bu sinyal yolunun fonksiyonelliğini kaybettiğini göstermişlerdir (Willert K., Brown J.D ve ark., 2003).

Komekado vd'nin (2007) yaptıkları çalışmada Wnt'teki bu iki önemli modifikasyon arasındaki birlikteliği yaptıkları araştırmada glikozilasyon, lipid değişkesinin (modifikasyonun'un) açısından oldukça büyük bir öneme sahip olduğunu fakat lipid modifikasyonun'un glikozilasyonda herhangi bir etkisinin olmadığını bildirmişlerdir.

Coudreuse D. ve Korswagen H.C. (2007) fikirlerine bakıldığında Wnt proteini, Endoplazmik retikulum membranındaki "Porcupine" transmembran proteinine bağlanıp burada Wnt'nin konformasyonel bir değişiklik geçirdiği ve bu değişiklik ile Wnt'in şeker eklenmiş olan merkezlerini ortaya çıkarmakta, böylelikle OST'nin (oligosakkaril-transferaz Kompleks) glikozilasyon modifikasyonunu daha doğru kusursuzca yapmasına olanak sağladığını göstermişlerdir. Bütün yapılan çalışmalara ve görüşlere rağmen Wnt'in salgılanması ve aktivitesindeki görev aldığı düşünülen bu modifikasyonlar ile ilgili tam bir kesinlik konulamamıştır (Komekado H., Yamamoto H., ve ark. 2007).

Endoplazmik retikulum Wnt için oldukça büyük öneme sahip olan bir organeldir. Çünkü bu organelin boşluğunda BİP (immunoglobulin heavy-chain-binding protein) adı verilen 'heat-shock (Hsp70)' protein ailesine ait olup ER 'de bulunur. Bu proteinin Wnt için rolüne bakıldığında Wnt proteini ile endoplazmik retikulumun boşluğunda (lümeninde) birleşip katlanmayı ve de Wnt'in üç boyutlu bir hal kazanmasında rolü bulunmaktadır. (Nusse, R., Varmus, H.E 1992, Kitajewski J., 1992). Son haline gelmiş iş görebilecek hale gelen Wnt proteini, endoplazmik retikulumun transfer vezikülleri tomurcuklanarak meydana getirdiği bu vezikül Wnt'i sitozole oradan da golgi aygıtına taşınmasına yardımcı olur. Golgiden salınmak isteyen Wnt proteini ihtiyaç halindeki mekanizması, uzaktaki hedefte olan hücre ya da yakınlardaki hedef hücre olmak üzere iki çeşit etkileme yolu bularak

salgılanmaya başlar (Nusse, R., Varmus, H.E 1992, Codreuse D. ve Korswagen H.C 2007, Kitajewski J., 1992).

İki çeşit Wnt sinyal mekanizması tanımlanış bu da kendi içinde üç farklı yolu bulunur ve bunlar canlılarda erişkin ve de embriyonik dönemde yaşamsal aktivitelerde oldukça önemli role sahiptir (van Amerongen R, Nusse R., 2009).

Wnt'in iki çeşit sinyalinden kanonikal olmayan yola bakıldığında, embriyonik süreçte hücre iskelet elemanlarının düzenlenip derlenmesinde haliyle hücre içi polaritesinin sağlandığı bu kanonikal olmayan yola “Hücre polaritesinin sağlanmasında görev alan sinyal yolu [The Planar Cell Polarity pathway, (PCP pathway)]” denmektedir (Veeman MT, ve ark. 2003).

Diğer kanonikal olmayan yola bakıldığında ise kalsiyum (Ca^{+2}) aktivitesinde rol alan canlılık moleküllerini uyarı vermesi ile hücre içindeki Ca^{+2} oranını yükseltip, düşüren bu sinyal yoluna ise “Wnt/ Ca^{+2} sinyal yolu” denmektedir. (Kühl M, ve ark.2000). Araştırmacılar bu iki yolu birlikte ele alarak (non-canonical pathway, kanonikal olmayan yol)” ya da “ β -katenin bağımsız sinyal yolu” olarak da isimlendirmişlerdir (Kikuchi A, Yamamoto H., 2008, van Amerongen R, Nusse R., 2009).

Bir diğer Wnt sinyal yolu ise “Wnt/ β katenin sinyal yol ya da kanonikal yol” olarak bilgilerde yer almaktadır. Bu yol gerek işleyişinin daha çok bilinmesi ve de tümör oluşumlarında rastlanması, pek çok ciddi hastalıklar ile olan ilişkisinden kaynaklı en sık araştırılan sinyal yoludur (van Amerongen R, Nusse R., 2009, Lustig B, Behrens J., 2003, Donma MM, Donma O., 2010). Kanonikal yolun ilk bulunduğu zamanlarda hücre döngüsünün düzenlenmesi, hücre çoğalması ve farklılaşmasında, hücrelerin birbirleri ile arasındaki bağlantılarda önemli görevler üstlenildiği konulmuştur (Kaldis P, Pagano M., 2009, Yamada S. ve ark.2005).

Son zamanlarda ise yapılan araştırmalarda dikkat çekilmesindeki en büyük etmenler biyolojik olayların oluşumu ve gelişiminde etkili olduğu örneğin; sinaps oluşumlarında, damar oluşumunda, adipogenezde önemli hadiselerde yer aldığı saptanmıştır. Bu mekanizmanın işleyişi; hücre membranında, sitoplazmada ve de çekirdek gibi üç farklı bölgelerinde gerçekleşir (Lustig B, Behrens J., 2003, Yamada S. ve ark.2005, Hu J. ve ark, 2009).

2.7.1. Wnt/ β -Katenin Bağımlı (Kanonik/Klasik) Sinyal Yolağı

Wnt sentezlenip ekzositozla interselüler boşluklara verilip ardından, hedefteki hücre membranına ulaşması ile membranda mevcut olarak bulunan reseptörlere bunlar; Frizzled (Fz) ve LRP5/6 (Low-density lipoprotein receptor-related protein) bağlanmasının ardından ilk iletişim başlar. Frizzled transmembran proteini olup G protein ailesine mensup bir proteindir. Membranda hücre dışına ve hücre içine ortalımsı bir şekilde bulunan Fz proteini, dış kısma bakan yerde 10 çeşit sisteinden çok olan [cystein-rich domain (CRD)] rezidusuna sahiptir. Wnt proteini sistein rezidülerin hakim olduğu uç kısmı ile hedef hücreye geldiğinde Fz'ın memembran dışındaki CRD bölgesine uygun bir şekilde bağlanıp, diğer ucu ile gene membran proteini olan LRP5/6' ya uygun şekilde bağlanmaya başlar. LRP5/6 transmembran proteini Fz ko-reseptörüdür aslında. Wnt, Fz, LRP5/6 bu üçlü yapının birleşmesi ile Wnt-beta katenin sinyal yolunun başlaması için bağlantı kurulup sinyali başlatırlar (Cadigan KM, Liu YI., 2006, Chen X ve ark.2008, Mikels, A.J, Nusse, R., 2006).

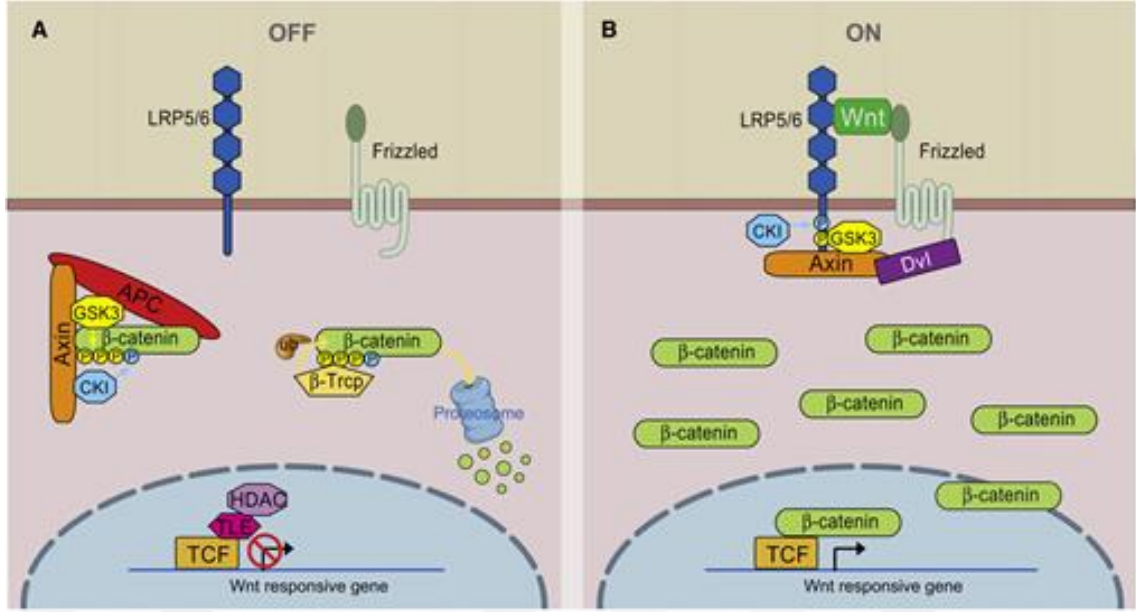
Wnt- β katenin sinyal mekanizmasının aktif veya inaktif olmak üzere iki durumu vardır. Aktif formunda Wnt'nin hedef hücre zarında bulunan reseptörlerine bağlanması, hücrede iki gerekli olan fosforilasyonu harekete geçirir. Fosforilasyonun ilk basamağına baktığımızda LRP5/6'nın sitoplazma kısmında kalan Glikojen sentaz kinaz (GSK3s) ve kazein kinaz Ig (CKI_g) enzimleri tarafından gerçekleşir. Buradaki fosforilasyondan sonra sitoplazma içinde yer alan ve üç adet proteinden meydana gelen yıkıcı kompleks dediğimiz bu üç proteini etkilemiş olur. Yıkıcı kompleks; Axin, GSK3s ve adenomatoz poliposis koli (APC)'den oluşmaktadır. İlk başta gerçekleşen fosforilasyondan sonra bu yıkıcı kompleksi bir arada tutmaya çalışan Axin proteini ve ona bağlı şekilde olan GSK3s proteini bu yıkıcı kompleksten ayrılıp, LRP5/6'nın sitoplazma içinde kalmış fosforile olan parçasına gidip bağlanır (Behrens J ve ark.1998, Chen X ve ark.2008).

Diğer bir fosforillemeyi sitoplazmada mevcut olan CKI, CKII ve par-1 enzimlerin yardımı ile Dishevelled (Dsh/Dvl) proteinin fosforile edilmesidir. Dvl dediğimiz protein bir kısmı ile Fz'ın sitoplazma içinde kalan parçasına bağlanıp bir diğer taraftan da LRP5/6'ya bağlanmış halde bulunan Axin proteinin bir kısmına bağlanır. Bağlanmaların etkisi ile Axin proteininde bir takım konformasyonel değişiklikler meydana gelir. Bu değişikliğin sinyal mekanizmasında bulunan diğer bir yıkıcı kompleks proteini olan GSK3s'in, Axin proteininden ayrılıp hücre içindeki başka bir inhibitör proteini olan [frequently rearranged in advanced T-cell lymphoma-1 (Frat-1)] sayesinde inhibe edilip beta-katenini fosforile etme

etkisini sitoplazmadan kaldırmış olur (Chen X ve ark.2008, Schwarz-Romond T ve ark. 2007, Fraser E ve ark 2002).

β -katenin, bu sinyal yolunda önemli rol oynayan sitozolik bir proteindir. Fosforillenmeyen β -katenin, proteozomlarda parçalanamaz ve sitozolde birikmeye başlar. Biriken β -kateninin bir kısmı, çekirdek zarından çekirdeğe girerek, burada bulunan transkripsiyon faktörlerini (TCF/LEF-1) aktive ederek Wnt sinyal yolunun hedef genlerinin transkripsiyonunu başlatır. Bu aktivasyonla, hem sinyal yolunda görev yapan proteinlerin transkripsiyonu gerçekleşir, hem de proliferasyonda, hücre siklusunda, farklılaşmada önemli rol oynayan birçok genin transkripsiyonunun kontrolü sağlanmış olur(Miller JR, 2002, Mikels, A.J, Nusse, R.2006, Willert K, Nusse R. 1998). Sitozolde biriken β -kateninin diğer bir kısmı ise hücreler arası bağlantıda önemli rol alan E-kadherinin sitozol içindeki kısmına bağlanır (Orsulic S ve ark.1999, Sönmez Ü, Ergür BU., 2002).

İnaktif Wnt β -katenin sinyal yolunda ise, Wnt hücre zarında onu aktif hale getirecek olan Fz ve LRP5/6 reseptörlerine bağlanamaz. Dolayısı ile sinyal yolunun aktifliğinde önemli kilit olan fosforilasyon gerçekleşemez, gerçekleşemediği içinde yıkıcı kompleks faal duruma geçer. Faal olan yıkıcı komplekse, sitozolde bulunan β -katenin bağlanır ve aktif halde bulunan GSK3 β tarafından fosforillenir. Bu fosforillenme sonucu, β -katenin kendisini yıkılmak üzere proteozomlara götüreceği olan enzime (β -TrCP) tanıtılmış olur. Bu β -TrCP, fosforillenmiş β -katenini yıkıcı kompleksten ayırarak yıkılmak üzere proteozomlara götürür ve β -katenin burada übkütinasyona uğrayarak parçalanır. Sonuçta, çekirdeğe girecek β -katenin ortamda olmadığından sinyal yolunun hedef genlerinin transkripsiyonu baskılanmış olur. Böylece hedef genlerin transkripsiyonu gerçekleşemez. Bu durumda, Wnt sinyal yolu inaktif halde bulunmuş olacaktır (Orsulic S ve ark.1999, Miller JR, 2002, Daugherty RL, Gottardi CJ.2007).



Resim 2. (Wnt sinyali yolu. A: İnaktif durum, B: Aktif durum) (McDonald et al, Dev Cell, 2009, Jul; 17(1):9-26).

2.7.2. Wnt /Ca²⁺ ve Wnt/Planar Hücre Polaritesi (PCP) (non-canonical) Yolağı

Kanonik olmayan Wnt/Planar Hücre Polaritesi (PCP) yolağında; Wnt ligandları Fz reseptörlerine bağlandığı zaman RhoA (Ras homolog gene family member A), RAC (Ras-related C3 botulinum toxin substrate) ve Cdc42 (cell division control protein 42) gibi GTPazlar aktive olur (Lai S.L ve ark. 2009). PCP yolağı hücre iskeletini etkiler ve hücre adezyonundan sorumlu hedef genlerin transkripsiyonel aktivasyonunu aktive eder (Yamamoto S., 2008).

Kanonik olmayan Wnt/Ca²⁺ yolağında da; Wnt ligandları Fz reseptörlerine veya alternatif reseptörlere (RYK ya da ROR) bağlandığı zaman hücre migrasyonunu ve Wnt/ β-katenin yolağının inhibisyonunu hücre içi Ca²⁺ akışını ve kalmodulin kinaz II (CaMK2), Jun kinaz (JNK) ve PKC aktivasyonu boyunca artırır (Van A.R., Nusse R., 2009).

2.7.3. β- katenin Molekülü

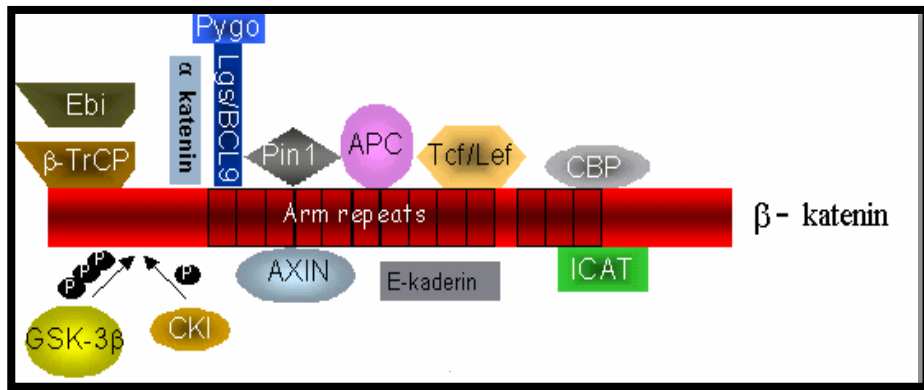
1989 yılında ortaya atılan β-katenin proteini CTNNB1 geni tarafından kodlanıp ve hücreler arasındaki iletişim ve etkileşimde görev alan molekül olarak tanımlanmıştır (Ozawa M ve ark., 1989).

β -katenin'i, hücre membranında yerleşik halde konumlanmış, hücre adezyonunda rolü olan E-kaderin'in sitoplazmik kısmı ile sitoplazmada bulunan hücre iskeletinde görev alan α -aktin arasında bir bağlama görevini üstlenmiştir. Bu protein ayrıca hedef genler için transkripsiyon faktörü olarak da görev yapmaktadır (McCrea PD ve ark. 1991, Peifer M ve ark., 1992).

β -katenin proteini pek çok biyomoleküllerin bağlanmasına olanak sağlamaktadır. Üç boyutlu konformasyon yapısının kazandırmış olduğu avantaj ile artı yüklü kısımlara Axin, APC ve TCF/LEF-1 gibi pek çok protein bağlanmaktadır (Xing Y ve ark. 2008, Xu W, Kimelman D., 2007).

β - katenin aile üyeleri; β - katenin, α ve γ gibi çeşitlerden oluşmaktadır. Bu ailenin genişliği Ca^{+2} içerikli hücre adezyon moleküllerinin oluşmasında, büyüme faktörlerinde, epitel hücrelerin hücre içi dengesinde ve en önemlisi de tümör gelişiminde kilit oynamaktadır.

γ katenin ve β -katenin birbirleri ile köken olarak aynı olsada görev bakımından ve fonksiyonel işleve sahip olmayıp, %70-80 oranında aynı aminoasitleri taşımaktadırlar. (Huber AH, Weis WI., 2001). γ katenin tümörögenezi baskılamaya çalışırken, bunun aksi davranışını yapan β - katenin ise tümörögenezi arttırıp ve kontrolsüz bir şekilde çoğalmayı yapmaktadır. Hücrede iki önemli biyolojik role sahip olan β - katenin'in görevi adezyon bağlantılarında temel bütünlüğün korunmasında ve Wnt sinyal sisteminde oldukça önemlidir (Kolligs FT, ve ark.2000).



Resim 3. β -katenin ve ona bağlanan moleküller (Liu ve ark.2001)

Kolligs FT, ve ark.(2000)'da bahsettiği gibi sadece hücrelerin birbirine yapışma eğilimi dışında Wnt kanonikal yoldaki görevleri ortaya konulmuştur fakat bu proteini elzem kılan başka bir özellik ise yapısındaki N-terminal uç bölgesinin var olması ve bunun sayesinde proteinin stabilizasyonunu sağlamak için fosforilasyon domainleridir (Kolligs FT, ve ark.(2000), Hagen T, Vidal-Puig A., 2002, van Noort M ve ark. 2002).

Wnt/ β -kateninbağımlı sinyal yolun en temel amacı; membranda, sitoplazmada ve çekirdek düzeyinin ayarlamasını yapmak ve de bu β -katenin proteinini sitoplazmada mevcut olan yıkıcı kompleks proteinleri sayesinde kontrol altına almaktır. Mekanizma inaktif durumda olduğunda ise yapısında var olan serince zengin aminoasit alanlara sahip olan β -katenin, bu sahip olmuş olduğu alandan dolayı yıkıma açık bir haldedir. Eğer Wnt sinyal mekanizması aktif halde olduğunda ise sitoplazmada mevcut şekilde bulunan yıkıcı kompleks proteinleri dağılıp, β -katenin proteinini fosforile edemez ve bu sebepten dolayı ise sitoplazmadaki seviyesi artmış olur. CTNNB-1 genindeki N-terminal ucunda gerçekleşebilecek bir bozulma mutasyonlara sebebiyet vererek böylelikle β -katenin'in de kodlanmasında sıkıntı çıkmasından dolayı çeşitli kanser tiplerinin oluşumuna sebebiyet vermektedir (Gamallo C ve ark. 1999, Akisik E, ve ark. 2011).

2.7.4. β - Katenin ve Adezyon İlişkisi

β -katenin'in görevlerine bakıldığında, hücreler arası yapışmayı derleyen, kaderin-katenin birlikteliğinin mensubu olarak vazife yapar. Bu β -katenin ve birlikteliği adezyon irtibatı ile hücreden dokuya doğru morfolojilerin belirlenip ayarlanmasında, davranış yeteneğinde, gelişme, ayrışmada ve hayatta kalma gibi canlılık olayların düzenlenip çalışmasında rol alır. Hüresel bağlantılardan olan adezyon, diğer hücrelere kaderin molekülüyle homofilik bir bağ kurarak sağlamaktadır (Kierszenbaum A.L., 2006).

Ca^{+2} bağımlı protein olan kaderin biyomolekülü, hüresel adezyon ilişkilerinde dışsal ve işlevsel devamlılığının sağlanması için kalsiyum'a ihtiyaç vardır. Eğer ortamdan Ca^{+2} kaybolursa, kalsiyum bağımlı olan kaderin molekülünün ayrılıp, bağlantıların kopup bozulmasına sebebiyet vermektedir (Butz S, Kemler R., 1994). Kaderin çeşitleri dokulara göre farklı bir şekilde mevcut olarak bulunur, kaderin molekülü herhangi bir işlevsel özellik kaybı olursa çeşitli kanser türlerine rastlanabilir (Campbell R.J, Pignatelli M., 2002).

2.7.5. Lgr 5 (leucine rich repeat containing G protein coupled receptor 5)

Lösin açısından oldukça zengin tekrar içeren G- protein bağlı reseptöre denmektedir. İnsandaki LGR5 geni 144.810 baz uzunluğunda olup ve 12. kromozomda 12q22-q23 pozisyonunda bulunmaktadır. İnsan, fare ve sıçan da 907 amino asid içerirken bu üç canlıda da 7 domain bölge mevcuttur ve de evrimsel olarak korunmuştur (McDonald T, Wang R, ve ark. 1998). GPCR sınıf A reseptör proteinlerinin üyesi olmaktadır. Bu GPCR, G-protein bağlı reseptörler, en büyük ve en çeşitli membran protein ailelerine aittir. İnsanlarda GPCR'ler 800'den fazla gen tarafından kodlanır. GPCR, bağışıklık tepkileri, hormon ve endokrin ve ekzokrin bezlerden enzim salınımı, sinir iletimi, kalp, düz kas kontraksiyonu ve kan basıncı düzenlemesi gibi fizyolojik işlevleri kontrol eden önemli sinyal dönüştürücülerdendir (Ji TH, ve ark. 1998). R-spondin proteinleri LGR5'in biyolojik olarak oldukça önemli ligandlarıdır. LGR5, birçok dokuda hem embriyonik hemde erişkin kök hücre belirteçidir. LGR5, kas, plasenta, omurilik ve beyin gibi çeşitli doku çeşitleri arasında ve özellikle bazı dokularda örneğin, yetişkin kök hücrelerin bir biyolojik işareti (marker) olarak ifade edilmektedir (Hsu SY, ve ark, 1998).

LGR5, Wnt sinyal yolunda görev alan bir proteindir. Lösin açısından zengin G proteine bağlı reseptör-5 (LGR5) birçok epitelin yetişkin kök hücre hücrelerinde eksprese edilirken, aşırı ekspresyonu kanser prognozu ile negatif korelasyon göstermektedir. LGR5, membrandan WNT-reseptör kompleksinin negatif düzenleyicilerini temizleyen benzersiz yapısal içselleştirme özelliği sebebiyle WNT/ β -katenin sinyalizasyonunu güçlendirmektedir. LGR5, LRP5/6'yı ve FZD5'i bağlayıp Wnt'nin bağımlı yani β -katenin bağımlı yolunda, ligand üzerinde üçlü bir kompleks oluşturmaktadır. Bu kompleksi güçlü bir şekilde desteklemektedir (Carmon KS, Lin Q, ve ark. 2012, Snyder JC, Rochelle LK, ve ark. 2017). Wnt / β -katenin sinyalizasyonunun güçlendiricileri olarak izole edilen bir protein ailesinden olan R-spondin, LGR4 ve LGR5 için ligand olarak işlev gördüğü bazı çalışmalarda göstermiştir (Carmon KS, Gong X, ve ark. 2011).

Bağırsak epitelinde ve kriptalarında kök hücre kimliği şeklinde bulunarak bağırsağın yenilenmesinde oldukça önemlidir. Erişkin bağırsağın epitel homeostazisinde, Notch, Hedgehog, EGFR, ve de Wnt gibi pek çok sinyal molekülünün rolü bilinmektedir. Fakat Lgr5, Wnt sinyal yolundan kaynaklı olarak bağırsak epiteli hücre çoğalımında oldukça kritik bir rolü vardır. Wnt yolağının aşırı aktivasyonu gerçekleştiğinde adenomatöz

polipozis coli (APC) kaybına bağılı olarak kolon kanserine sebebiyet vermektedir (Sansom OJ, ve ark. 2004, Fevr T, ve ark. 2007, Madison BB, ve ark. 2005).

Yapılan fare çalışmaları faredeki LGR5 ifade modellerinin daha fazla incelenmesi ile LGR5 ifade eden hücrelerin deri, kalın bağırsak, mide, meme bezi, dil, böbrek, beyin ve endometriyum, dahil olmak üzere diğer organlarda da LGR5 potansiyel bir “evrensel epitel kök hücre marker” olduğunu düşündürmektedir (Gil-Sanchis C, ve ark. 2013, Noh M, ve ark. 2011).

2.8. Wnt’ nin Beyin Gelişimine Etkisi

Wnt sinyali’nin gelişim üzerinde etkisi, hücre canlılığının tanımlanmasında, hücre proliferasyonda, hücre göçünde (migrasyon) ve vücut şekillenmesi gibi temel hadiselerde önemi oldukça büyüktür. Salgılanan Wnt ailesinin üyeleri, sinyal proteinlerinin hücre göçünün ve akson kılavuzluğunun ve göçünde kilit düzenleyicileridir (Mentink RA, ve ark. 2014). Gelişim sürecinde olan bir beyinde, Wnt sinyalinin nöronların olgunlaşmasında ve sinaps teşkilinde genel regüle bir etkisi bulunmaktadır. Wnt’in, Frizzled ve diğer reseptörün yardımcıları ile ilişki kurması ile aktive olmasından sonra diğer bir basamakta ise sinyal iletimi çekirdeğe ulaşarak CTNNB1’in salınması ile gerçekleşir (Skowron P, ve ark. 2015). Wnt yolağı orta beyin ve art beyin gelişiminde de oldukça rolü büyüktür (Partanen J., 2007). Serebellum organogenezinde de diğer yolakların haricinde de, Wnt yolağı bu oluşumda oldukça büyük bir öneme sahiptir (Niehrs C, 2012, Villavicencio EH, Walterhouse DO, 2000). Başka bir etkisi ise WNT sinyal yolağı hücre geleceğini belirlemeyi ve nöronal bağlanmayı düzenlemektedir (Ciani L, Salinas PC, 2005). Wnt/ β -katenin, gelişmekte olan neokortikal ventrikülde, telensefalonun subkortikal kısmında ve ventral orta beyindeki sinir öncü hücrelerinin kendi kendini yenilemesinde ve nöronal farklılaşmayı düzenlediği çalışmalarda gösterilmiştir (Gulacsi AA, Anderson SA., 2008, Tang M, ve ark. 2009). Bazı Wnt sinyal yolu ve beyin çalışmalarında medulloblastomların, beyin sapının arka tarafından ve aşağı rombik lip’teki önder hücrelerden köken aldığı fare modellerinde ispatlanmıştır (Gibson P, Tong Y, ve ark. 2010).

Fare beyininde nörogenezin gerçekleştiği sırada Wnt proteinlerinin rol oynadığı konusunda genel bir görüş birliği bulunmamaktadır fakat farklı çalışmalarda aynı Wnt ligandı için farklı etkin rolü olduğu belirtilmektedir. Sinir sisteminde, Wnt-3a nakavt (KO) fareleri, proliferasyonda bir azalma söz konusu olduğunda ise hipokampüsün yetersiz

gelişim gösterdiği sergilenmektedir (Lee SM, ve ark. 2000). Bunun yanı sıra, Wnt-3a'nın ektopik (uygun) ekspresyonu orta ve geç kortikal nörogenez sırasında ara kortikal progenitörlerin farklılaşmasına neden olduğu başka bir çalışmada gösterilmiştir (Munji RN, ve ark. 2011). Bazı Wnt ligandlarında, hastalık oluşumu ya da gelişimi engelleme ve gelişimde rolü var olan çalışmalara bakıldığında; Wnt-5a nakavt (KO fareler), dopaminerjik nörogenez ve nevrit (sinir iltihabı) oluşumunda kusurlara neden olmaktadır (Pino D, ve ark. 2011, Blakely BD, ve ark. 2011). Wnt-7a nakavt (KO fareler) dopaminerjik ve diğer nöronal popülasyonların oluşumunda olgunlaşmayı engellemektedir (Hall AC, ve ark. 2000, Fernando CV, ve ark. 2014, Ciani L, ve ark. 2011). Bütün Wnt'lerin daha doğrusu çeşitlerin, sinir sisteminin doğru oluşumu için gerekli olduğu ve de sık sık birbirleri ile iş birliği içerisinde olduğunu göz önüne alındığında, kanonik ve kanonik olmayan Wnt sinyalleri nöronal gelişim için gerekli olmaktadır (Andersson ER, ve ark. 2012).

Non-kanonikal yol olan PCP yolun da ise kortikal gelişimde kritik bir rol oynadığı, çünkü Wnt-7a ve Vangl2, kortikogenez sırasında iğ boyutu asimetrisini kontrol ettiği ve bu nedenle NSC (sinir kök hücre) kendini yenilediğini ve farklılaşmanın düzenlenmesinde anahtar unsur olarak önerilir. PCP yolunun hücre polaritesinin haricinden, asimetride de çok önemli bir rol oynadığını ve progenitör kök hücrelerin gelişmekte olan beyni şekillendirmesi için asimetrik bölünmelerini sağlamaktadır (Delaunay D, ve ark. 2014, Lake BB, ve ark. 2009).

Chen B-Y ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada IWR-1 (Wnt bloke edici ilaç) uygulanması ile Axin stabilize edilip faredeki beyin dokusuna bakıldığında NCS'yi azalttığını göstermişlerdir. Ve Wnt / β - katenin sinyalizasyonun önemini, sinir kökü/progenitör hücre çoğalmasında, farklılaşmasında ve muhafaza edilmesinde rolünü göstermişlerdir (Chen B-Y, ve ark. 2013). Farklılaşmayı sağladığına dair çalışmalara baktığımız da ise Hirabayashi ve ark., β -katenin'in normal ekspresyonunda fare kortikal öncülerinin farklılaşmasını sağladığını ancak Wnt / β -katenin'in sinyalinin inhibisyonu ile fare neokorteksindeki farklılaşmayı engellediğini bulmuşlardır (Hirabayashi Y, ve ark. 2004).

2.9. LGK974

LGK974, Wnt ligandlarının salgıları için önemli olan posttranslasyonel palmitoilasyonunda önemli bir rol alan, PORCN (porcuphine)'ni inhibe etmeye yarayan bir ilaçtır. LGK974'ün güçlü bir şekilde Wnt sinyalizasyonunu inhibe ettiğini, kemirgen tümör modellerinde güçlü etkinliğe sahip olduğu ve de iyi tolere edildiğini göstermektedir. N terminalinde bulunan suyu sevmeyen sinyal dizileri yardımı ile Wnt polipeptid zinciri endoplazmik retikulum (ER)'a yönelim gösterir. Burada son bir hal almaya gelen Wnt, burada post-translasyonel seviyede glikozilasyon ve lipid gibi modifikasyonlar geçirmek için gelir. ER'deki transmembran proteini olan PORCN (porcuphine), LGK 974 uygulandıktan sonra Wnt'de bu modifikasyon işlemleri gerçekleşemez. Gerçekleşmediği için Wnt dolaylı yollardan bloke edilmiş olur (Coudreuse D.ve Korswagen HC. 2007, Hausmann G. ve ark. 2007, Liu J, Pan S, ve ark. 2013).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Deney Hayvanlarının Temini ve Bakımı

Adnan Menderes Üniversitesi Deney Hayvanları Ünitesinden yaklaşık olarak 12-14 haftalık, ortalama ağırlığı 20-40 gram olan, daha önce hiç deneye girmemiş olan 54 adet dişi ve 20 adet erkek Balb/c cinsi fare kullanılmıştır. Çalışmamız Adnan Menderes Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulu 64583101/2016/71 sayılı onayını almıştır. Erkek fareler, deney sonunda Deney Hayvanları Ünitesine geri iadesi olup teslim edilmiştir. Deney süresince fareler, bağıl nem oranı %40-60, ısısı 22 C° ve 12 saat aydınlık 12 saat karanlık döngüsü olan düzenekli bir ortamda bakıldı. Farelerin deney sürecinde su ve yem ihtiyaçları *ad libitum* olarak karşılandı. Kafeslerin temizliği haftada iki/üç kez olacak düzeyde temizlendi.

3.2. Deney Grupların Planlanması

Farelerin uyum sürecinin tamamlanmasının ardından, fareler rastgele 3 gruba (n=18) ayrıldı.

Grup I (Gebe kontrol grubu, n=18): Gebe bırakılacak fakat deney süresince, hiç bir şey uygulanmayacak kontrol grubu

a. 13, 5 günlük (n=6)

b. 15, 5 günlük (n=6)

c. 17, 5 günlük (n=6)

Grup II (Sham Grubu (DMSO Grubu), n=18): Gebe bırakılacak fakat deney süresince gavaj yolu ile 0, 04mg/ml DMSO verilmiştir.

a. 13, 5 günlük (n=6) ,

b. 15, 5 günlük (n=6)

c. 17, 5 günlük (n=6)

Grup III (Porcupine İnhibitör Grubu (Poren Grubu), n=18): Gebe bırakıldıktan sonra her fareye 0, 04 mg /ml LGK974 gavaj yoluyla verilmiştir.

a. 13, 5 günlük (n=6)

b. 15, 5 günlük (n=6)

c. 17, 5 günlük (n=6)

Fareleri gebe bırakmak için, akşam, kafeslere üç dişiye bir erkek olacak şekilde yerleştirilip sonrasında ertesi sabah vajinal plak kontrolü ile gebelik tayini gerçekleştirilmiştir. Farelerde plak gözlemlendiğinde, gebeliğin 0.5'inci gününde (dpc:0.5) olduğu kabul edildi.



Resim 4. Gebelikte kontrol edilen vajinal plağın tespiti

3.3. Wnt İnhibisyonu Oluşturma

Grup III'te yer alan farelere, gebeliğinin 9. gününde DMSO içinde çözündürülmüş olan 5mg/kg LGK974 (Cayman chemical company, cas.no: 1243244-14-5), sabah ve akşam olmak üzere iki doz gavaj yolu ile gebeliğin 9'ncü gününde farelere vermeye başlanmıştır. Verilen LGK974, Porcuphin'i bloke ettikten sonra dolaylı olarak Wnt inhibisyonunu gerçekleştirmiştir.

3.4. Deneyin Sonlandırılması

Deneyin sonunda, gebeliğin 13.5, 15.5, 17.5 gününde eter anestezisi altında perfüzyon işlemi uygulanarak embriyoların fikse olması sağlandıktan sonra sakrifiye edildiler. Embriyoların beyinleri diseksiyon yapıldıktan sonra immünohistokimyasal işlemler ve histokimyasal işlemler için %10'luk formalinle tespit edilmiştir.

3.5. Embriyoların Ağırlıkları ve Boy Ölçümü

Gruplara ait tüm embriyoların ağırlıkları hassas terazi ile boyları da milimetrik kağıt ve dijital kumpas yardımıyla ölçülerek kaydedildi.

3.6. Doku Takibi

13, 5, 15, 5, 17, 5 beyin dokuları yapılacak olan histokimyasal boyama ve immünohistokimya için takip edilmiştir. Fiksasyonun ardından E13.5, E15.5, E17.5 güne ait beyin dokuları akarsu altında bir gece bırakılarak fikasyon maddesinden uzaklaştırılmaları sağlanmıştır. Yıkama işleminin ardından manuel olarak yaptığımız takibi aşağıdaki tabloda verilmiştir.

Tablo 2. Manuel doku takibi işlemi

Kimyasallar	Süre
%70'lik Alkol	1 Saat
%80'lik Alkol	1 Saat
%96'lik Alkol	1 Saat
%100'lük Alkol	1 Saat
Ksilol (Etüvde 60°C)	1 Saat
Ksilol (Etüvde 60°C)	1 Saat
Parafin (Etüvde 60 °C)	1 Saat
Parafin (Etüvde 60 °C)	1 Saat
Parafine Gömme	

Her gruptan rastgele 7 blok alınarak beyin dokuları transvers düzlemde yaklaşık 5 µm kalınlığında lamlara alınmıştır. Kesitler immünohistokimya ve Hematoksilen-Eozin boyama için lamlara alınarak boyama işlemlerine geçilmiştir.

3.7. Histokimyasal Boyamalar

Hematoksilen- eozin boyama için 3 saat önceden 60°C etüvde bırakılan dokuların işlem sırası tabloda verilmiştir.

Tablo 3. Parafini tamamen eriyen preparatın Hematoksilen-Eozin boyama prosedürü

Kimyasallar	Süre
Ksilol	3 dk
Ksilol	4 dk
%100'lük alkol	15-20 saniye
%80'lik alkol	15-20 saniye
Distile su	3, 5 dk
Harris' Hematoksilen (Merck)	3 dk
Akar su altında yıkama	1 dk
Eozin (Sigma-aldrich)	1 dk
%80'lik alkol	15-20 saniye
%100'lük alkol	15-20 saniye
Ksilol	4 dk
Ksilol	4 dk
Entellan ile kapatma	

Toluidine blue boyama için bir saat önceden 60-70°C etüvde bırakılan dokuların parafinleri tamamı eridikten sonra yapılan işlemler tabloda verilmiştir.

Tablo 4. Toluidine blue boyama prosedürü

Kimyasallar	Süre
Ksilol	3 dk
Ksilol	4 dk
%100'lük alkol	15-20 saniye
%80'lik alkol	15-20 saniye
Distile su	3, 5 dk
Toluidine blue (Sigma-aldrich)	5 dk
Akar su altında yıkama	1 dk
%80'lik alkol	15-20 saniye
%100'lük alkol	15-20 saniye
Ksilol	4 dk
Ksilol	4 dk
Entellan ile kapatma	

3.8. İmmünohistokimya Boyama Prosudürü

Beta catenin (Bioss, bs-1165R), S100B (Abcam, ab52642), Lrg5/GPCR, GPR49 (Abcam, ab75732) antikorlarının immünohistokimyasal boyaması için Polilizinli lamlara alınarak kesitler bir gece önceden 45°C'ye ayarlanan etüve bırakıldı. Ertesi gün 45°C olan

etüvün ısı 60 °C'ye çıkartılarak 1 saat daha bırakarak parafinden tamamını kurtarıldı. Target Retrieval solüsyon (Dako) ile mikrodalga fırında 5 dk- 450W boyunca kaynatılarak 20 dk oda sıcaklığında soğumaya bırakılan kesitlerde Antijenler ortaya çıkarıldı. Dokular sonrasında 5 dakika distile suda bekletilip ardından boyama Chamber'ına alındı. Dokuların etrafları Pap-pen kalem ile çizildi. Sonrasında Histostain Plus 3rd Gen IHC Detection Kit (Novex) kullanılarak boyama işlemi aşağıdaki tabloda devam ettirildi.

Tablo 5. İmmünohistokimya protokolü

1	PBS Solüsyonu ile 5 dk yıkama işlemi gerçekleştirildi.
2	Solüsyon A (peroxidase quenching sol.) ile 6-7 dk bekletildi.
3	PBS solüsyonu ile 5 dk yıkama yapıldı.
4	Kesitler üzerine B solüsyonu (Blocking sol.) damlatılarak 30-40 dk bekletildi.
5	Blok solüsyonunu yıkama yapmadan uzaklaştırıldı ve uygun şekilde dilüsyonu yapılmış primer antibody (antikorlar) (Beta-catenin için 1:100, S100B için 1:200, Lrg5 için 1:50 distile su için dilüsyon oranları kullanılmıştır) damlatılarak kapalı nemli Chamber da +4 °C'de overnight bekletildi.
6	PBS solüsyonu ile iki kez 5 dk yıkama işlemi yapıldı.
7	Primer antikor ile uyumlu biyotinlenmiş sekonder antikor (Solüsyon C) damlatılarak, kapalı nemli kutuda 30 - 35 dakika oda ısısında bekletildi
8	PBS solüsyonu ile tekrardan 5 dk yıkama yapıldı.
9	Solüsyon D (streptavidin-peroxidase conjugate) damlatılarak, kapalı nemli kutuda 15 - 20 dk oda ısısında bekletildi
10	PBS solüsyonu ile 2 kez 5 dk yıkama işlemi gerçekleştirildi.
11	1 damla DAB chromogen (Solüsyon E2) 1ml DAB substrate buffer içine (Solüsyon E1) damlatıldı ve pipetaj yardımı ile karıştırıldı, hazırlanan DAB dokular üzerine damlatılarak renk alana kadar bekletildi (Bekleme süresi genel olarak 1-5 dk olmuştur).
12	Akan çeşme suyu altında 1 dk yıkama işlemi yapıldı.
13	Çekirdek boyanması için Mayer'in hematoksileni dokular üzerine damlatılarak 30 sn bekletildi. (Hematoksilin normal şartlarda çok yoğun boyamıyorsa bu süreyi uzatabiliriz. Ya da modifiye hematoksilin kullanılabilir).
14	Akan çeşme suyu altında en az 5 dk boyunca dokular renk alana kadar yıkama gerçekleştirildi.
15	Sırasıyla %80, %96 ve %100'lük etil alkolde 10-15 saniye arasında bekletildi.
16	Kesitler 2 kez 4'er dakika ksilende tutulup Entellan ile kapatılarak mikroskop için uygun hale getirildi.

3.9. İstatistiksel Analiz

3.9.1. Fetus Ağırlıkları ve Boy

Kontrol ve deney gruplarına ait E13.5, E15.5, E17.5, fetus ağırlıkları ve boy açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olup olmadığını belirlemek için One Way ANOVA testi uygulandı. Anova varyans analizinin sonucu F değeri olarak verildi ve $p < 0.05$ olan değerler istatistiksel olarak anlamlı olarak kabul edildi.

3.9.2. İmmunohistokimyasal Değerlendirme

Dokular semikantitatif bir skorldama ile değerlendirilerek 0: boyanma yok, 1: az boyanma, 2: orta dőzeyde boyanma, 3: yoğun boyanma. Gruplar arasında, immőnohistokimyasal boyama ile gősterilmiř olan belirteçler açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olup olmadığını belirlemek için One Way ANOVA testi uygulandı ve $p<0.05$ olan değerler istatistiksel olarak anlamlı olarak kabul edildi.



4. BULGULAR

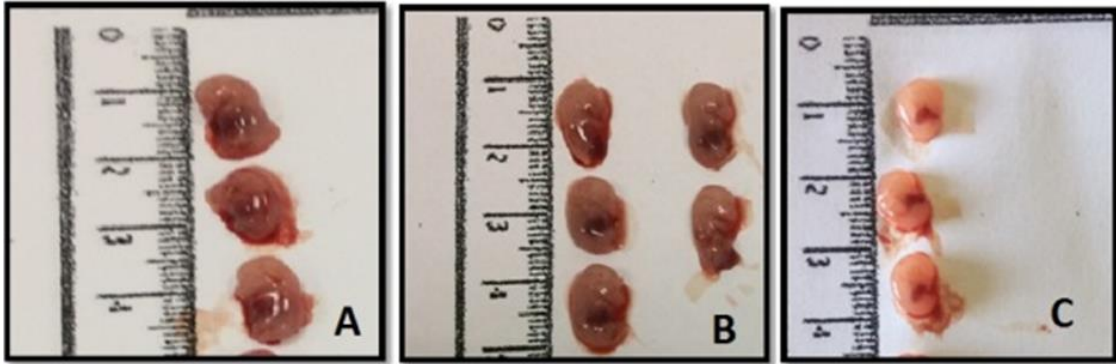
4.1. Fetus Ağırlıkları ve Boy Ölçüleri

SPSS 21 istatistik programı kullanılarak yapılan One Way ANOVA testi ile sonuçlar için mean \pm standart deviation (ortalama \pm standart sapma) değerleri Tablo 6'da verilmiştir.

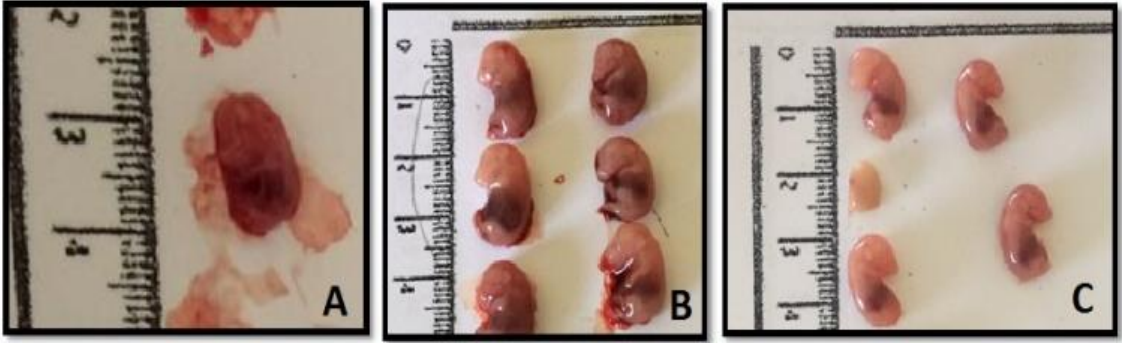
Tablo 6. Kilo ve boy ölçüm sonuçlarındaki farklılıklar

Gruplar	Kilo/Boy	Kontrol (ort. \pm std.sapma)	DMSO (ort. \pm std.sapma)	Porcupine (ort. \pm std.sapma)	F değeri	P değeri
13.5 gün	Kilo	0.16 \pm 0.016	0.13 \pm 0.042	0.10 \pm 0.03	55.614	0.000*
	Boy	11.32 \pm 0.93	9.28 \pm 0.41	7.82 \pm 0.73	272.787	0.000*
15.5 gün	Kilo	0.42 \pm 0.07	0.47 \pm 0.07	0.22 \pm 0.08	193.692	0.000*
	Boy	12.12 \pm 0.90	14.14 \pm 1.01	10.35 \pm 2.26	97.835	0.000*
17.5 gün	Kilo	1.49 \pm 0.13	0.78 \pm 0.19	0.49 \pm 0.18	647.843	0.000*
	Boy	24.37 \pm 1.34	19.28 \pm 2.83	14.43 \pm 2.89	274.831	0.000*

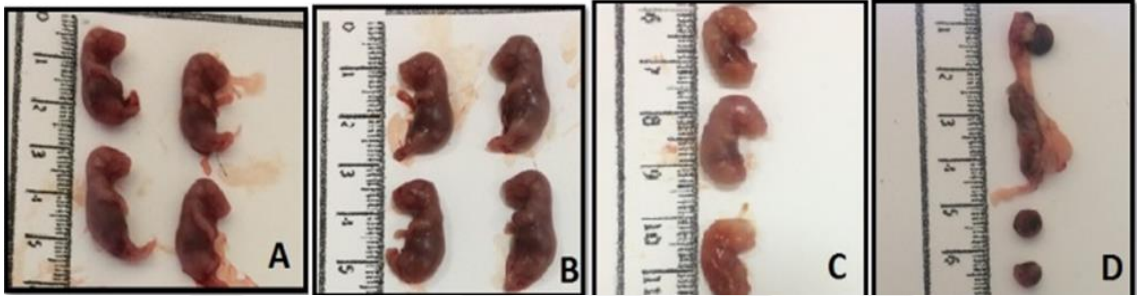
Gruplar arası ağırlık ve boy değişimleri incelendiğinde de Porcupine inhibitör grubunun, DMSO grubu ve kontrol grubuna kıyasla ağırlık ve boy ölçülerinde anlamlı olarak azaldığı gözlemlendi ($p < 0.05$).



Resim 5. E13, 5 günlük kontrol grubunu A'da, B; E13,5 günlük DMSO grubu, C; E13,5 günlük Porcupine inhibitör grubunu göstermektedir.



Resim 6. E15,5 günlük kontrol grubunu **A'da**, **B**; E15,5 günlük DMSO grubu, **C**; E15,5 günlük Porcupine inhibitör grubunu ve de bakıldığında kol, bacak, kuyruk oluşmadığını ve dejenere olmuş embriyo görülmektedir.



Resim 7. E17,5 günlük kontrol grubunda bütün uzuvları **A'da** görüyoruz, **B**; E17,5 günlük DMSO grubunda da bütün uzuvları gözlemledik, **C**; E17,5 günlük Porcupine inhibitör grubunda kol, bacak, kuyruk olmadığını görülmektedir. **D**; E17,5 günlük Porcupine inhibitör grubunun embriyoların oluşmadığı sadece plasentaların varlığı görülmektedir.

4.2. İmmünohistokimyasal Değerlendirmeler

İmmünohistokimyasal skorlamalar gruplar kendi aralarındaki tabakalarda (Marginal tabaka, intemediate tabaka ve ventriküler+subventriküler tabaka), gün (E13.5, E15.5, E17.5) ve de marker'a (beta katenin, S100B, LGR5) göre ayrı ayrı yapılmıştır. Skorlamayı istatistiksel olarak değerlendirmek için One Way ANOVA testi kullanılmıştır.

4.2.1. Kontrol Grubundaki Sonuçlar

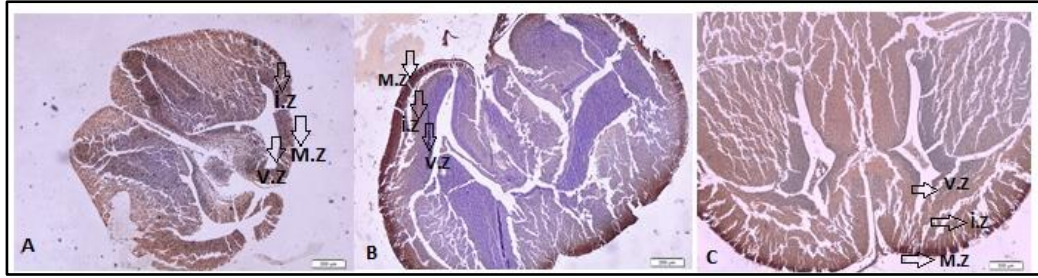
İmmunhistokimyasal skorlamalar 13.5-15.5 ve 17.5 günler arasındaki farkı ve skorlanmayı değerlendirmek için One Way ANOVA testi uygulanmıştır. Günlere göre ve marker'a göre değerler Tablo 7-9'da verilmiştir.

Tablo 7. Beta-katenin skor sonuçları

Beta-katenin	Bölge	Kontrol (ort.±std.sapma)	F değeri	P değeri
13.5 gün	Marginal	1.64 ± 0.67	3.906	0.033
	İntermediate	0.91 ± 0.70	5.412	0.011*
	Ventrikül	0.46 ± 0.69	2.494	0.102
15.5 gün	Marginal	2.00 ± 0.93	3.906	0.033
	İntermediate	1.25 ± 1.28	5.412	0.011*
	Ventrikül	0.63 ± 0.92	2.494	0.102
17.5 gün	Marginal	2.50 ± 0.53	3.906	0.033
	İntermediate	2.20 ± 0.79	5.412	0.011*
	Ventrikül	1.20 ± 0.79	2.494	0.102

İmmunhistokimyasal skorların One Way ANOVA testi ile analiz edilmesi sonrasında;

1. E13.5, E15.5, E17, 5 günlerde Beta- Katenin markerı'nın intermediate zonlarında anlamlı bir fark gözlenmiştir. (p<0.05)



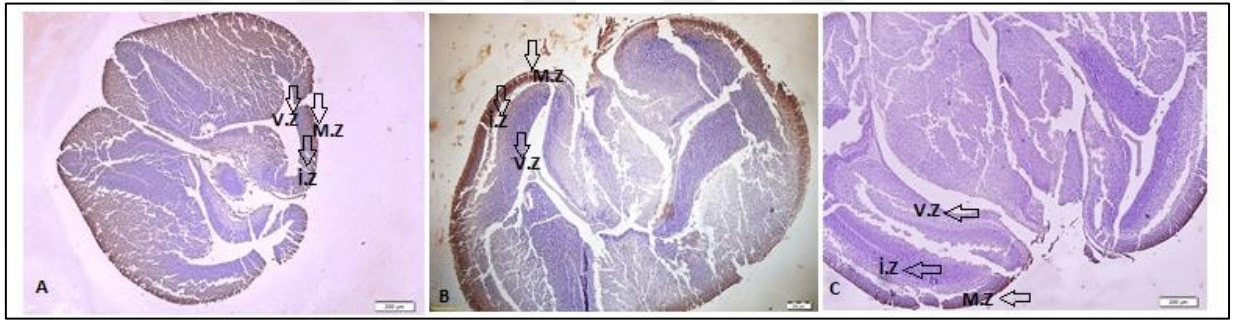
Resim 8. A'da E13,5 günlük kontrol grubu beta katenin boyaması. B'de E15,5 günlük kontrol beta katenin boyaması. C 'de E17, 5 günlük kontrol beta katenin boyamasını 4x'lik büyütmede görülmektedir (M.Z; Marginal zon, İ.Z; İntermediate zon, V.Z; Ventriküler + Subventriüler zon).

Tablo 8. S100B skor sonuçları

S-100B	Bölge	Kontrol (ort.±std.sapma)	F değeri	P değeri
13.5 gün	Marginal	1.27 ± 0.65	2.085	0.145
	İntermediate	0.73 ± 0.79	2.320	0.118
	Ventrikül	0.36 ± 0.51	0.995	0.383
15.5 gün	Marginal	1.63 ± 1.06	2.085	0.145
	İntermediate	1.13 ± 1.13	2.320	0.118
	Ventrikül	0.63 ± 0.74	0.995	0.383
17.5 gün	Marginal	1.90 ± 0.32	2.085	0.145
	İntermediate	1.50 ± 0.53	2.320	0.118
	Ventrikül	0.55 ± 0.57	0.995	0.383

Skorların One Way ANOVA testi ile analiz edilmesi sonrasında;

1. E13,5, E15,5, E17,5 günlerde S100B markerında anlamlı bir fark gözlenmemiştir.(p>0.05)



Resim 9. A'da E13,5 günlük kontrol grubu S100B boyaması. B'de E15,5 günlük kontrol S100B boyaması. C 'de E17, 5 günlük kontrol S100B boyamasını 4x'lik büyütmede görülmektedir (M.Z; Marginal zon, İ.Z; İntermediate zon, V.Z; Ventriküler + Subventriüler zon).

Tablo 9. LGR5 skor sonuçları

LGR-5	Bölge	Kontrol (ort.±std.sapma)	F değeri	P değeri
13.5 gün	Marginal	1.27 ± 1.01	7.415	0.003*
	İntermediate	0.64 ± 0.92	16.916	0.000*
	Ventrikül	0.46 ± 0.52	13.193	0.000*
15.5 gün	Marginal	2.38 ± 0.52	7.415	0.003*
	İntermediate	2.25 ± 0.46	16.916	0.000*
	Ventrikül	1.63 ± 0.52	13.193	0.000*
17.5 gün	Marginal	2.50 ± 0.71	7.415	0.003*
	İntermediate	2.30 ± 0.68	16.916	0.000*
	Ventrikül	1.60 ± 0.70	13.193	0.000*

Skorların One Way ANOVA testi ile analiz edilmesi sonrasında;

1. E13.5, E15.5, E17, 5 günlerde LGR5 markerında anlamlı fark gözlenmiştir.

Marginal zonda (p<0.05)

İntermadiate ve Ventriküler+subventriküler zonda ise (p<0.05)



Resim 10. A'da E13,5 günlük kontrol grubu LGR5 boyaması. B'de E15,5 günlük kontrol LGR5 boyaması. C 'de E17, 5 günlük kontrol LGR5 boyamasını 4x'lik büyütmede görülmektedir (M.Z; Marginal zon, İ.Z; İntermediate zon, V.Z; Ventriküler + Subventriüler zon)

4.2.2. DMSO Grubundaki Sonuçlar

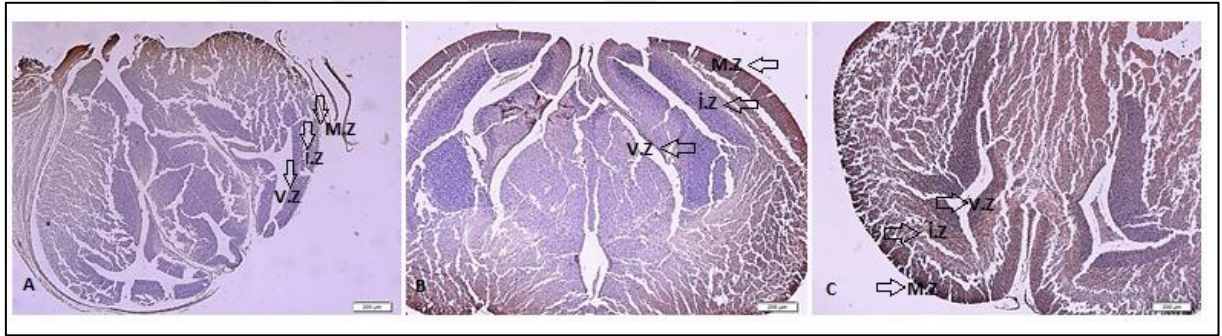
İmmunhistokimyasal skorlamalar 13.5-15.5 ve 17.5 günler arasındaki farkı ve skorlanmayı değerlendirmek için One Way ANOVA testi uygulanmıştır. Günlere göre ve marker'a göre değerler Tablo 10-12'de verilmiştir.

Tablo 10. Beta-katenin skor sonuçları

Beta-katenin	Bölge	DMSO (ort.±std. sapma)	F değeri	P değeri
13.5 gün	Marginal	2.00 ± 0.82	0.791	0.462
	İntermediate	1.30 ± 0.95	0.883	0.423
	Ventrikül	0.80 ± 0.92	0.341	0.713
15.5 gün	Marginal	2.36 ± 0.75	0.791	0.462
	İntermediate	1.71 ± 0.91	0.883	0.423
	Ventrikül	0.93 ± 0.83	0.341	0.713
17.5 gün	Marginal	2.08 ± 0.67	0.791	0.462
	İntermediate	1.75 ± 0.75	0.883	0.423
	Ventrikül	1.08 ± 0.67	0.341	0.713

İmmunhistokimyasal skorların One Way ANOVA testi ile analiz edilmesi sonrasında;

1. E13.5, E15.5, E17.5 günlerde Beta-katenin markerında anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($p>0.05$).



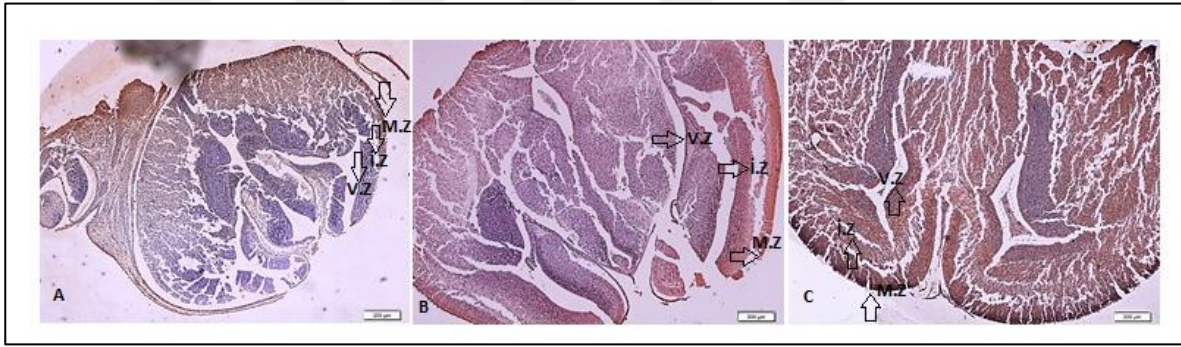
Resim 11. A’da E13,5 günlük DMSO grubu beta-katenin boyaması. B’de E15,5 günlük DMSO beta katenin boyaması. C ‘de E17, 5 günlük DMSO beta katenin boyamasını 4x’lik büyütmede görülmektedir (M.Z; Marginal zon, İ.Z; İntermediate zon, V.Z; Ventriküler + Subventriüler zon).

Tablo 11. S100B skor sonuçları

S-100B	Bölge	DMSO (ort.±std.sapma)	F değeri	P değeri
13.5 gün	Marginal	1.00 ± 0.47	3.081	0.059
	İntermediate	0.30 ± 0.48	3.241	0.052
	Ventrikül	0.20 ± 0.42	1.063	0.357
15.5 gün	Marginal	1.79 ± 0.98	3.081	0.059
	İntermediate	1.21 ± 1.05	3.241	0.052
	Ventrikül	0.57 ± 0.76	1.063	0.357
17.5 gün	Marginal	1.50 ± 0.67	3.081	0.059
	İntermediate	1.08 ± 1.00	3.241	0.052
	Ventrikül	0.58 ± 0.79	1.063	0.357

Skorların One Way ANOVA testi ile analiz edilmesi sonrasında;

1. E13.5, E15.5, E17.5 günlerde S100B markerında anlamlı bir fark gözlenmemiştir (p>0.05).



Resim 12. A’da E13,5 günlük DMSO grubu S100B boyaması. B’de E15,5 günlük DMSO S100B boyaması. C ‘de E17, 5 günlük DMSO S100B boyamasını 4’lük büyütmede görülmektedir (M.Z; Marginal zon, İ.Z; İntermediate zon, V.Z; Ventriküler + Subventriüler zon).

Tablo 12. LGR5 skor sonuçları

LGR-5	Bölge	DMSO (ort.±std.sapma)	F değeri	P değeri
13.5 gün	Marginal	1.90 ± 0.74	1.379	0.266
	İntermediate	0.90 ± 0.57	9.597	0.001*
	Ventrikül	0.40 ± 0.70	5.826	0.007*
15.5 gün	Marginal	2.43 ± 0.85	1.379	0.266
	İntermediate	2.14 ± 0.86	9.597	0.001*
	Ventrikül	1.14 ± 0.66	5.826	0.007*
17.5 gün	Marginal	2.33 ± 0.78	1.379	0.266
	İntermediate	2.25 ± 0.86	9.597	0.001*
	Ventrikül	1.33 ± 0.65	5.826	0.007*

Skorların One Way ANOVA testi ile analiz edilmesi sonrasında;

1. E13.5, E15.5, E17,5 günlerde LGR5 markerında anlamlı ve anlamsız fark gözlenmiştir.

Marginal zonda anlamlı bir fark gözlenmemiştir. ($p>0.05$)

Intermediate tabakası ve ventriküler + subventriküler tabakada anlamlı sonuçlar elde edilmiştir. ($p<0.05$), ($p<0.05$)



Resim 13. A’da E13,5 günlük DMSO grubu LGR5 boyaması. B’de E15,5 günlük DMSO LGR5 boyaması. C ‘de E17,5 günlük DMSO LGR5 boyamasını 4x’lik büyütmede görülmektedir (M.Z; Marginal zon, İ.Z; İntermediate zon, V.Z; Ventriküler + Subventriüler zon).

4.2.3. Porcupine İnhibitör Grubu

İmmunhistokimyasal skorlamalar 13.5-15.5 ve 17.5 günler arasındaki farkı ve skorlanmayı değerlendirmek için One Way ANOVA testi uygulanmıştır. Günlere göre ve marker’a göre değerler Tablo 12-14’de verilmiştir.

Tablo 13. Beta-katenin skor sonuçları

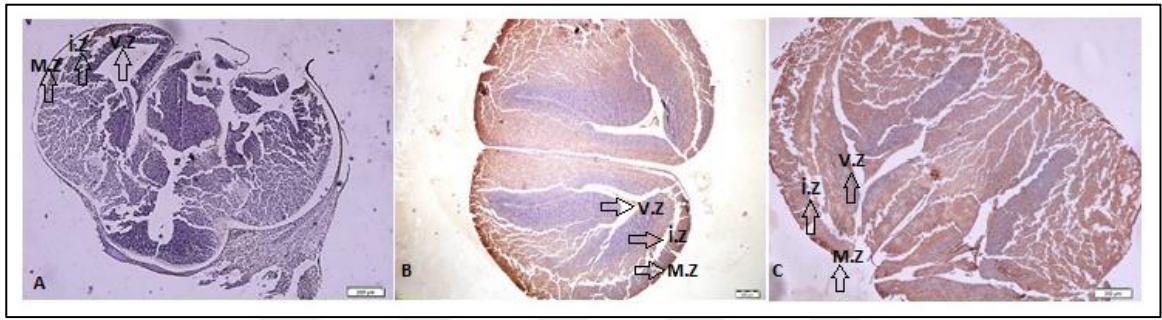
Beta-katenin	Bölge	Porcupine (ort.±std.sapma)	F değeri	P değeri
13.5 gün	Marginal	1.33 ± 0.70	2.007	0.150
	İntermediate	0.67 ± 1.00	9.000	0.001*
	Ventrikül	0.22 ± 0.67	5.636	0.008*
15.5 gün	Marginal	1.79 ± 0.89	2.007	0.150
	İntermediate	1.50 ± 0.86	9.000	0.001*
	Ventrikül	0.71 ± 0.73	5.636	0.008*
17.5 gün	Marginal	2.07 ± 0.92	2.007	0.150
	İntermediate	2.07 ± 0.48	9.000	0.001*
	Ventrikül	1.14 ± 0.54	5.636	0.008*

İmmunhistokimyasal skorların One Way ANOVA testi ile analiz edilmesi sonrasında;

1. E13.5, E15.5, E17, 5 günlerde Beta katenin markerında anlamlı ve anlamsız fark gözlenmiştir.

Marginal zonda anlamlı bir fark gözlenmemiştir. ($p>0.05$)

İntermediate tabakası ve ventriküler + subventriküler tabakada anlamlı sonuçlar elde edilmiştir. ($p<0.05$), ($p<0.05$)



Resim 14. A’da E13,5 günlük Porcupine inhibitör grubu Beta katenin boyaması. B’de E15,5 günlük Porcupine inhibitör grubu, Beta katenin boyaması. C ‘de E17, 5 günlük Porcupine inhibitör grubu, Beta katenin boyamasını 4x’lik büyütmede görmektedir. (M.Z; Marginal zon, İ.Z; İntermediate zon, V.Z; Ventriküler + Subventriüler zon).

Tablo 14. S100B skor sonuçları

S-100B	Bölge	Porcupine (ort.±std.sapma)	F değeri	P değeri
13.5 gün	Marginal	1.11 ± 0.78	0.339	0.715
	İntermediate	0.67 ± 1.00	1.770	0.187
	Ventrikül	0.22 ± 0.67	1.131	0.335
15.5 gün	Marginal	1.29 ± 0.73	0.339	0.715
	İntermediate	0.50 ± 0.76	1.770	0.187
	Ventrikül	0.21 ± 0.43	1.131	0.335
17.5 gün	Marginal	1.42 ± 1.00	0.339	0.715
	İntermediate	1.17 ± 1.03	1.770	0.187
	Ventrikül	0.50 ± 0.52	1.131	0.335

Skorların One Way ANOVA testi ile analiz edilmesi sonrasında;

1. E13.5, E15.5, E17,5 günlerde S100B markerında anlamlı bir fark gözlenmemiştir. ($p>0.05$)



Resim 15. A’da E13,5 günlük Porcupine inhibitör grubu S100B boyaması. B’de E15,5 günlük Porcupine inhibitör grubu, S100B boyaması. C ‘de E17, 5 günlük Porcupine inhibitör grubu, S100B boyamasını 4x’lik büyütmede görülmektedir (M.Z; Marginal zon, İ.Z; İntermediate zon, V.Z; Ventriküler + Subventriüler zon).

Tablo 15. LGR5 skor sonuçları

LGR-5	Bölge	Porcupine (ort.±std.sapma)	F değeri	P değeri
13.5 gün	Marginal	1.56 ± 0.73	2.907	0.069
	İntermediate	1.00 ± 0.87	6.050	0.006*
	Ventrikül	0.33 ± 0.50	7.103	0.003*
15.5 gün	Marginal	2.21 ± 0.70	2.907	0.069
	İntermediate	1.86 ± 0.86	6.050	0.006*
	Ventrikül	0.93 ± 0.62	7.103	0.003*
17.5 gün	Marginal	2.33 ± 0.89	2.907	0.069
	İntermediate	2.33 ± 0.89	6.050	0.006*
	Ventrikül	1.33 ± 0.65	7.103	0.003*

1. E13.5, E15.5, E17,5 günlerde LGR5 markerında;

Marginal zonda anlamlı bir fark gözlenmemiştir. ($p>0.05$)

İntermediate tabakası ve ventriküler + subventriküler tabakada anlamlı sonuçlar elde edilmiştir. ($p<0.05$)



Resim 16. A’da E13,5 günlük Porcupine inhibitör grubu LGR5 boyaması. B’de E15,5 günlük Porcupine inhibitör, LGR5 boyaması. C ‘de E17, 5 günlük Porcupine inhibitör, LGR5 boyamasını 4x’lik büyütmede görülmektedir (M.Z; Marginal zon, İ.Z; İntermediate zon, V.Z; Ventriküler + Subventriüler zon).

4.3. Gruplar Arasında İHC Skor Farklılığı Karşılaştırması

İmmünohistokimyasal skorlamalar fetal beyin belirteçleri ile gruplar arasında immünohistokimyasal skorlama yapılmıştır. Skorlamayı istatistiksel olarak değerlendirmek için One Way ANOVA testi kullanıldı.

Tablo 16. Gruplar arasında İHC skor farklılığı karşılaştırması

Gruplar	Bölge	Kontrol (ort.±std.sapma)	DMSO (ort.±std.sapma)	Porcupine (ort.±std.sapma)	F değeri	P değeri
Beta-katenin						
13.5 gün	Marginal	1.64 ± 0.67	2.00 ± 0.82	1.33 ± 0.71	1.969	0.159
	İntermediate	0.91 ± 0.70	1.30 ± 0.95	0.67 ± 1.00	1.258	0.300
	Ventrikül	0.46 ± 0.69	0.80 ± 0.92	0.22 ± 0.67	1.375	0.270
15.5 gün	Marginal	2.00 ± 0.93	2.36 ± 0.75	1.79 ± 0.89	1.622	0.213
	İntermediate	1.25 ± 1.28	1.71 ± 0.91	1.50 ± 0.86	0.578	0.567
	Ventrikül	0.63 ± 0.92	0.93 ± 0.83	0.71 ± 0.73	0.428	0.656
17.5 gün	Marginal	2.50 ± 0.53	2.08 ± 0.67	2.07 ± 0.92	1.164	0.325
	İntermediate	2.20 ± 0.79	1.75 ± 0.75	2.07 ± 0.48	1.364	0.270
	Ventrikül	1.20 ± 0.79	1.08 ± 0.67	1.14 ± 0.54	0.086	0.917
S100-B						
13.5 gün	Marginal	1.28 ± 1.01	1.00 ± 0.47	1.11 ± 0.78	0.483	0.622
	İntermediate	0.73 ± 0.79	0.30 ± 0.48	0.67 ± 1.00	0.899	0.419
	Ventrikül	0.37 ± 0.51	0.20 ± 0.42	0.22 ± 0.67	0.290	0.750
15.5 gün	Marginal	1.63 ± 1.06	1.79 ± 0.98	1.29 ± 0.73	1.096	0.346
	İntermediate	1.13 ± 1.13	1.21 ± 1.05	0.50 ± 0.76	2.157	0.132
	Ventrikül	0.63 ± 0.74	0.57 ± 0.76	0.21 ± 0.43	1.483	0.242
17.5 gün	Marginal	1.90 ± 0.32	1.50 ± 0.67	1.42 ± 1.00	1.308	0.285
	İntermediate	1.50 ± 0.53	1.08 ± 1.00	1.17 ± 1.03	0.639	0.535
	Ventrikül	0.70 ± 0.48	0.58 ± 0.79	0.50 ± 0.52	0.282	0.756
LGR-5						
13.5 gün	Marginal	1.27 ± 1.01	1.90 ± 0.74	1.56 ± 0.73	1.442	0.254

Tablo 16. Gruplar arasında İHC skor farklılığı karşılaştırması (devamı)

	İntermediate	0.64 ± 0.92	0.90 ± 0.57	1.00 ± 0.87	0.558	0.579
	Ventrikül	0.46 ± 0.52	0.40 ± 0.70	0.33 ± 0.50	0.108	0.898
15.5 gün	Marginal	2.38 ± 0.52	2.43 ± 0.85	2.21 ± 0.70	0.317	0.731
	İntermediate	2.25 ± 0.46	2.14 ± 0.86	1.86 ± 0.86	0.757	0.477
	Ventrikül	1.63 ± 0.52	1.14 ± 0.66	0.93 ± 0.62	3.272	0.051
17.5 gün	Marginal	2.50 ± 0.71	2.33 ± 0.78	2.33 ± 0.89	0.153	0.859
	İntermediate	2.30 ± 0.68	2.25 ± 0.87	2.33 ± 0.89	0.031	0.969
	Ventrikül	1.60 ± 0.70	1.33 ± 0.65	1.33 ± 0.65	0.567	0.573

İmmünohistokimyasal skorların One Way ANOVA testi ile analiz edilmesi sonrasında;

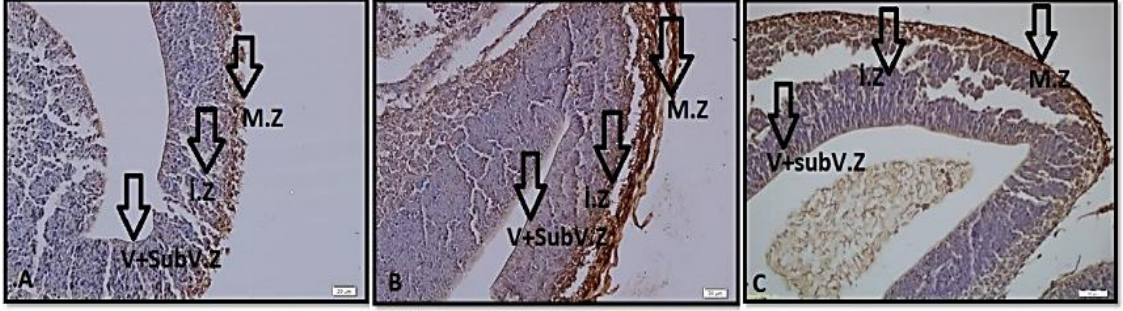
Gruplar arasında İmmünohistokimyasal skorlamalar karşılaştırıldığında anlamlı sonuçlar gözlenmemiştir. ($p>0.05$)



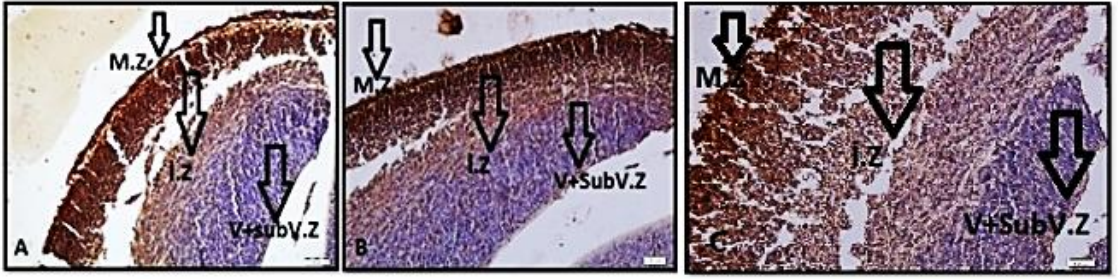
Resim 17. E13,5 günlük Beta-katenin boyamasında, A'da kontrol grubu, B'de DMSO grubunu, C'de ise Porcupine inhibitör grubunu x25'lik büyütmede görüyoruz. (M.Z; Marginal zon, İ.Z; İntermediate zon, V+SubV. Z; Ventriküler + Subventriüler zon)



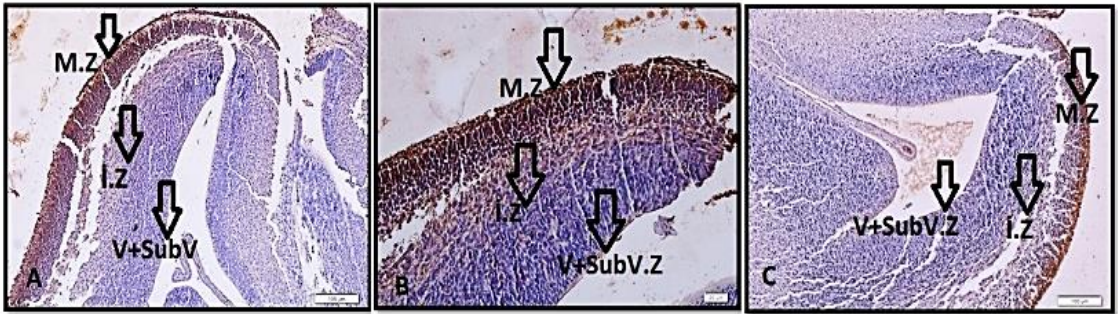
Resim 18. E13,5 günlük S100B boyamasında, A'da kontrol grubu, B'de DMSO grubunu, C'de ise Porcupine inhibitör grubunu x25'lik büyütmede görüyoruz. (M.Z; Marginal zon, İ.Z; İntermediate zon, V+SubV. Z; Ventriküler + Subventriüler zon)



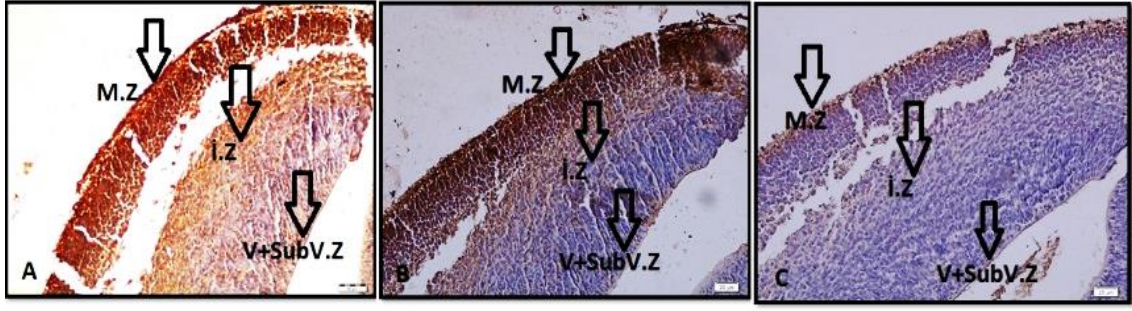
Resim 19. E13,5 günlük LGR5 boyamasında, A'da kontrol grubu, B'de DMSO grubunu, C'de ise Porcupine inhibitör grubunu x25'lik büyütmede görüyoruz. (M.Z; Marginal zon, İ.Z; İntermediate zon, V+SubV. Z; Ventriküler + Subventriüler zon)



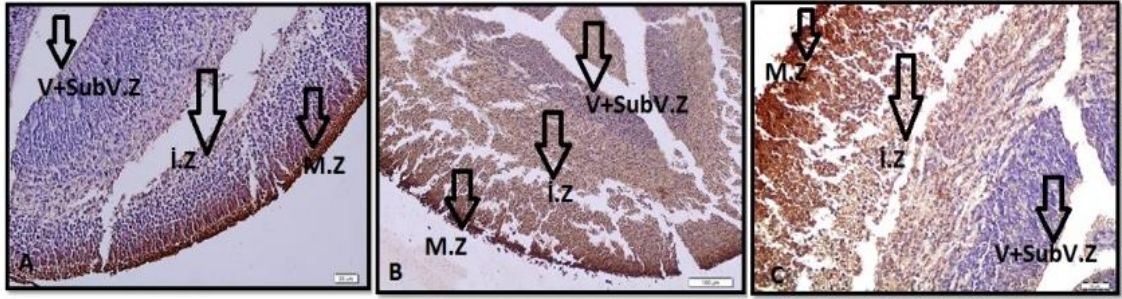
Resim 20. E15,5 günlük Beta katenin boyamasında, A'da kontrol grubu, B'de DMSO grubunu, C'de ise Porcupine inhibitör grubunu x25'lik büyütmede görüyoruz. (M.Z; Marginal zon, İ.Z; İntermediate zon, V+SubV. Z; Ventriküler + Subventriüler zon)



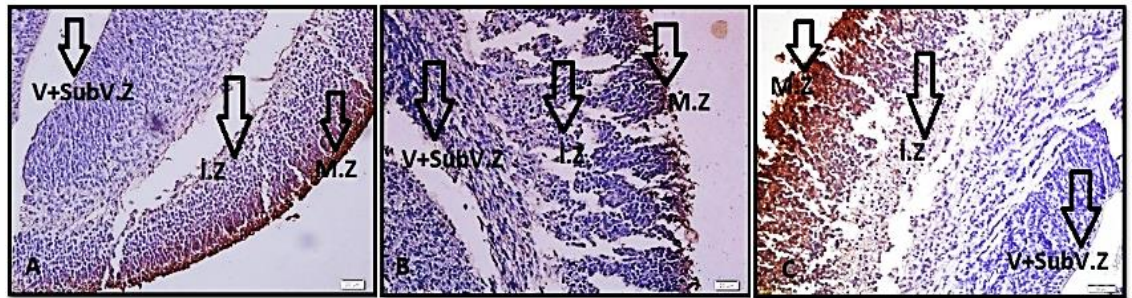
Resim 21. E15,5 günlük S100B boyamasında, A'da kontrol grubu, B'de DMSO grubunu, C'de ise Porcupine inhibitör grubunu x25'lik büyütmede görüyoruz. (M.Z; Marginal zon, İ.Z; İntermediate zon, V+SubV. Z; Ventriküler + Subventriüler zon)



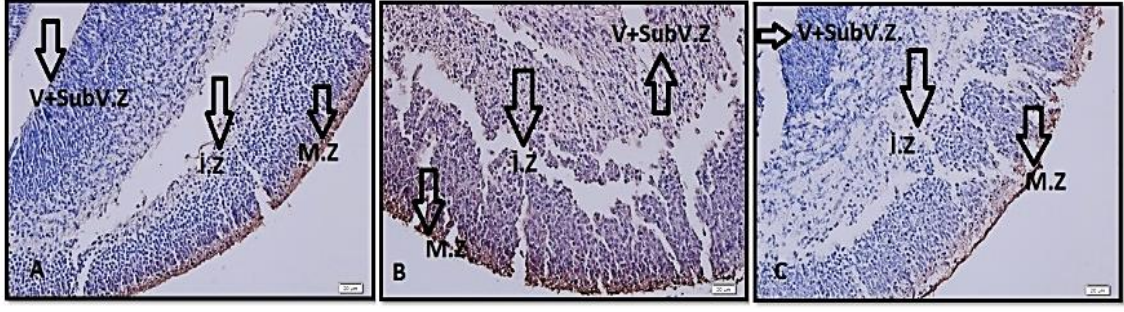
Resim 22. E15,5 günlük LGR5 boyamasında, A'da kontrol grubu, B'de DMSO grubunu, C'de ise Porcupine inhibitör grubunu x25'lik büyütmede görüyoruz. (M.Z; Marginal zon, İ.Z; İntermediate zon, V+SubV. Z; Ventriküler + Subventriüler zon)



Resim 23. E17,5 günlük Beta katenin boyamasında, A'da kontrol grubu, B'de DMSO grubunu, C'de ise Porcupine inhibitör grubunu x25'lik büyütmede görüyoruz. (M.Z; Marginal zon, İ.Z; İntermediate zon, V+SubV. Z; Ventriküler + Subventriüler zon)



Resim 24. E17,5 günlük S100B boyamasında, A'da kontrol grubu, B'de DMSO grubunu, C'de ise Porcupine inhibitör grubunu x25'lik büyütmede görüyoruz. (M.Z; Marginal zon, İ.Z; İntermediate zon, V+SubV. Z; Ventriküler + Subventriüler zon)



Resim 25. E17,5 günlük LGR5 boyamasında, **A**'da kontrol grubu, **B**'de DMSO grubunu, **C**'de ise Porcupine inhibitör grubunu x25'lik büyütmede görüyoruz. (**M.Z**; Marginal zon, **I.Z**; İntermediate zon, **V+SubV. Z**; Ventriküler + Subventriüler zon)

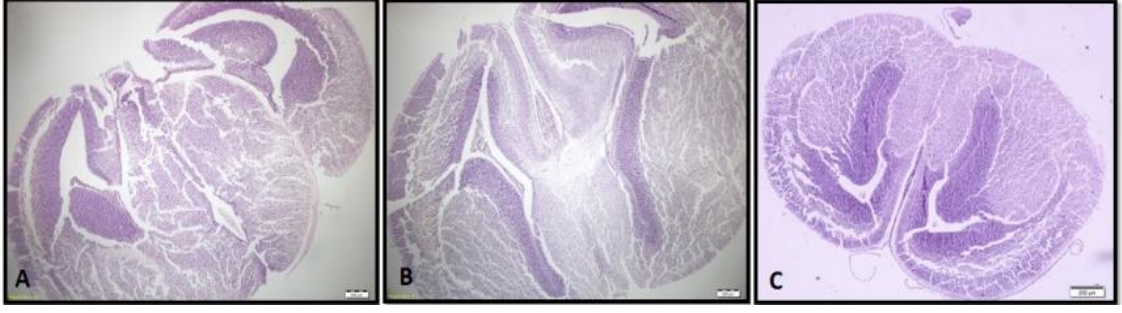
4.4. Histokimyasal Boyamaların Değerlendirilmesi

4.4.1. Hematoksilen-Eozin Değerlendirilmesi

Hematoksilen-Eozin boyama sonucunda tüm gruplar arası bütün tabakalar (marginal tabaka, intermediate tabaka, ventriküler+subventriküler tabaka) olağan görülmüştür. Morfolojik olarak bir değişiklik gözlenmemiştir.



Resim 26. **A**'da E13,5 günlük kontrol grubu, **B**'de DMSO grubu, **C**'de ise Porcupine inhibitör grubunu 4x'lik büyütmede görmekteyiz



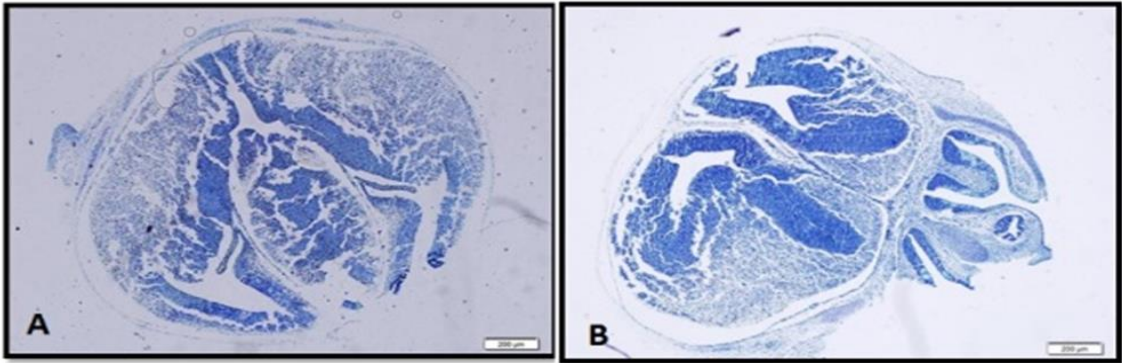
Resim 27. A'da E15,5 günlük kontrol grubu, B'de DMSO grubu, C'de ise Porcupine inhibitör grubunu 4x'lik büyütmede görmekteyiz



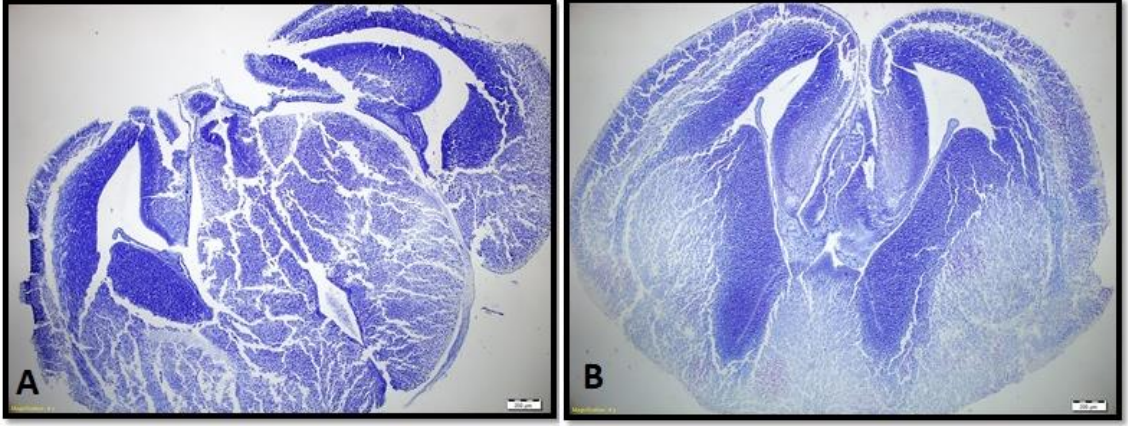
Resim 28. A'da E17,5 günlük kontrol grubu, B'de DMSO grubu, C'de ise Porcupine inhibitör grubunu 4x'lik büyütmede görmekteyiz

4.4.2. Toluidin Blue Boya Değerlendirilmesi

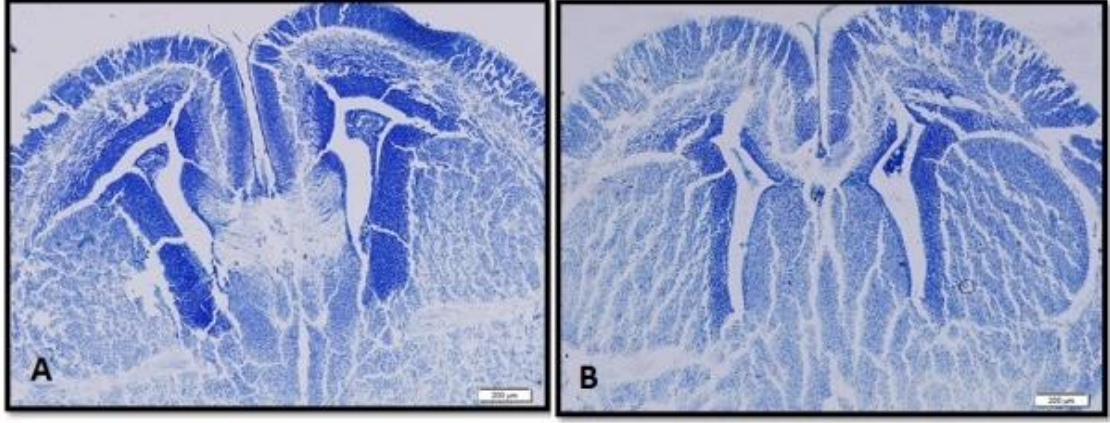
Toluidine Blue boyaması sinir sistemindeki bütün nöronların hücre gövdesini ve çekirdek boyamasını göstermektedir. Biz bu boyamada kontrol ve porcupine grubunu morfolojik olarak bütün tabakaları olağan şeklinde gözlemledik.



Resim 29. A'da E13,5 günlük kontrol grubu, B'de Porcupine inhibitör grubunu Toluidine boyamasını 4x'lik büyütmede görmekteyiz



Resim 30. A'da E15,5 günlük kontrol grubu, B'de Porcupine inhibitör grubunu Toluidine boyamasını 4x'lik büyütmede görmekteyiz



Resim 31. A'da E17,5 günlük kontrol grubu, B'de Porcupine inhibitör grubunu Toluidine boyamasını 4x'lik büyütmede görmekteyiz

5. TARTIŞMA

Wnt proteini pek çok fizyolojik ve de hücreyel alanda görev almaktadır. Hücre büyümesi, hücre adezyonu, hücre hareketi, hücre kaderinin belirlenmesi, hücre polaritesi ve farklılaşmasını düzenlediği bilindiği gibi ayrıca hem kök hücrelerinin özelleşmesinde ve değişimlerinde hem de pek çok dokunun embriyonik gelişiminde (özellikle merkezi sinir sistemi, organogenez, böbrek, meme bezleri ve dokusu, ve ekstremitelerde (uzuvlarda) önemli rol aldıkları da gösterilmiştir (Bengoa-Vergniory N, Kypta RM., 2015). Embriyolojik dönemde hem de pek çok kanser çeşitlerinde aktif olduğu bilinmektedir. Wnt sinyal ileti yolu son yıllarda kanser araştırmacıları ve embriyonik gelişim çalışan araştırmacılar tarafından oldukça dikkat çekmeye başlamıştır (Ilyas, 2005). Bengoa-Vergniory N ve ark.(2015) çalışmasına göre, Wnt'in embriyonik gelişimde merkezi sinir sisteminin gelişmesinde oldukça büyük bir role sahiptir.

Wnt ligandları embriyonik kök hücrelerin nöronal farklılaşmasında kritik bir rol oynar (Kikuchi A, Yamamoto H, Sato A, ve ark, 2011). Kanonik yol dediğimiz beta-katenin bağımlı Wnt sinyal yolu akson oluşumunu sağladığı gibi serebral granül nöron progenitörlerinin farklılaşmasını da düzenlemektedir (Shu Y, Xiang M, ve ark. 2018). Beta katenin bağımlı kanonikal yol da merkezi sinir sisteminin vaskülarizasyonu ve de kan-beyin bariyerinin oluşumu için çok fazla önemlidir. Yapılan çalışmalarda wnt sinyal yolağının beyin damar oluşumlarında (anjyogenez) ve kan-beyin bariyerinin oluşumuyla ilgili çok fazla bilgi bulunmamaktadır. Bazı araştırmacılara göre Wnt sinyali sadece gelişim için değil, vasküler ve nörodejeneratif hastalıklar için önemli olduğunu vurgulamışlardır (Kathleen H., Pauline C., ve ark.2018). Wnt sinyal mekanizması iskelet gelişimi ve uzuv gelişimi sırasında gereklidir (Rolfe RA., Shea CA., ve ark., 2017). Wnt agonisti olan R-spondin protein ailesi Lrp5/6 ile dolaylı olarak etkileşim halindedir. R-spondin proteinleri Wnt sinyalini güçlendirmekte görev almaktadır. Wnt sinyali güçlendiğinde Lrp5/6 reseptörüne bağlanması daha kolay bir hal almaktadır. Bu bağlanma ile kanonikal yolun transkripsiyonu sağlıklı bir şekilde gerçekleşir (Knight MN., Karuppaiah K, ve ark, 2018). R-spondin, wnt sinyalini arttırmak için LGR4, LGR5, LGR6 reseptörlerine ihtiyacı vardır. R-spondin protein ailesinin herhangi bir mutasyonu, dört uzuvun tamamen yokluğu ile karakterize edilen tetra-amelia sendromuna neden olmaktadır (Rolfe RA., Shea CA., ve ark., 2017). Bu verilere uyumlu olarak, bizim yaptığımız çalışmada da Porcupine grupları ile Kontrol ve DmsO grubu arasında fenotipik olarak uzuvların (kol, bacak, kuyruk) tomurcuk

şeklinde kaldığı saptanmıştır. Buna ek olarak Porcupine grubunu, kontrol ve Dmsso grubu ile kıyasladığımız da fetusların boy ve kilo oranları diğer iki gruba göre düşüştü olduğunu, hatta bazı fetusların hiç gelişmediği gözlemlendi. Dongmei Z, Xia G, Liyun M, ve ark. (2017) yaptığı araştırmaya göre Wnt sinyal yolunun plasenta gelişimindeki hücre göçlerinde önemli bir role sahip olduğunu araştırmışlar ve yaptıkları araştırmada sinsitotrofoblast tabakasında Wnt sinyal aktivasyonuna özgü genlerin ekspresyonuna bakmışlardır. Sonuç olarak plasenta tabakalarının gelişimi için Wnt sinyalinin gerekli olduğunu ortaya koymuşlardır. Yapmış olduğumuz araştırmada ise, günü gelen bazı gebe farelerin diseksiyonu esnasında sadece plasentalarının görüldüğü fakat hiç fetusun oluşmadığı gözlemlendi.

Yapılan Wnt- beyin çalışmalarına baktığımızda ise; Zhang Y, Zhang M, Li L, ve ark., (2018)'ın yapmış olduğu çalışmada prenatal hipoksinin Wnt beta katenin bağımlı sinyal yolu ile ilişkisini araştırmışlardır. Araştırma sonuçlarına göre hipoksiye maruz bırakılan gebe farelerin fetusları ile kontrol grubu kıyaslandığında Wnt sinyal yolağı ve hipoksi ilişkisi bakıldığında Wnt aktivasyonunun arttığı ve beyin ön gelişimini onardığı, fetal beyin gelişimi için yararlı bir etkiye sahip olduğunu ve koruyucu bir rol üstlendiğini göstermişlerdir. Liu T, 2, Shi Y, ve ark.'ın (2018) yapmış olduğu zebra balığı çalışmasında ise, zebra balığının erken gelişimi sırasında protein kinaz C (PKC) gen ekspresyonunun seviyesinin patolojik rolünü anlamak için farmakolojik olarak yüksek bir aktivasyonla uyarmışlardır. Bunun sonucunda ise PKC seviyesinin yüksekliği, nöral prekürsör proliferasyonda azalma, beyin gelişimi için gerekli olan beta kateninde bozulmaya ve buna bağlı olarak beyinde büyüme, motor nöronları anomalilerine sebebiyet vermişlerdir. Bizim yapmış olduğumuz çalışmada ise beta katenin bağımlı Wnt sinyal yolağını inhibe ederek beyindeki beta katenin belirtecinin immün boyama ile etkisine bakıldı. Ve sonuç olarak beta katenin'in kontrol, dmsso ve porcupine grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir bulguya rastlamadık. Fakat kontrol, dmsso ve porcupine gruplarını ayrı ayrı ve gün olarak ele aldığımızda E13.5, E15.5, E17.5 bu günlerdeki Beta katenin boyamasının protein ekspresyonundaki artışı gözlemledik.

S100B proteini, astrositler tarafından eksprese edilen ve beyinde sayıca fazla bulunan proteinlerden biridir. S100B proteini yapısı gereği diğer proteinlerle fonksiyonel ve düzenleyici etkileşimlere sahiptir (Sorci G., Bianchi R., ve ark. 2010 ve Ostendorp T., Diez J., Heizmann C. Ve ark. 2011). S100B proteini gelişmekte olan nöronları hücresel

olabilecek strese karşı koruma, gelişmekte olan nöronların farklılaşmasını harekete geçirme, hafıza ve öğrenmeye dahil süreçleri geliştirir, sinirsel doku hasarlarını onarma ve hücre içi konsantrasyonunu artırıp bazı reseptörler üzerinden sinyal göndererek proinflatuar bir sitokin gibi davranarak nükleer faktör aktivasyonlarında (DNA hasarında devreye giren kanonikal ve non kanonikal yollar) geri besleme döngüsünü sağlamaktadır (Rothermundt M., Peters M., ve ark. 2003). S100B'nin işlevlerine baktığımızda hücre içi kalsiyum homeostazının bir parçası olduğundan ikincil habercileri aktarmada rolü vardır. Böylelikle hücre döngüsünde ve farklılaşmasında rolü büyüktür (Heizmann CW, Fritz G, Schafer BW., 2002, ve Schafer BW, Heizmann CW. 1996). S100B'nin fizyolojik fonksiyonel etkilerine baktığımızda, S100B'nin konsantrasyonunun düşük olması yararlı iken yüksek olması çeşitli beyinsel rahatsızlıklara sebebiyet gösterir (Rothermundt M., Peters M., ve ark. 2003, Van Eldik LJ, Wainwright MS., 2003). Yapılan hayvan çalışmalarında, S100B'nin konsantrasyonundaki değişiklikler davranışsal bozukluklara sebep olmaktadır. Klinik olarak insanlarda tespit edilen beyin travmaları, Alzheimer, nörodejeneratif hastalıklar ve iskemi, astrositlerin yok olmasıyla S100B proteininin konsantrasyonundaki artışı ile ilişkilidir (Rothermundt M., Peters M., ve ark. 2003). Biz de bu yüzden yaptığımız çalışmada beyin ile ilgili en iyi belirteçlerden biri olan S100B'yi seçtik. Seçtiğimiz bu belirtecin Wnt ile ilgili ilişkisine hem de embriyonik beyin gelişimindeki etkisine bakmak için bu belirteç ile immün boyama yaptık. Çıkan sonuçlarımız kontrol, DMSO, ve ilaç ile kıyasladığımızda anlamlı bir veri elde edilemedi. Fakat kontrol, DMSO ve porcupine gruplarını ayrı ayrı ve gün olarak ele aldığımızda E13.5, E15.5, E17.5 bu günlerdeki S100B boyamasının protein ekspresyonundaki artışı gözlemledik.

LGR5 (lösin bakımından zengin, tekrar içeren G-proteini) proteini, Wnt-agonist'i olan R-spondin'in reseptörüdür. Lgr5 önemli kök hücre belirteçlerindedir. Biyolojik rolüne baktığımızda beyinde ifade edilir fakat sinir sistemindeki rolü tam bilinmemektedir (Yu Y, Moberly AH, ve ark., 2017). Yapılan bazı biyoinformatik analizlerde LGR5'in nöron gelişimi ve işlevleriyle ilgili ilişkisinin olduğu gösterilmiştir. R-spondin aile reseptörü olan Lgr5 omurilik, beyin sapında yüksek oranda ifade edilmektedir (Song SJ, Mao XG, verk., 2015). Hatta Hiraoka K, Hayashi T, ve ark.'nın (2015) yılında yapmış olduğu çalışmada SOX9'un Lgr5 aracılı glioblastoma tümör oluşumuna bakmışlardır. Bu çalışmaya göre SOX9 ekspresyon artışı, Lgr5'in de glioblastoma tümör oluşumunda ekspresyonunun arttığını göstermişlerdir. Sox 9 ekspresyonunu düşürülmesi ile hücre proliferasyonun ve tümör oluşumunun baskılandığını ve bu transkripsiyonel düzenlemenin Lgr5 aracılı

olduğunu göstermişlerdir. Bizim çalışmamızda bloke edilmiş Wnt sinyal yolundaki Lgr5 belirtecinin rolünün etkisine bakmaktı fakat yapılan immüohistokimyasal boyamalarla, gruplar için gün bakımından (E13.5, E15.5, E17.5) değerlendirildiğinde anlamlı ifadeler bulunurken, gruplar arası kontrol, dmsö ve porcupine grupları kıyaslandığında anlamlı bir veri elde edilemedi.

Hematoksilen –eozin boyama ve Toluidine Blue boyaması değerlendirmelerimizde tüm gruplar arası beyin yapıları olağan görünümdeydiler. Muhtemelen verilen ilaç dozunun gen ifadelerini tamamen susturamamasından kaynaklanmaktadır. Ya da verilen dozun yeteri kadar etki etmediği için herhangi bir bozulmaya rastlanmadı.

İlerleyen çalışmalarda verilen ilaç dozunun miktarını arttırıp PCR veya qPcr gibi yöntemler ile gen ekspresyonlarına bakılıp Wnt- β katenin bağımlı sinyal yolağının beyin üzerindeki etkisi ve değerlendirilmesi daha çok açıklık getirip daha çok fikir sunacaktır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada beyin gelişimi sırasında Wnt- β katenin bağımlı sinyal yolağının etkisine bakmayı amaçladık. Yaptığımız çalışmanın sonucunda kullanmış olduğumuz inhibitörün embriyolojik etkisini boy, kilo ve uzuv gelişiminde anlamlı bir düşüş ve uzuvların tomurcuk şeklinde kalıp gelişmediği görüldü. İmmünohistokimyasal değerlendirmeye iki şekilde bakıldı: bunlardan ilk olarak, kontroldeki günleri (E13.5, E15.5, E17.5), DMSO günleri (E13.5, E15.5, E17.5) ve porcupinedeki günleri (E13.5, E15.5, E17.5) kendi içlerinde ayrı ayrı ele aldığımızda kullanmış olduğumuz β -katenin, S100B, Lgr5 belirteçlerinin embriyonik gün artışı ile doğru orantılı şekilde ekspresyonlarda anlamlı bir değişiklik (artış) gözlemlendi. İkinci değerlendirme olarak grupları (Kontrol, DMSO, Porcupine) kıyaslayarak yapmış olduğumuz immünohistokimyasal boyamalarda değerlendirilmelerde istatistiksel olarak anlamlı ifadeler elde edilemedi. Kullanılan belirteçlerle birlikte beyin – nöron spesifik ve kök hücre spesifik başka belirteçlerin de kullanılması ve çalışılmanın bu açıda genişletilmesi gerektiği düşünüldü. Wnt mekanizmasının bilindiği gibi sadece beta katenin bağımlı yolu değil, non-kanonik iki mekanizması da mevcuttur. Beta katenin bağımlı yol inhibe edildiği için non-kanonik yolun bu esnada etki etmiş olma olasılığından dolayı da sonuç alınmamış olabilir. Wnt sinyalizasyonu birden çok mekanizma ile kontrol edilmektedir ve oldukça karmaşık bir ağa sahiptir. Ve bu nedenle yapmış olduğumuz bu çalışmada diğer mekanizmalardan etkilenmesi söz konusu olabilir. Bu yüzden de ilerleyen çalışmalarda sinyali kontrol eden birden çok mekanizmanın (sinyal yolakların) hedef odaklı olması ayrıca beyin spesifik farklı genlerin seçilerek sinyal yolağı ile ilişkili olarak bunların düzeylerinin belirtilmesi daha doğru bir yaklaşım olacaktır. Ayrıca farklı moleküler biyolojik yöntemler ile değerlendirilerek pek çok açıklık getirilip fikir sunulabilir. Başka çalışmalarda erken dönem beyin gelişimlerin değerlendirilmesi önemli olacaktır.

KAYNAKLAR

Akisik E, Buğra D, Yamaner S, Dalay N. Analysis of β -catenin alterations in colon tumors: a novel exon 3 mutation. *Tumour Biology* 2011;32:71-76.

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Molecular Biology of the cell, 4th Ed. 2002 Chapter 21.

Andersson ER, Salto' C, Villaescusa JC et al. Wnt5a cooperates with canonical Wnts to generate midbrain dopaminergic neurons in vivo and in stem cells. 2012. Proc Natl Acad Sci.

Andoniadou CL., Martinez – Barbera JP. Development mechanisms directing early anterior forebrain specification in vertebrates. *Cell Molecular Life Sciences*. Oct;70(20):3739-52.2013

Jack Ashwell K.W, Bobryshev Y. Microglia in the regenerating and degenerating central nervous system. Wolfgang J. Streit , 27, Springer-Verlag New York , 2002

Bayer S.A., Altman J. Adult Neurogenesis: Stem Cells and Neuronal Development in the Adult Brain. Gerd Kempermann Oxford, UK: Oxford Univ. Press 2006. *European Journal of Neurology* 2007

Bayer SA, ve Altman J, Neocortical Development, Raven Press, Ltd., 118S Avenue of the Americas, New York, New York 10036, 1991, 3-11

Behrens J, Jerchow BA, Würtele M et al. Functional interaction of an axin homolog, conductin, with β -catenin, APC, and GSK3 β . *Science* 1998;280:596-599.

Behrens J, Jerchow BA, Würtele M, Grimm J, Asbrand C, Wirtz R, et al. Functional interaction of an axin homolog, conductin, with β -catenin, APC, and GSK3 β . *Sciences* 1998;280(5363):596-9.

Bel-Vialar S, Itasaki N, Krumlauf R. Initiating Hox gene expression; in the early chick neural tube differential sensitivity to FGF and RA signaling subdivides the HoxB genes in two distinct groups. *Development*. 129(22):5103-15.2002

Bengoa-Vergniory N, Kypta RM. Canonical and noncanonical Wnt signaling in neural stem/progenitor cells. *Cell Molecular Life Sciences*. 2015 Nov;72(21):4157-72. 015-2028-6. Epub 2015 Aug 26.

andreasenBhanot, P., Brink, M., Samos, C.H., Hsieh, J.C., Wang, Y., Macke, J.P., Andrew, D., Nathans, J., Nusse, R. 1996. A new member of the frizzled family from *Drosophila* functions as a Wingless receptor. *Nature* 382(6588):225-30.

Blakely BD, Bye CR, Fernando CV et al. Wnt5a regulates midbrain dopaminergic axon growth and guidance. 2011. PLoS ONE 6:e18373. doi:10.1371/journal.pone.0018373

Bolos V, Grego – Bessa J, de la Pompa JL. Notch signaling in development and cancer. *Endocr. Rev.* 28(3): 339-63.2007

Bramanti V1, Tomassoni D, Avitabile M, Amenta F, Avola R. Biomarkers of glial cell proliferation and differentiation in culture. *Front Bissci (Schol Ed).* Jan 1;2:558-70.2010

Butz S, Kemler R. Distinct cadherin-catenin complexes in Ca(2+)-dependent cell-cell adhesion. *FEBS Lett.* 1994, 355: 195-200.

Cadigan KM, Liu YI. Wnt signaling: complexity at the surface. *Journal Cell Sciences* 2006;119 (Pt 3):395-402.

Campbell R.J, Pignatelli M. Molecular histology in the study of solid tumours. *Molecular Pathol.* 2002, 55: 80–82.

Capilla-Gonzalez V, Cebrian-Silla A, Guerrero-Cazares H, Garcia-Verdugo JM, Quiñones-Hinojosa A. Age-related changes in astrocytic and ependymal cells of the subventricular zone. 2014. *Glia.* May;62(5):790-803.

Carmon KS, Gong X, Lin Q, Thomas A, Liu Q. R-spondins function as ligands of the orphan receptors LGR4 and LGR5 to regulate Wnt/ β -catenin signaling. *Proc Natl Acad Sciences USA.* 2011;108:11452–7.

Caviness VS Jr, Nowakowski RS, Bhide PG. Neocortical neurogenesis: morphogenetic gradients and beyond. *Trends Neurosciences.* Aug;32(8):443-50. 2009

Chen B-Y, Wang X, Wang Z-Y et al Brain-derived neurotrophic factor stimulates proliferation and differentiation of neural stem cells, possibly by triggering the Wnt/ β -catenin signaling pathway. 2013. *J Neurosciences.* Res 91:30–41

Chen X, Yang J, Evans PM, Li u C. Wnt signaling: the good and the bad. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 2008;40(7):577-94.

Choudhry Z, Rikani AA, Choudhry AM, et al. Sonic hedgehog signalling pathway: a complex network. *Ann Neurosciences.* 2014; 21(1): 28-31.

Ciani L, Boyle KA, Dickins E et al. Wnt7a signaling promotes dendritic spine growth and synaptic strength through Ca⁺²/calmodulin-dependent protein kinase II. 2011. *Proc Natl Acad Sci*.

Ciani L, Salinas PC: WNTs in the vertebrate nervous system: From patterning to neuronal connectivity. 2005 *Nat Rev Neurosciences* 6: 351-362.

Cong F, Schweizer L, Varmus H. Wnt signals across the plasma membrane to activate the β -catenin pathway by forming oligomers containing its receptors, Frizzled and LRP. *Development.*, 131: 5103-5115. 2004

Copp AJ, Greene ND. Genetics and development of neural tube defects. *J Pathol.* 220 (2): 217-30. 2010

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

Daugherty RL, Gottardi CJ. Phospho-regulation of Beta-catenin adhesion and signaling functions. *Physiology (Bethesda)* 2007;22: 303-9.

Delaunay D, Cortay V, Patti D et al. Mitotic spindle asymmetry: a Wnt/PCP-regulated mechanism generating asymmetrical division in cortical precursors. 2014 *Cell Rep* 6:400–414.

Detrait ER, George TM, Etchevers HC, Gilbert JR, Vekemans M, Speer MC. Human neural tube defects: developmental biology, epidemiology, and genetics. *Neurotoxicol Teratol.* 27(3): 515-24.2005

Deutsch JS. Homeosis and beyond. What is the function of the Hox genes? *Adv Exp Medical Biology.* 689:155-65.2010

Donato R, Sorci G, Riuzzi F, Arcuri C, Bianchi R, Brozzi F, et al. S100B's double life: intracellular regulator and extracellular signal. *Biochimica et Biophysica Acta* 2009;1793:1008-22.

Donato R. Intracellular and extracellular roles of S100 proteins. *Microsc Res Tech* 2003; 60:540-51.

Donato R. S100: a multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles. *Int J Biochem Cell Biolgy* 2001; 33:637-68.

Donma MM, Donma O. Wnt signaling pathway in cardiovascular and other clinical diseases: Review. *Turkiye Klinikleri J Cardiovasc Sc* 2010;22:93-103.

Duggal N, Schmidt-Kastner R, Hakim AM. Nestin expression in reactive astrocytes following focal cerebral ischemia in rats. *Brain Res. Sep* 12;768(1-2):1-9.1997

Fernando CV, Kele J, Bye CR et al. Diverse roles for Wnt7a in ventral midbrain neurogenesis and dopaminergic axon morphogenesis. 2014 *Stem Cells Developments* 23:1991–2003

Fevr T, Robine S, Louvard D, Huelsken J. Wnt/beta-catenin is essential for intestinal homeostasis and maintenance of intestinal stem cells. *Molecular Cell Biology.*2007;27:7551–7559.

Finlay BL1, Darlington RB., Linked regularities in the development and evolution of mammalian brains. *Science.* 1995 Jun 16;268(5217):1578-84

Fraser E, Young N, Dajani R, Franca-Koh J, Ryves J, Williams RS, et al. Identification of the Axin and Frat binding region of glycogen synthasekinase-3. *Journal Biology Chemistry* 2002;277(3):2176-85.

Gamallo C, Palacios J, Moreno G, Calvo de Mora J, Suárez A, Armas A. Beta-catenin expression pattern in stage I and II ovarian carcinomas: relationship with beta-catenin gene mutations, clinicopathological features, and clinical outcome. *Am J Pathol* 1999;155:527-536.

Gibson P, Tong Y, Robinson G, Thompson MC, Currle DS, Eden C, Kranenburg TA, Hogg T, Poppleton H, Martin J, Finkelstein D, Pounds S, Weiss A, Patay Z, Scoggins M, Ogg R, Pei Y, Yang ZJ, Brun S, Lee Y, Zindy F, Lindsey JC, Taketo MM, Boop FA, Sanford RA, Gajjar A, Clifford SC, Roussel MF, McKinnon PJ, Gutmann DH, Ellison DW, Wechsler-Reya R, Gilbertson RJ: Subtypes of medulloblastoma have distinct developmental origins. , 2010 *Nature* 468: 1095-1099.

Gilbert SF. *Developmental Biology* 7th. Ed. 2000Chapter 13.

Gil-Sanchis C, Cervello I, Mas A, Faus A, Pellicer A, Simon C. Leucine-rich repeat-containing G-protein-coupled receptor 5 (Lgr5) as a putative human endometrial stem cell marker. *Mol Hum Reprod.* 2013;19:407–414.

Gulacsi AA, Anderson SA. Beta-catenin-mediated Wnt signaling regulates neurogenesis in the ventral telencephalon. 2008 *Nat Neurosci* 11(12):1383–1391.

- Hagen T, Vidal-Puig A.** Characterization of the phosphorylation of beta-catenin at the GSK-3 priming site Ser45. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;294:324-328.
- Hall AC, Lucas FR, Salinas PC et al.** Axonal remodeling and synaptic differentiation in the cerebellum is regulated by WNT-7a signaling. 2000. *Cell* 100:525–535
- Hausmann G., Bänziger C., Basler K.** Helping Wingless take flight: how WNT proteins are secreted. *Nat Rev Molecular Cell Biology*, 8(4);331-6. 2007.
- He X, Semenov M, Tamai K, et al.** LDL receptor-related proteins 5 and 6 in Wnt/b-catenin signaling: arrows point the way. *Development* 2004; 131:1663-77.
- He X., Axelrod D.J.A.** WNTer wonderland in Snow bird. *Development*, 133(14);2597- 603. 2006.
- Heizmann C.** The multifunctional S100 protein family. *Methods Molecular Biology* 2002; 172:69-80
- Heizmann CW, Fritz G, Schafer BW.** S100 proteins: structure, functions and pathology. *Front Biosci: J Virtual Library*. 2002;7:d1356–d1368.
- Hirabayashi Y, Itoh Y, Tabata H et al.** The Wnt/betacatenin pathway directs neuronal differentiation of cortical neural precursor cells. 2004 *Development* 131:2791–2801.
- Hiraoka K, Hayashi T, Kaneko R, Nasu-Nishimura Y, Koyama-Nasu R, Kawasaki Y, Akiyama T.** SOX9-mediated upregulation of LGR5 is important for glioblastoma tumorigenicity. 2015. *Biochem Biophys Res Commun*. 2015 May 1;460(2):216-21.
- Hsu SY, Liang SG, Hsueh AJ** “Characterization of two LGR genes homologous to gonadotropin and thyrotropin receptors with extracellular leucine-rich repeats and a G protein-coupled, seven-transmembrane region”. *Molecular Endocrinol*. December 1998.. 12 (12): 1830–45.
- Hu J, Dong A, Fernandez-Ruiz V, et al.** Blockade of Wnt signaling inhibits angiogenesis and tumor growth in hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 2009; 69:6951-9. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-0541
- Huber AH, Weis WI.** The structure of the beta-catenin/E-cadherin complex and the molecular basis of diverse ligand recognition by beta-catenin. *Cell*. 2001, 105: 391-402.

Huttunen, HJ, Kuja-Panula J, Sorci G, Agneletti AL, Donato R, Rauvala H. Coregulation of neurite outgrowth and cell survival by amphoterin and S100 proteins through RAGE activation. *Journal Biology Chem* 2000; 275:40096-105.

Ingham P. W.; McMahon AP. Hedgehog signaling in animal development: Paradigms and principles. *Genes & Development* 15 (23):3059-87.2001

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

Jackson FR, Ng FS, Sengupta S, You S, Huang Y. Glial cell regulation of rhythmic behavior. *Methods Enzymol.* 2015; 552: 45-73

Ji TH, Grossmann M, Ji I. G protein-coupled receptors. I. Diversity of receptor-ligand interactions. *Journal Biology Chem.* 1998;273:17299–17302.

Junqueira CL., Carneiro J. Temel Histoloji, Yener Aytekin. Seyhun Solakoğlu. Nobel kitabevleri. 2003. 162-163

Kaldis P, Pagano M. Wnt signaling in mitosis. *Development Cell* 2009; 17:749- 50.

Kathleen H., Pauline C., Rodrigo D., Cora W., Yuki W., Kathrin S., Marvin H., Stefan G., Heinz-Georg B., Markus A., Ralf H. A., Benoit V, ve Wiebke H. Wnt/ β -catenin signaling regulates VE-cadherin-mediated anastomosis of brain capillaries by counteracting S1pr1 signaling. *Nat Commun.* 2018 Nov 19.

Kierszenbaum A.L. Histoloji ve Hücre Biyolojisi Patolojiye Giriş. Ankara, Palme Yayıncılık, 2006.

Kikuchi A, Yamamoto H, Sato A, Matsumoto S. New insights into the mechanism of Wnt signaling pathway activation. *Int Rev Cell Molecular Biology.* 2011;291:21-71.

Kikuchi A, Yamamoto H. Tumor formation due to abnormalities in the beta-catenin-independent pathway of Wnt signalling. *Cancer Sciences* 2008; 99:202-8.

Kikuchi A. Roles of Axin in the Wnt signalling pathway. *Cell Signal* 1999;11:777-788.

Kishida S, Yamamoto H, Hino S, Ikeda S, Kishida M, Kikuchi A. DIX domains of Dvl and axin are necessary for protein interactions and their ability to regulate betacatenin stability. *Molecular Cell Biology* 1999;19:4414-4422.

Kitajewski J., Mason J., Varmus H.E. Interaction of Wnt-1 proteins with the binding protein BiP. *Molecular Cell Biology* 12(2); 784-90. 1992.

Knight MN., Karuppaiah K, Lowe M, Mohanty S, Zondervan RL, Bell S, Ahn J, Hankenson KD. R-spondin-2 is a Wnt agonist that regulates osteoblast activity and bone mass. *Bone Res.* 2018 Aug 14;6:24.

Kolasinski J, Takahashi E, Stevens AA, Benner T, Fischl B, Zöllei L, Grant PE. Radial and tangential neuronal migration pathways in the human fetal brain: anatomically distinct patterns of diffusion MRI coherence. *2013Neuroimage.* Oct 1;79:412-22.

Kolligs FT, Kolligs B, Hajra KM. Gamma-catenin is regulated by the APC tumor suppressor and its oncogenic activity is distinct from that of beta-catenin. *Genes Development.* 2000, 14: 1319-1331.

Komekado H., Yamamoto H., Chiba T., Kikuchi A. Glycosylation and palmitoylation of Wnt-3a are coupled to produce an active form of Wnt-3a. *Genes Cells,* 12(4);521-34. 2007.

Kühl M, Sheldahl LC, Park M, et al. The Wnt/Ca²⁺ pathway: a new vertebrate Wnt signaling pathway takes shape. *Trends Genet* 2000; 16:279-83.

Lai, S.L., Chien, A.J., Moon, R.T., . Wnt/Fz signaling and the cytoskeleton: potential roles in tumorigenesis. *Cell Res.* 19, 532–545. Lane, S.W., et al., 2011. Differential niche and Wnt requirements during acute myeloid leukemia progression. *2009 Blood* 118, 2849–2856.

Lake BB, Sokol SY. Strabismus regulates asymmetric cell divisions and cell fate determination in the mouse brain. *2009. J Cell Biology* 185:59–66.

Lee SM, Tole S, Grove E, McMahon AP. A local Wnt-3a signal is required for development of the mammalian hippocampus. *2000 Development* 127:457–467

Lee YN, Gao Y, Wang HY. Differential mediation of the Wnt canonical pathway by mammalian Dishevelleds-1, - 2, and -3. *Cell Signal* 2008;20:443-452.

Lima JE, Takayanagui OM, Garcia LV, Leite JP. Use of neuron-specific enolase for assessing the severity and outcome in patients with neurological disorders. *Braz J Medical Biology Res* 2004; 37:19-26.

Liu CC, Prior J, Piwnica-Worms D, et al. LRP6 overexpression defines a class of breast cancer subtype and is a target for therapy. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107:5136-41.

Liu J, Pan S, Hsieh MH, Ng N, Sun F, Wang T, Kasibhatla S, Schuller AG, Li AG, Cheng D, Li J, Tompkins C, Pferdekamper A, Steffy A, Cheng J, Kowal C, Phung V, Guo G, Wang Y, Graham MP, Flynn S, Brenner JC, Li C, Villarroel MC, Schultz PG,

Wu X, McNamara P, Sellers WR, Petruzzelli L, Boral AL, Seidel HM, McLaughlin ME, Che J, Carey TE, Vanasse G, Harris JL. Targeting Wnt-driven cancer through the inhibition of Porcupine by LGK974. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2013 Dec 10;110(50):20224-9.

Liu J, Stevens J, Rote CA, Yost HJ, Hu Y, Neufeld KL, White RL, Matsunami N. Siah-1 mediates a novel beta-catenin degradation pathway linking p53 to the adenomatous polyposis coli protein. *Mol Cell*. 2001, 7: 927-936

Liu T, Shi Y, Chan MTV, Peng G, Zhang Q, Sun X, Zhu Z, Xie Y, Sham K W Y, Li J, Liu X, Ho IHT, Gin T, Lu Z, Wu WKK, Cheng CHK. Developmental protein kinase C hyper-activation results in microcephaly and behavioral abnormalities in zebrafish. *Transl Psychiatry*. 2018 Oct 23;8(1):232.

Lustig B, Behrens J. The Wnt signaling pathway and its role in tumor development. *Journal Cancer Res Clinic Oncology* 2003; 129: 199-21.

MacDonald BT, Yokota C, Tamai K, et al. Wnt signal amplification via activity, cooperativity, and regulation of multiple intracellular PPPSP motifs in the Wnt co-receptor LRP6. *Journal Biology Chem* 2008; 283:16115-23.

Madison BB, Braunstein K, Kuizon E, Portman K, Qiao XT, Gumucio DL. Epithelial hedgehog signals pattern the intestinal crypt-villus axis. *Development*. 2005;132:279–289.

Martini R, Mohajeri MH, Kasper S, Giese KP, Schachner M. Mice doubly deficient in the genes for P0 and myelin basic protein show that both proteins contribute to the formation of the major dense line in peripheral nerve myelin. *Journal Neurosciences* 1995; 15:4488-95.

McCrea PD, Turck CW, Gumbiner B. A homolog of the armadillo protein in *Drosophila* (plakoglobin) associated with E-cadherin. *Science* 1991;254:1359-1361.

McDonald T, Wang R, Bailey W, Xie G, Chen F, Caskey CT, Liu Q. “Identification and cloning of an orphan G protein-coupled receptor of the glycoprotein hormone receptor subfamily”. *Biochem Biophys Res Commun*. Jul 1998. 247 (2): 266–70.

Mentink RA, Middelkoop TC, Rella L, Ji N, Tang CY, Betist MC, van Oudenaarden A, Korswagen HC. Cell intrinsic modulation of Wnt signaling controls neuroblast migration in *C. elegans*. *Development Cell*. 2014 Oct 27;31(2):188-201.

Mikels, A.J, Nusse, R. Wnts as ligands: processing, secretion and reception. *Oncogene* 25(57):7461-8. 2006.

Miller JR. The Wnts. *Genome Biol* 2002;3(1):RE VI EWS3001.

Montiel JF, Vasistha NA, Garcia-Moreno F, Molnár Z. From sauropsids to mammals and back: New approaches to comparative cortical development. *J Comp Neurol.* 2016 Feb 15;524(3):630-45. doi: 10.1002/cne.23871. Epub 2015 Aug 20.

Moore LK, Persaud TVN, Torchia GM. Klinik Yönleriyle İnsan Embriyolojisi (10. Baskı). Hakkı Dalçık. Nobel Tıp Kitabevleri. Mayıs 2016 – İstanbul. Mouse Timeline Detailed. Php.med.unsw.edu.au/embryology

Munji RN, Choe Y, Li G et al. Wnt signaling regulates neuronal differentiation of cortical intermediate progenitors. 2011 *Journal Neuroscience* 31:1676–1687.

Nagdyman N, Komen W, Ko HK, Müller C, Obladen M. Early biochemical indicators of hypoxic-ischemic encephalopathy after birth asphyxia. *Pediatr Res* 2001; 49:502-6.

Niehrs C: The complex world of WNT receptor signalling. 2012. *Nature Revue Molecular Cell Biology* 13: 767-779.

Noh M, Smith JL, Huh YH, Sherley JL. A resource for discovering specific and universal biomarkers for distributed stem cells. *PLoS One.* 2011;6:e22077.

Nusse R. Wnt signaling in disease and in development. *Cell Res*;15(1):28-32. 2005.

Nusse, R., Varmus, H.E. Wnt genes. *Cell.* 69(7) ;1073-87, 1992.

Nusse R, Varmus HE. Many tumors induced by the mouse mammary tumor virus contain a provirus integrated in the same region of the host genome. 1982. *Cell*, Nov;31(1):99-109.

Nusse R, Brown A, Papkoff J, Scambler P, Shackleford G, McMahon A, Moon R, Varmus H. A new nomenclature for int-1 and related genes: the Wnt gene family. 1991. *Cell*, Jan 25;64(2):231.

Orsulic S, Huber O, Aberle H, Arnold S, Kemler R. E-cadherin binding prevents beta-catenin nuclear localization and beta-catenin/ LEF-1-mediated transactivation. *Journal Cell Sciences* 1999;112 (Pt 8):1237-45.

Ostendorp T., Diez J., Heizmann C. W., Fritz G., The crystal structures of human S100B in the zinc- and calcium-loaded state at three pH values reveal zinc ligand swapping. *Biochim. (2011). Biophys. Acta* 1813, 1083–1091.

Ozawa M, Baribault H, Kemler R. The cytoplasmic domain of the cell adhesion molecule uvomorulin associates with three independent proteins structurally related in different species. *EMBO J* 1989;8:1711-1717.

Park D, Xiang AP, Mao FF, Zhang L, Di CG, Liu XM, Shao Y, Ma BF, Lee JH, Ha KS, Walton N, Lahn BT. Nestin is Required for the proper Self-Renewal of Neural Stem CELLS. *Stem Cells*. Oct20.2010

Partanen J. FGF signalling pathways in development of the midbrain and anterior hindbrain. 2007. *J Neurochem*. Jun;101(5):1185-93.

Peifer M, McCrea PD, Green KJ, Wieschaus E, Gumbiner BM. The vertebrate adhesive junction proteins beta-catenin and plakoglobin and the Drosophila segment polarity gene armadillo form a multigene family with similar properties. *Journal Cell Biology* 1992;118:681-691.

Pino D, Choe Y, Pleasure SJ. Wnt5a controls neurite development in olfactory bulb interneurons. 2011 *Am Soc Neurochem* 3:125–133.

Portakal O, Deren Ö. Beyine özgü proteinler ve tanıda kullanımları. *Hacettepe Tıp Dergisi* 2010; 41:135-141

Povelones M, Nusse R. The role of the cysteine-rich domain of Frizzled in Wingless-Armadillo signaling. *EMBO J* 2005; 24:3493-503.

Redmond L. Et al. Nuclear Notch1 signaling and the regulation of dendritic development. *Nature. Neurosciences* 3:30-40.2000

Reemst K, . Noctor C S, Lucassen J.P, Hol M. E. The Indispensable Roles of Microglia and Astrocytes during *Brain Development*. 2016. *Front Hum Neurosciences*. 2016; 10: 566. Published online 2016 Nov 8.

Regan C.M., Neuronal and glial markers of the central nervous system (Reviews). *Experientia* 44 (1988), Birkhäuser Verlag, CH-4010

Robinson SR, Dreher B, The visual pathways of eutherian mammals and marsupials develop according to a common timetable., *Brain Behav Evol*. 1990;36(4):177-95

Rolfe RA., Shea CA., Singh PNP., Bandyopadhyay A., Murphy P. Investigating the mechanistic basis of biomechanical input controlling skeletal development: exploring the

interplay with Wnt signalling at the joint. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2018 Sep 24;373(1759).

Ross HM., Pawlina W. Histoloji Konu Anlatımı ve Atlası (6. Baskı), Barış Baykal. Palme yayıncılık 2014 – Ankara. 353

Rothbacher U, Laurent MN, Deardorff MA, Klein PS, Cho KW, Fraser SE. Dishevelled phosphorylation, subcellular localization and multimerization regulate its role in early embryogenesis. *EMBO J* 2000;19:1010-1022.

Rothermundt M., Peters M., Prehn J. H., Arolt V., S100B in brain damage and neurodegeneration. (2003).*Microsc. Res. Tech.* 60, 614–632.

Ruiz i Altaba A, Palma V, Dahmane N. Hedgehog – Gli signalling and the growth of the brain. *Nature Revie Neurosciences* 3: 24 – 33. 2002

Rushing G, Ihrle RA. Neural stem cell heterogeneity through time and space in the ventricular-subventricular zone. 2016 .*Front Biol (Beijing)*. Aug;11(4):261-284. **Sadler TW,** Medikal Embriyoloji (11.baskı). A.Can Başaklar. Palme Yayıncılık. 20117

Sansom OJ, Reed KR, Hayes AJ, Ireland H, Brinkmann H, Newton IP, Batlle E, Simon-Assmann P, Clevers H, Nathke IS, Clarke AR, Winton DJ. Loss of Apc in vivo immediately perturbs Wnt signaling, differentiation, and migration. *Genes Dev.* 2004;18:1385–1390.

Satoh S, Daigo Y, Furukawa Y et al. AXIN1 mutations in hepatocellular carcinomas, and growth suppression in cancer cells by virus-mediated transfer of AXIN1. *Nature Genet* 2000;24:245-250.

Schafer BW, Heizmann CW. The S100 family of EF-hand calcium-binding proteins: functions and pathology. *Trends Biochem Sciences.* 1996;21:134–140.

Schwarz-Romond T, Metcalfe C, Bienz M. Dynamic recruitment of axin by Dishevelled protein assemblies. *Journal Cell Sciences* 2007;120(Pt14):2402-12.

Segditsas S, Rowan AJ, Howarth K et al. APC and the three-hit hypothesis. *Oncogene* 2009;28:146-155.

Sharma RP, Chopra VL. Effect of the Wingless (wg1) mutation on wing and haltere development in *Drosophila melanogaster*. 1976. *Development Biology.* Feb;48(2):461-5.

Shu Y, Xiang M, Zhang P, Qi G, He F, Zhang Q, Zhang Z, Lv Z, Peng X, Cai H, Tian B, Wnt-5a Promotes Neural Development and Differentiation by Regulating CDK5 via Ca²⁺/Calpain Pathway. *Cell Physiol Biochem*. 2018 Dec 11;51(6):2604-2615.

Skowron P, Ramaswamy V, Taylor MD: Genetic and molecular alterations across medulloblastoma subgroups. 2015. *Journal Molecular Medical (Berl)* 93: 1075-1084.

Snyder JC , Rochelle LK , Ray C , Pack TF , Bock CB , Lubkov V , Lyerly HK , Wagoner AS , Barak LS , Caron MG . Inhibiting clathrin-mediated endocytosis of the leucine-rich G protein-coupled receptor-5 diminishes cell fitness. *Journal Biology Chem*. 2017 Apr 28;292(17):7208-7222.

Song SJ, Mao XG, Wang C, Han AG, Yan M, Xue XY. LGR5/GPR49 is implicated in motor neuron specification in nervous system. 2015. *Neurosciences Lett*. Jan 1;584:135-40.

Sorci G., Bianchi R., Riuzzi F., Tubaro C., Arcuri C., Giambanco I., Donato R., S100B Protein, A Damage-Associated Molecular Pattern Protein in the Brain and Heart, and Beyond. 2010. *Cardiovascular Psychiatry Neurology*. 2010, 656481.

Sönmez Ü, Ergür BU. [Wnt signal mechanism and its effect on spine development]. *J Turk Spinal Surg* 2002; 13(3-4):17-21.

Stecca B, Ruiz i Altaba A. Brain as a paradigm of organ growth: Hedgehog – Gli signaling in neural stem cells and brain tumors. *Journal Neurobiology*. Sep 15; 64(4):476-90.2005

Szenker-Ravi E, Altunoglu U, Leushacke M, Bosso-Lefèvre C, Khatoo M, Thi Tran H, Naert T, Noelanders R, Hajamohideen A, Beneteau C, De Sousa SB, Karaman B, Latypova X, Başaran S, Yücel EB, Tan TT, Vlaminc L4, Nayak SS, Shukla A, Girisha KM, Le Caignec C, Soshnikova N, Uyguner ZO, Vleminckx K, Barker N, Kayserili H, Reversade B. Author Correction: RSPO2 inhibition of RNF43 and ZNRF3 governs limb development independently of LGR4/5/6. *Nature*. 2018 Sep;561(7722):E7.

Tamamki N1, Nakamura K, Okamoto K, Kaneko T. Radial glia is a progenitor of neocortical neurons in the developing cerebral cortex. *Neurosciences Res*. Sep;41(1):51-60.20017

Tang M, Miyamoto Y, Huang EJ. Multiple roles of beta-catenin in controlling the neurogenic niche for midbrain dopamine neurons. 2009 *Development* 136(12):2027–2038.

- Tkachenko LA, Zykin PA, Nasyrov RA, Krasnoshchekova EI.** Distinctive Features of the Human Marginal Zone and Cajal-Retzius Cells: Comparison of Morphological and Immunocytochemical Features at Midgestation. *Front Neuroanat.* 2016 Mar 18;10:26.
- Van Amerongen R, Nusse R.** Towards an integrated view of Wnt signaling in development. *Development* 2009; 136:3205-14.
- Van Eldik LJ, Wainwright MS.** The Janus face of glial-derived S100B: beneficial and detrimental functions in the brain. *Restor Neurology Neurosciences.* 2003;21:97–108.
- van Noort M, van de Wetering M, Clevers H.** Identification of two novel regulated serines in the N terminus of beta-catenin. *Exp Cell Res* 2002;276:264-272.
- Vasung L, Raguz M, Kostovic I, Takahashi E.** Spatiotemporal Relationship of Brain Pathways during Human Fetal Development Using High-Angular Resolution Diffusion MR Imaging and Histology. 2017. *Front Neurosciences.* Jul 11;11:348.
- Veeman MT, Axelrod JD, Moon RT.** A second canon: functions and mechanisms of β -catenin-independent Wnt signaling. *Development Cell* 2003; 5:367-77.
- Villavicencio EH, Walterhouse DO, Iannaccone PM:** The sonic hedgehog-patched-gli pathway in human development and disease. 2000 *Am J Hum Genet* 67: 1047-1054.
- Whish S, Dziegielewska KM, Møllgård K, Noor NM, Liddelow SA, Habgood MD, Richardson SJ, Saunders NR.** The inner CSF-brain barrier: developmentally controlled access to the brain via intercellular junctions. *Front Neurosciences.* 2015 Feb 12;9:16.
- Willert K, Jones KA.** Wnt signaling: is the party in the nucleus? *Genes Development* 2006;20:1394-1404
- Willert K, Nusse R.** Beta-catenin: a key mediator of Wnt signaling. *Curr Opin Genet Development* 1998;8(1):95-102.
- Willert K., Brown J.D., Danenberg E., Duncan A.W., Weissman I.L., Reya T.** Wnt proteins are lipid-modified and can act as stem cell growth factors. *Nature*, 423(6938);448-52. . 2003
- Xing Y, Takamaru K, Liu J et al.** Crystal structure of a full-length beta-catenin. *Structure* 2008;16:478-487.
- Xu W, Kimelman D.** Mechanistic insights from structural studies of beta-catenin and its binding part-ners. *Journal Cell Sciences* 2007;120:3337-3344.

Yamada S, Pokutta S, Drees F, et al. Deconstructing the cadherin-catenin-actin complex. *Cell* 2005; 123:889-901.

Yamamoto S., et al., . Cthrc1 selectively activates the planar cell polarity pathway of Wnt signaling by stabilizing the Wnt-receptor complex. 2008 *Development. Cell* 15, 23–36.

Yu Y, Moberly AH, Bhattarai JP, Duan C, Zheng Q, Li F, Huang H, Olson W, Luo W, Wen T, Yu H, Ma M. The Stem Cell Marker Lgr5 Defines a Subset of Postmitotic Neurons in the Olfactory Bulb. 2017. *Journal Neurosciences*. Sep 27;37(39):9403-9414.

Zhang Y, Zhang M, Li L, Wei B, He A, Lu L, Li X, Zhang, Xu Z1, Sun M. Methylation-reprogrammed Wnt/ β -catenin signalling mediated prenatal hypoxia-induced brain injury in foetal and offspring rats. *J Cell Mol Med*. 2018 May 28.

Zhong W, Jiang MM, Weinmaster G, Jan LY, Jan YN. Differential expression of mammalian Numb, Numbl-like and Notch 1 suggests distinct roles during Mouse cortical neurogenesis. *Development* 124 (10):1887-97.1997

ÖZGEÇMİŞ

Soyadı, Adı : YEŞİLYURT ALKAN, Gözde
Uyruk : T.C.
Doğum yeri ve tarihi : Çorum 10.09.1992
Telefon : 05315024814
E-mail : gözde_alkan009@hotmail.com
Yabancı Dil : İngilizce

EĞİTİM

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

BURSLAR ve ÖDÜLLER:

İŞ DENEYİMİ

Yıl	Yer/Kurum	Ünvan
-----	-----------	-------

AKADEMİK YAYINLAR

1. MAKALELER

2. PROJELER

3. BİLDİRİLER

A) Uluslararası Kongrelerde Yapılan Bildiriler

B) Ulusal Kongrelerde Yapılan Bildiriler

Sakarya Üniversitesi; 15. Ulusal Sinirbilim Kongresi **YAVAŞ A¹, ALKAN G², ÖRÜN H³, ERGİN K², BİLGİN M⁴** ‘Propolis treatment in experimental spinal cord injury: neurobehavioral and histopathological consequences’ **Sözlü Bildiri** (7-10 Mayıs 2017)