



T.C

İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**AKSOLOT'DA OMURİLİK HASARI SONRASI
REJENERASYONU SAĞLAYAN MOLEKÜLER
MEKANİZMALARIN YENİ-NESİL RNA DİZİLEME İLE
TANIMLANMASI**

HARBİYE HACİBEKTAŞOĞLU

SİNİRBİLİM ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Dr. Öğr. Üyesi TURAN DEMİRCAN

İSTANBUL-2018



T.C

İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**AKSOLOT'DA OMURİLİK HASARI SONRASI
REJENERASYONU SAĞLAYAN MOLEKÜLER
MEKANİZMALARIN YENİ-NESİL RNA DİZİLEME İLE
TANIMLANMASI**

HARBİYE HACİBEKTAŞOĞLU

SİNİRBİLİM ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Dr. Öğr. Üyesi TURAN DEMİRCAN

İSTANBUL-2018

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans yaşantım boyunca bilgi ve tecrübesi ile ışık tutan, yardımlarını esirgemeyen, aksolot ile tanışma ve çalışma fırsatını veren sevgili danışmanım Dr. Öğretim Üyesi Turan Demircan'a,

Destek ve yardımlarıyla her zaman katkı sağlayan Prof. Dr. Gürkan ÖZTÜRKe,

Yardımlarından dolayı REMER ve MEDİTAM ailelerine,

Lisansta başlayan arkadaşlığımızın yüksek lisansta devam ettiği, bu zaman diliminde her zaman yanımda olan, yardım ve destek sağlayan sevgili arkadaşım Ece Cana FESÇİOĞLU'na, yardımlarını esirgemeyen Demircan Lab grubuna,

Gerek akademik hayatım boyunca gerekse özel hayatımda, güzel günler dışında kötü günlerimde de yanımda olan canım arkadaşlarım Melis KOÇ, Büşra ALPER, Zeynep Begüm DURDU, Gizem KEÇELOĞLU, Özge BAŞSARAÇ, Sinem KADIOĞLU, , Tuğçe Nur ERALP, Tuğba YILMAZ, Sema İrem ALSHAWISH, Şüheda YAMAN, Büşra Elif MALKOÇ, Merve HANCER, Hatice Kübra IŞILDAR, Yeliz DÜNDAR, Atilla ÖZKAN ve manevi kardeşim Mehmet Ozan USUL'a,

Maddi-manevi her daim yanımda olan, aldığım her karara saygı duyan, sevgileri ile büyüten, gurur kaynaklarım babam Metin HACIBEKTAŞOĞLU, annem Günay HACIBEKTAŞOĞLU ve kardeşim Keremcan HACIBEKTAŞOĞLU, dualarıyla her zaman yanımda olan teyzem Gönül NUHOĞLU'na,

Sonsuz teşekkür ederim...

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No.
TEZ ONAYI FORMU	i
BEYAN	ii
TEŞEKKÜR	iii
TABLolar LİSTESİ	vii
ŞEKİLLER LİSTESİ	viii
KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ	xi
1. ÖZET	1
2. ABSTRACT	2
3. GİRİŞ VE AMAÇ	3
4 GENEL BİLGİLER	4
4.1 Merkezi Sinir Sistemi	4
4.1.1. Omurilik hasarı.....	8
4.2. Rejenerasyon	11
4.3. Semenderler	12
4.3.1. Semenderlerde MSS yaralanma modelleri.....	13
4.3.1.1. Kuyruk amputasyonu ve spinal transeksiyon	13
4.3.2. Aksolot	14
4.3.2.1. Aksolotta sinir sistemi rejenerasyonu.....	17
5 MATERYAL VE METOD	19
5.1. Aksolotlar'ın Temini	19
5.2. Aksolotlar'ın Bakımı	20
5.3. Kullanılan Malzemeler	20
5.4. Cihazlar.....	20
5.5. Aksolotlara Omurilik Hasarı Verilmesi.....	21

5.6.	Doku Örneklerinden RNA Kütüphanesinin Hazırlanması ve RNA Dizi Analizi Yapılması.....	21
5.6.1.	Mekanik parçalama	21
5.6.2.	RNA izolasyonu	22
5.6.3.	Transkriptom çalışması	22
5.7.	Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR)	23
5.8.	Biyoinformatik	25
6	BULGULAR	26
6.1	Transkriptom Analizi.....	26
6.2	Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qPCR).....	27
6.3	PANTHER Sınıflandırma Sisteminin Kullanılması.....	28
6.3.1	1.gün RNA örneklerinin 0.gün RNA örneklerine göre PANTHER Sınıflandırma Sistemi ile analiz edilmesi	29
6.3.2	1.gün RNA örneklerinden 0.gün RNA örneklerine göre daha yüksek seviyede ifade edilenlerin PANTHER Sınıflandırma Sistemi ile analiz edilmesi	30
6.3.3	1.gün RNA örneklerinden 0.gün RNA örneklerine göre daha düşük seviyede ifade edilenlerin PANTHER Sınıflandırma Sistemi ile analiz edilmesi	32
6.3.4	4.gün RNA örneklerinin 0.gün RNA örneklerine göre PANTHER Sınıflandırma Sistemi ile analiz edilmesi	35
6.3.5	4.gün RNA örneklerinden 0.gün RNA örneklerine göre daha yüksek seviyede ifade edilenlerin PANTHER Sınıflandırma Sistemi ile analiz edilmesi	36
6.3.6	4.gün RNA örneklerinden 0.gün RNA örneklerine göre daha düşük seviyede ifade edilenlerin PANTHER Sınıflandırma Sistemi ile analiz edilmesi	38

6.3.7	7.gün RNA örneklerinin 0.gün RNA örneklerine göre PANTHER Sınıflandırma Sistemi ile analiz edilmesi	41
6.3.8	7.gün RNA örneklerinden 0.gün RNA örneklerine göre daha yüksek seviyede ifade edilenlerin PANTHER Sınıflandırma Sistemi ile analiz edilmesi	43
6.3.9	7.gün RNA örneklerinden 0.gün RNA örneklerine göre daha düşük seviyede ifade edilenlerin PANTHER Sınıflandırma Sistemi ile analiz edilmesi	45
6.4	STRING Veritabanı Kullanılarak Protein-Protein Etkileşimi İncelenmesi.	47
6.4.1	1.gün RNA örneklerinin 0.gün RNA örneklerine göre daha yüksek seviyede ifade edilenlerin STRING veritabanı ile analiz edilmesi.....	47
6.4.2	1.gün RNA örneklerinin 0.gün RNA örneklerine göre daha düşük seviyede ifade edilenlerin STRING veritabanı ile analiz edilmesi.....	48
6.4.3	4.gün RNA örneklerinin 0.gün RNA örneklerine göre daha yüksek seviyede ifade edilenlerin STRING veritabanı ile analiz edilmesi.....	49
6.4.4	4.gün protein örneklerinin 0.gün protein örneklerine göre daha düşük seviyede ifade edilenlerin STRING veritabanı ile analiz edilmesi.....	50
6.4.5	7.gün RNA örneklerinin 0.gün RNA örneklerine göre daha yüksek seviyede ifade edilenlerin STRING veritabanı ile analiz edilmesi.....	51
6.4.6	7.gün RNA örneklerinin 0.gün RNA örneklerine göre daha düşük seviyede ifade edilenlerin STRING veritabanı ile analiz edilmesi.....	52
7	TARTIŞMA ve SONUÇ	54
8	EKLER	61
9	KAYNAKLAR	79
10	ETİK KURUL ONAYI	91
11	ÖZGEÇMİŞ	93

TABLÖLER LİSTESİ

Tablo 5.3.1 Kullanılan kitlerin ve sarf malzemelerin listesi.	20
Tablo 5.4.1 Kullanılan cihazların listesi.	20
Tablo 5.7.1 qPCR reaksiyon içeriği.	23
Tablo 5.7.2 Kullanılan primerlerin adı ve sekansları.	24
Tablo 6.1.1 Tüm zaman dilimleri için sinir sisteminde görev alan RNA'lar.	27
Tablo 8.1 1.gün örneklerinin 0.gün örneklerine göre en yüksek değişimi gösteren RNA'lar.	63
Tablo 8.2 1.gün örneklerinin 0.gün örneklerine göre en düşük değişimi gösteren RNA'lar.	63
Tablo 8.3 4.gün örneklerinin 0.gün örneklerine göre en yüksek değişimi gösteren RNA'lar.	65
Tablo 8.4 4.gün örneklerinin 0.gün örneklerine göre en düşük değişimi gösteren RNA'lar.	67
Tablo 8.5 7.gün örneklerinin 0.gün örneklerine göre en yüksek değişimi gösteren RNA'lar.	69
Tablo 8.6 7.gün örneklerinin 0.gün örneklerine göre en düşük değişimi gösteren RNA'lar.	71

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 4.1.1 Farklı nöroglial hücreler (2).....	4
Şekil 4.1.2. CNS ve PNS ilişkisi (2).	6
Şekil 4.1.3. Merkezi sinir sisteminin embriyonik gelişimi. 22 günlük bir embriyoya ait bu dorsal görünüm, gelişen merkezi sinir sisteminin üç katmandaki enine kesitler (2).	7
Şekil 4.1.4. Beynin gelişim aşaması (2).	8
Şekil 4.1.5. Omurilik ve dorsal kök bölgesi lezyonlarının elemanları (15).	11
Şekil 4.3.1 Aksolotun genel görünümü ve organ sistemi (71).	15
Şekil 5.1 Yöntem Figürü.	19
Şekil 6.2.1 Tüm zaman dilimleri için ortak olan genlerin qPCR analizi.	28
Şekil 6.3.1 1.gün RNA örneklerinin 0.gün RNA örnekleri ile karşılaştırılmasının PANTHER veri tabanı ile analizi. A. Moleküler fonksiyon analizi. B. Biyolojik süreç analizi. C. Protein sınıflandırması analizi.	30
Şekil 6.3.2 1.gün RNA örneklerinin 0.gün RNA örnekleri ile karşılaştırılmasında daha yüksek seviyede ifade edilenlerin PANTHER veri tabanı ile analizi. A. Moleküler fonksiyon analizi. B. Biyolojik süreç analizi. C. Protein sınıflandırması analizi.	32
Şekil 6.3.3 1.gün RNA örneklerinin 0.gün RNA örnekleri ile karşılaştırılmasında daha düşük seviyede ifade edilenlerin PANTHER veri tabanı ile analizi. A. Moleküler fonksiyon analizi. B. Biyolojik süreç analizi. C. Protein sınıflandırması analizi.	34
Şekil 6.3.4 4.gün RNA örneklerinin 0.gün RNA örnekleri ile karşılaştırılmasının PANTHER veri tabanı ile analizi. A. Moleküler fonksiyon analizi. B. Biyolojik süreç analizi. C. Protein sınıflandırması analizi.	36
Şekil 6.3.5 4.gün RNA örneklerinin 0.gün RNA örnekleri ile karşılaştırılmasında daha yüksek seviyede ifade edilenlerin PANTHER veri tabanı ile analizi. A. Moleküler fonksiyon analizi. B. Biyolojik süreç analizi. C. Protein sınıflandırması analizi.	38
Şekil 6.3.6 4.gün RNA örneklerinin 0.gün RNA örnekleri ile karşılaştırılmasında daha düşük seviyede ifade edilenlerin PANTHER veri tabanı ile analizi. A. Moleküler fonksiyon analizi. B. Biyolojik süreç analizi. C. Protein sınıflandırması analizi.	40
Şekil 6.3.7 7.gün RNA örneklerinin 0.gün RNA örnekleri ile karşılaştırılmasının PANTHER veri tabanı ile analizi. A. Moleküler fonksiyon analizi. B. Biyolojik süreç analizi. C. Protein sınıflandırması analizi.	42

Şekil 6.3.8 7.gün RNA örneklerinin 0.gün RNA örnekleri ile karşılaştırılmasında daha yüksek seviyede ifade edilenlerin PANTHER veri tabanı ile analizi. A. Moleküler fonksiyon analizi. B. Biyolojik süreç analizi. C. Protein sınıflandırması analizi.	44
Şekil 6.3.9 7.gün RNA örneklerinin 0.gün RNA örnekleri ile karşılaştırılmasında daha düşük seviyede ifade edilenlerin PANTHER veri tabanı ile analizi. A. Moleküler fonksiyon analizi. B. Biyolojik süreç analizi. C. Protein sınıflandırması analizi.	46
Şekil 6.4.1 STRING veri tabanı ile tanımlanan 1.gün RNA örneklerinin 0.gün RNA örneklerine göre yüksek seviyede ifade edilenlerin analizi.	48
Şekil 6.4.2 STRING veri tabanı ile tanımlanan 1.gün RNA örneklerinin 0.gün RNA örneklerine göre düşük seviyede ifade edilenlerin analizi.	49
Şekil 6.4.3 STRING veri tabanı ile tanımlanan 4.gün RNA örneklerinin 0.gün RNA örneklerine göre yüksek seviyede ifade edilenlerin analizi.	50
Şekil 6.4.4 STRING veri tabanı ile tanımlanan 4.gün RNA örneklerinin 0.gün RNA örneklerine göre düşük seviyede ifade edilenlerin analizi.	51
Şekil 6.4.5 STRING veri tabanı ile tanımlanan 7.gün RNA örneklerinin 0.gün RNA örneklerine göre yüksek seviyede ifade edilenlerin analizi.	52
Şekil 6.4.6 STRING veri tabanı ile tanımlanan 7.gün RNA örneklerinin 0.gün RNA örneklerine göre düşük seviyede ifade edilenlerin analizi.	53
Şekil 8.1 PANTHER veri tabanı ile tanımlanan 1.gün RNA örneklerinin 0.gün RNA örneklerine göre hücrel bileşen analizi.	73
Şekil 8.2 PANTHER veri tabanı ile tanımlanan 1.gün RNA örneklerinin 0.gün RNA örneklerine göre daha yüksek seviyede ifadesinin hücrel bileşen analizi.	74
Şekil 8.3 PANTHER veri tabanı ile tanımlanan 1.gün RNA örneklerinin 0.gün RNA örneklerine göre daha düşük seviyede ifadesinin hücrel bileşen analizi.	74
Şekil 8.4 PANTHER veri tabanı ile tanımlanan 4.gün RNA örneklerinin 0.gün RNA örneklerine göre hücrel bileşen analizi.	75
Şekil 8.5 PANTHER veri tabanı ile tanımlanan 4.gün RNA örneklerinin 0.gün RNA örneklerine göre daha yüksek seviyede ifadesinin hücrel bileşen analizi.	76
Şekil 8.6 PANTHER veri tabanı ile tanımlanan 4.gün RNA örneklerinin 0.gün RNA örneklerine göre daha düşük seviyede ifadesinin hücrel bileşen analizi.	76
Şekil 8.7 PANTHER veri tabanı ile tanımlanan 7.gün RNA örneklerinin 0.gün RNA örneklerine göre hücrel bileşen analizi.	77

Şekil 8.8 PANTHER veri tabanı ile tanımlanan 7.gün RNA örneklerinin 0.gün RNA örneklerine göre daha yüksek seviyede ifadesinin hücresel bileşen analizi.	78
Şekil 8.9 PANTHER veri tabanı ile tanımlanan 7.gün RNA örneklerinin 0.gün RNA örneklerine göre daha düşük seviyede ifadesinin hücresel bileşen analizi.	78



KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ

Actr1b:	Beta-centractin
AGSC:	Aksolotlar, Ambystoma Genetic Stock Center
BLAST:	Basic Local Alignment Search Tool
BOS:	Beyin Omurilik Sıvısı
BSCB:	Kan-Omurilik Bariyeri
Cirbp:	Cold-inducible RNA-binding protein
Ddx5:	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX5
Guk1:	Guanylate kinase
HMGB1:	High mobility group protein B1
Hook3:	Protein Hook homolog 3
Loc:	Uncharacterized protein LOC
MEDİTAM:	İstanbul Medipol Üniversitesi Tıbbi Araştırmalar Merkezi
ml:	mililitre
MSS:	Merkezi Sinir Sistemi
MyEF-3:	Murin miyelin ekspersyon faktörü 3
NCBI:	The National Center for Biotechnology Information
NGS:	Yeni-nesil sekanslama yöntemi
PEG10:	Retrotransposon-derived protein PEG10
PNS:	Periferik Sinir Sistemi
qRT-PCR:	Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RNS:	Reaktif Nitrojen Türevleri
ROS:	Reaktif Oksijen Türevleri
Rpl:	Ribozomal protein L
Rpl3:	60S ribosomal protein L3
rpm:	Rotations Per Minute
Rsl24d1:	Probable ribosome biogenesis protein RLP24
S100a4:	Protein S100-A4
SCI:	Omurilik Hasarı
Slc38a10:	Putative sodium-coupled neutral amino acid transporter 10 isoform X4
skeMus:	Skeletal muscle
SSUH2:	Protein SSUH2 homolog

Tkt:	Transketolase
TN-C:	Tenascin-C
ORF:	Açık okuma çerçevesi
Zona:	Zona pellucida sperm-binding protein 2
µl:	mikrolitre



1. ÖZET

AKSOLOT'DA OMURİLİK HASARI SONRASI REJENERASYONU SAĞLAYAN MOLEKÜLER MEKANİZMALARIN YENİ-NESİL RNA DİZİLEME İLE TANIMLANMASI

Aksolot beyin ve omurilik de dahil olmak üzere birçok organ ve uzuvlarını rejenere edebilme kapasitesi sayesinde araştırmacıların model organizma olarak kullandığı önemli bir canlıdır. Aksolotun böylesine bir rejeneratif kapasiteye sahip olmasının altında yatan moleküler mekanizmaların ne olduğu konusunda araştırmalar halen devam etmektedir. Memelilerin genel olarak rejenerasyon kapasitesinin kısıtlı olması ve özelde de merkezi sinir sistemi hasarlarını tamamen düzeltmemelerine karşılık aksolotda merkezi sinir sistemi rejenerasyonu başarısını sağlayan gen ve yollar merak uyandırmaktadır. Transkriptom canlıların belirli bir organ, doku ya da hücre veya belirli bir zaman dilimi için ifade RNA profilinin tümüne verilen isimdir. Bu çalışmada da transkriptom analizinden faydalanarak sinir rejenerasyonunda yer alan çeşitli faktörlerin tanımlanması amaçlanmıştır. Bunun için neotenik aksolotlar kuyruk bölgesinden kesilmiş olup; 0.gün, 1.gün, 4.gün ve 7.gün örnekleri alınarak bu örnekler için RNA dizileme çalışması yapılmıştır. Tanımlanan RNA'lerden anlamlı olarak ifade edilenler, PANTHER Sınıflandırma Sistemi'yle moleküler fonksiyon, biyolojik süreç, hücresel bileşen ve protein sınıf analizi belirlenmiş, STRING veri tabanı ile de protein-protein etkileşimi analiz edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Aksolot, merkezi sinir sistemi, omurilik, rejenerasyon, transkriptom.

2. ABSTRACT

NEXT-GENERATION SEQUENCING TO IDENTIFY MOLECULAR REGULATORS OF REGENERATION AFTER SPINAL CORD INJURY IN THE AXOLOTL

Axolotl is a living creature, being used as a model organism through the capacity of regeneration of organs and limbs including the brain and the spinal cord. Researchs issue the underlying molecular mechanism of such a regenerative capacity have been still continuing. Despite mammals have a limited regeneration capacity and they are not able to completely fix central nerve system damages, genes and pathways ensuring central nerve system regeneration success in axolotls arouse curiosity. Transcriptome is the name for a specific organ, tissue, cell or RNA profile for a certain amount of time. This research aims to identify various factors taking place in nerve regeneration. Neotenic axolotls were cut from the queue area. Day 0,1,4 and 7 samples collected and a RNA sequence study conducted based on these samples. Those demonstrating significance among identified RNAs, molecular function by PANTHER classification system, biological process, cellular component and protein category analysis were determined. Additonally, protein-protein interaction analysis was conducted by STRING database.

Key Words: Axolotl, central nervous system, spinal cord, regeneration, transcriptome.

3. GİRİŞ VE AMAÇ

Her yıl birçok insan felç ve omurilik hasarı (SCI) gibi nedenlerden ötürü merkezi sinir sistemindeki (MSS) fonksiyon kaybından etkilenmektedirler. Memelilerin sahip olduğu sınırlı rejenerasyon kapasitesi nedeniyle bir çok durumda MSS tamamen tamir edilememektedir. Bu sınırlı rejenerasyon kapasitesi bireylerin yaşam kalitesinin ve standartlarının düşmesine neden olmaktadır.

Rejenerasyon, hasara veya yaralanmaya maruz kalan doku ve uzuvların, belli bir süre sonra yapı ve organizasyonlarını geri kazanmasıdır. Canlıların sınıflandırılmasına bakıldığında memeliler az rejeneratif kapasiteye sahip olmakla birlikte, ilginçtir ki semenderler sınıfından Aksolot (Meksika semenderi, *Ambystoma mexicanum*) rejenerasyon kapasitesi çok iyi gelişmiş bir canlıdır. Bu canlıdaki rejenerasyon kapasitesinin nasıl olduğu henüz anlaşılamamakla birlikte, kuyruğunu, ön-arka ekstremitelerini, iç organlarını, beyin ve omuriliğini yenileyebilme kapasitesine sahiptirler. Aksolottaki sınırsız rejenerasyon yeteneğinin altında yatan moleküler nedenlerin anlaşılması, ileride memeliler için tıbbi uygulamaların yapılabilmesi adına bir öncü olabilecektir.

Bu çalışmada; omurilik hasarını rejenere edebilen aksolotu model organizma olarak kullanıp, bu canlıdaki omurilik hasarı sonrası nöronal rejenerasyon ve plastisite altında yatan faktörlerin ve mekanizmaların ne olduğunu tanımlayabilmek, farklı zaman aralıklarında doku örnekleri alarak, sinir yenilenmesinin önemli safhalarında görev alan çeşitli faktörleri belirleyebilmeyi ve karakterize edebilmeyi hedefledik.

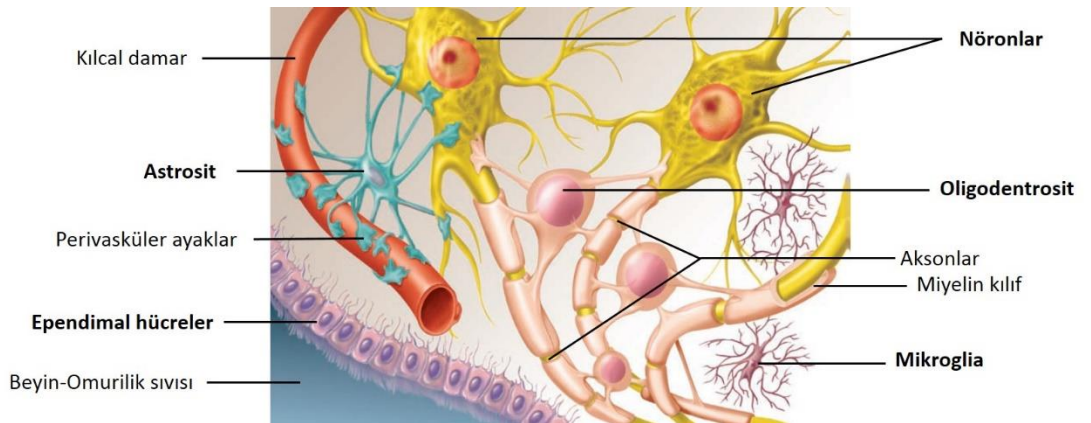
4 GENEL BİLGİLER

4.1 Merkezi Sinir Sistemi

Sinir sistemi, nöronların işlevlerini destekleyen, elektrokimyasal impulsları üreten ve destekleyen hücreler olan nöronlardan oluşur. Nöronlar fonksiyonel ve yapısal olarak sınıflandırılır (1).

Sinir sistemi, beyin ve omurilikten oluşan merkezi sinir sistemine (MSS), omurilikten çıkan spinal sinirler ile beyinden çıkan kranial sinirleri içeren periferik sinir sistemine (PNS) bölünür (2).

Sinir sistemi, sadece iki ana hücre tipinden oluşur - nöronlar ve glia hücreleri. Glia hücrelerinin çeşitli türleri özel işlevler gerçekleştirirler. Mezodermden (embriyonik dokunun orta tabakasından) türetilen bağ dokusunda "paketlenmiş" olan diğer organların aksine, sinir sisteminin glia hücrelerinin çoğu nöron üreten aynı embriyonik doku tabakasından (ektoderm) türetilir. Periferik sinir sisteminde iki tür glia hücresi vardır; periferik aksonlar etrafında miyelin kılıflarını oluşturan schwann hücreleri ve periferik gangliyonlarındaki sinir hücre gövdelerini destekleyen satellit (uydu) hücreleridir. Merkezi sinir sisteminde ise dört farklı tip glia hücresi bulunmaktadır; MSS'deki sinir hücrelerinin miyelin kılıflarını oluşturan oligodendrositler, fagositik özellikte olup savunma görevinde bulunan mikrogialar, MSS'deki nöronların beslenmesini sağlayan astrositler ile beyin ventriküllerini ve omuriliğin merkezi kanalını oluşturan ependimal hücrelerdir (Şekil 4.1.1) (2).

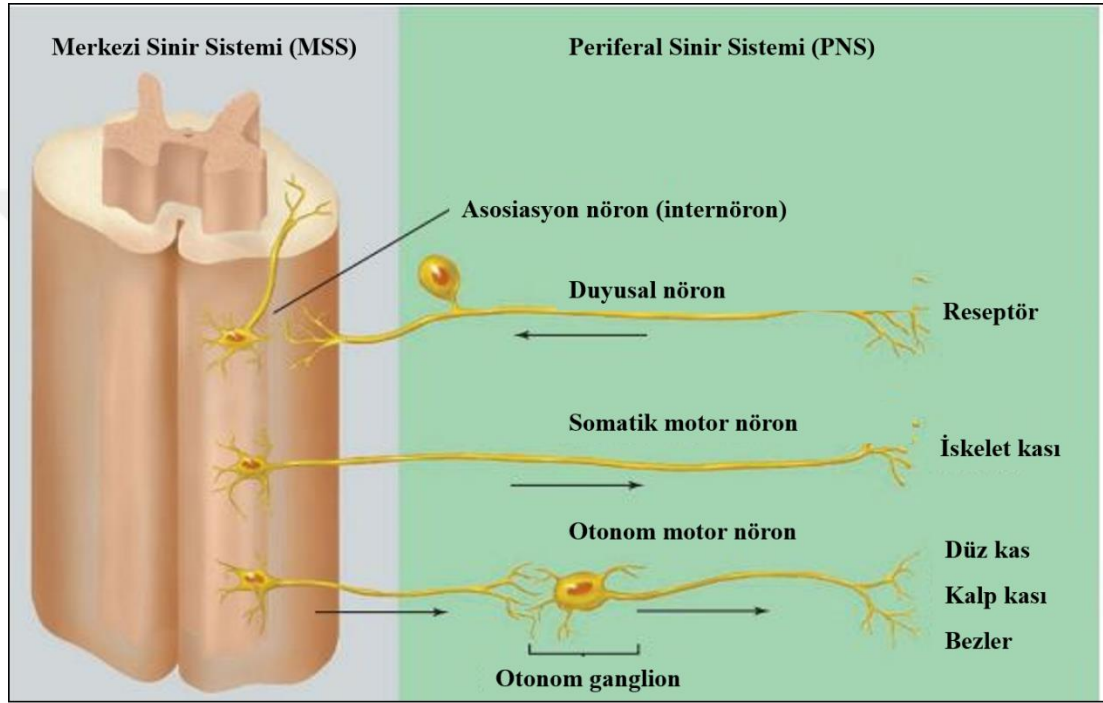


Şekil 4.1.1 Farklı nöroglial hücreler (2).

Nöronlar sinir sisteminin temel yapısal ve fonksiyonel birimleridir. Fiziksel ve kimyasal uyarılara cevap vermek, elektrokimyasal impulsları uygulamak ve kimyasal düzenleyicileri serbest bırakmak için uzmanlaşmışlardır. Bu aktiviteler sayesinde, nöronlar duyuşal uyarıların algılanmasını, öğrenmeyi, hafızayı ve kas ve salgı bezlerinin kontrolünü sağlar. Pek çok nöron, postmitotiktir, mitoz ile bölünemez, ancak çoğu, kesilmiş bir kısmı yeniden üretebilir. Glia hücreleri nöronların işlevlerine yardımcı olur ve nöronlardan yaklaşık beş kat fazladır. MSS'de, glia hücreleri topluca nöroglia veya sadece glial hücreler olarak adlandırılır. Mitotik olarak bölmeyen nöronlardan farklı olarak (özel nöral kök hücreleri hariç), glial hücreler mitoz ile bölünebilir (2).

Nöronlar boyut ve şekil bakımından önemli ölçüde farklılık gösterse de, genellikle üç ana bölgeye sahiptirler: bir hücre gövdesi, dendritler ve bir akson. Dendritler, hücre gövdesinin sitoplazmasından uzanan ince, dallı yapılardır. Dendritler, elektrokimyasal impulsları hücre gövdesine ileten alıcı bir alan sağlar. Akson, hücre gövdesinden uzakta, aksiyon potansiyelleri olarak adlandırılan impulsları yürüten daha uzun bir yapıdır. Aksonun hücre gövdesi yakınındaki kökeni, akson hillocku olarak adlandırılan genişletilmiş bir bölgedir; aksiyon potansiyelleri buradan kaynaklanır (1). Aksiyon potansiyeli sinir hücrelerinde, hücreler arası iletişimde rol alır. Tüm hücrelerde intraselüler ortam negatif, ekstraselüler ortam pozitif olacak şekilde membran potansiyel fark bulunmaktadır. Sinir gibi uyarılabilir dokuların dinlenme halinde iken geçişi bu aksiyon potansiyeli sayesinde gerçekleşir. Aksiyon potansiyeli fiziksel, kimyasal, elektriksel olarak bir hücre zarının uyarılmasıyla, zarın intraselüler ve ekstraselüler taraflarındaki iyon dengesinin değişmesi ile ortaya çıkan elektriksel potansiyelin akson boyunca iletilmesidir. Aksiyon potansiyeli olarak adlandırılan bu sinir uyarısı akson hillockundan başlayarak tüm akson boyunca devam eder (3). Aksonlar oldukça uzun olabileceğinden, organelleri ve proteinleri hücre gövdesinden akson terminallerine taşımak için özel mekanizmalar gereklidir. Bu aksonal taşıma, enerjiye bağımlıdır ve genellikle hızlı bir bileşene ve iki yavaş bileşene ayrılır. Hızlı bileşen (200 ila 400 mm / gün) esas olarak membranöz kesecikleri taşır (sinaptik iletim için önemlidir). Bir yavaş bileşen (0.2 ila 1 mm / gün), sito-iskeletin mikrofılamanlarını ve mikrotübüllerini taşır, diğer yavaş bileşen ise (2 ila 8 mm / gün), sinaptik fonksiyon için kritik olanlar dahil olmak üzere 200 farklı proteini taşır (2).

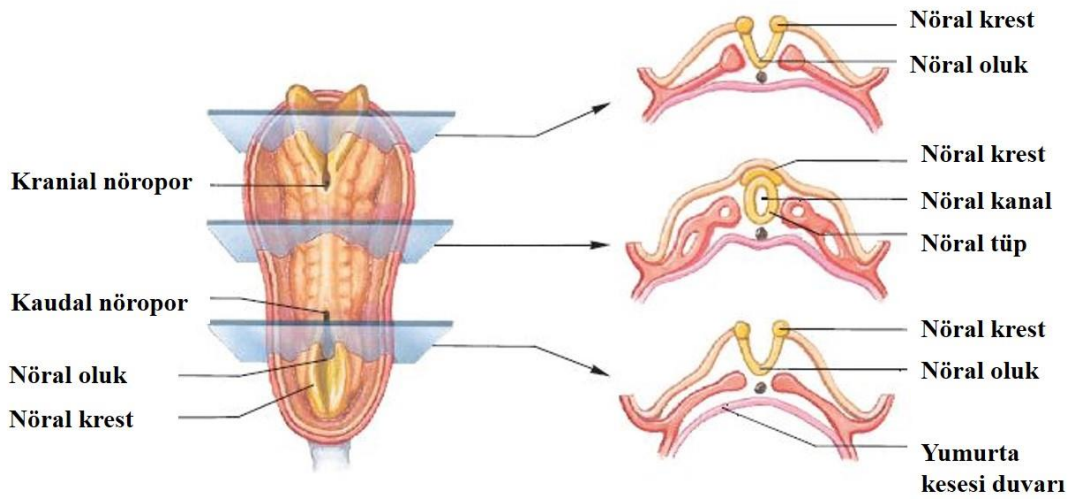
Nöronlar, işlevlerine veya yapılarına göre sınıflandırılabilir. Fonksiyonel sınıflandırma, şekil 4.1.2'de gösterildiği gibi, nöronların impuls uyguladıkları ve aldıkları yöne dayanmaktadır. Duyusal veya afferent nöronlar, duyu reseptörlerden impulsları MSS'ye iletir. Motor ya da efferent nöronlar, efektör organlara (kaslar ve salgı bezleri) MSS'den impuls taşırlar. Asosiasyon nöronları veya internöronlar tamamen MSS içinde yer alır ve sinir sisteminin bütünleyici veya bütünleştirici işlevlerine hizmet eder (2).



Şekil 4.1.2. CNS ve PNS ilişkisi (2).

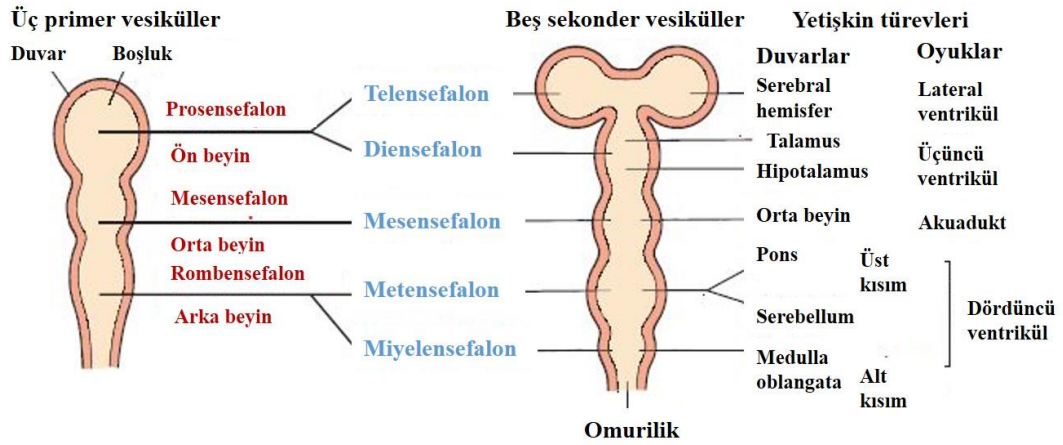
Beyin ve omurilikten oluşan merkezi sinir sistemi MSS, duyu nöronlardan girdi alır ve kasları ve bezleri innerve eden motor nöronların aktivitesini yönlendirir. Beyin ve omurilikteki ilişkili nöronlar, duyu uyaranlarla uygun motor tepkilerini ilişkilendirmek ve böylece kararlı bir iç çevre oluşturmak görevlerinde bulunurlar. Bu sayede değişen dış çevreden kaynaklı etmenlere karşı homeostaziyi sağlamış ve korunmuş olur. Dahası, tüm omurgalıların (ve çoğu omurgasızların) merkezi sinir sistemleri, en azından ilkel öğrenme ve hafıza biçimlerine sahip olabilirler. Bu kapasite, davranışların deneyimle değiştirilmesine izin verir. Algı, öğrenme, hafıza, duygular ve hatta belki de bilincin temelini oluşturan öz farkındalık beynin kreasyonlarıdır. (2).

Merkezi sinir sisteminin yapısının ve işlevinin incelenmesi, embriyonik gelişim sürecinde kurulan temel “planı” hakkında bilgi gerektirir. Erken embriyo, yüzeyinde ektoderm olarak bilinen bir embriyonik doku tabakası içerir; bu, diğer yapıların yanı sıra, sonunda cildin epidermisini oluşturacaktır. Gelişim ilerledikçe, ektodermden embriyonun vücudunun dorsal orta çizgisi boyunca bir oluk ortaya çıkar. Bu oluk derinleşir ve konsepsiyon sonraki yirminci günde nöral bir tüp oluşturmak için kaynaşmıştır. Füzyonun meydana geldiği ektodermin parçası, nöral tüp ve yüzey ektodermi arasında yer alan nöral krest olarak adlandırılan ayrı bir yapıya dönüşür (Şekil 4.1.3). Bu sürecin sonunda nöral tüp merkezi sinir sistemi tarafından, nöral krest ise periferik sinir sistemi gangliyonlarından meydana gelir (2).



Şekil 4.1.3. Merkezi sinir sisteminin embriyonik gelişimi. 22 günlük bir embriyoya ait bu dorsal görünüm, gelişen merkezi sinir sisteminin üç katmandaki enine kesitler (2).

Konsepsiyon sonraki dördüncü haftanın ortasında, beyni oluşturacak olan nöral tüpün anterior ucunda üç farklı şişme vardır: ön beyin (prosencephalon), orta beyin (mezensefalon) ve arka beyin (rhombencephalon). Beşinci hafta boyunca, bu alanlar beş bölge oluşturmak için modifiye edilmiştir. Ön beyin telencephalon ve diensefalona ayrılır; mezensefalon değişmeden kalır ve arka beyin metensefalon ve myelensefalona ayrılır (2).



Şekil 4.1.4. Beynin gelişim aşaması (2).

Beynin oluşumu ve gelişimi ile beraber MSS'nin temel yapısal şekli oluşmaya başlar. Telencephalon, insanlarda diensefalonu, orta beynini ve arka beynin bir kısmını kaplayan iki büyük hemisferi oluşturarak, orantısız olarak büyür. Beynin boşlukları ventriküller olarak bilinir ve beyin omurilik sıvısı (BOS) ile doldurulur. Omuriliğin boşluğuna merkezi kanal denir ve bu kanal da BOS ile doldurulur.

Merkezi sinir sistemi, MSS'den beyin (kranial sinirler) ve omurilikten (omurilik sinirleri) çıkan sinirler aracılığıyla vücutla iletişim kurar. Bu sinirler, MSS'nin dışında yer alan hücre gövdelerinin toplanmasıyla birlikte periferik sinir sistemini oluşturur.

12 kranial sinir; 2 çift cerebrumdan ve 10 çift beyin sapından çıkar. Kranial sinirler hem duyu hem motor lifleri hem de özelleşmiş duyu liflerini de içerirler. Duyusal nöronların hücre gövdeleri beyinde değil, bunun yerine duyu organının yakınındaki gangliyonlarda bulunurlar (2).

Spinal sinirler ise; 8 servikal, 12 torakal, 5 lumbal , 5 sakral, 1 koksik olmak üzere 31 çiftten oluşurlar. Spinal sinirler ventral ve dorsal olarak da ikiye ayrılırlar. Hücre gövdesi bir gangliyonunda değil, omuriliğin gri maddesi içerisinde yer alır. Bununla birlikte, bazı otonom motor nöronların hücre gövdeleri, omuriliğin dışındaki gangliyonlarda bulunurlar (2).

4.1.1. Omurilik hasarı

Omurilik, motor ve duyu bilgini beyin ve vücut arasında kanal gibi taşıdığı sinir ağına verilen addır. Omurilik, çoğu spinal nöronal hücre gövdesinin yer

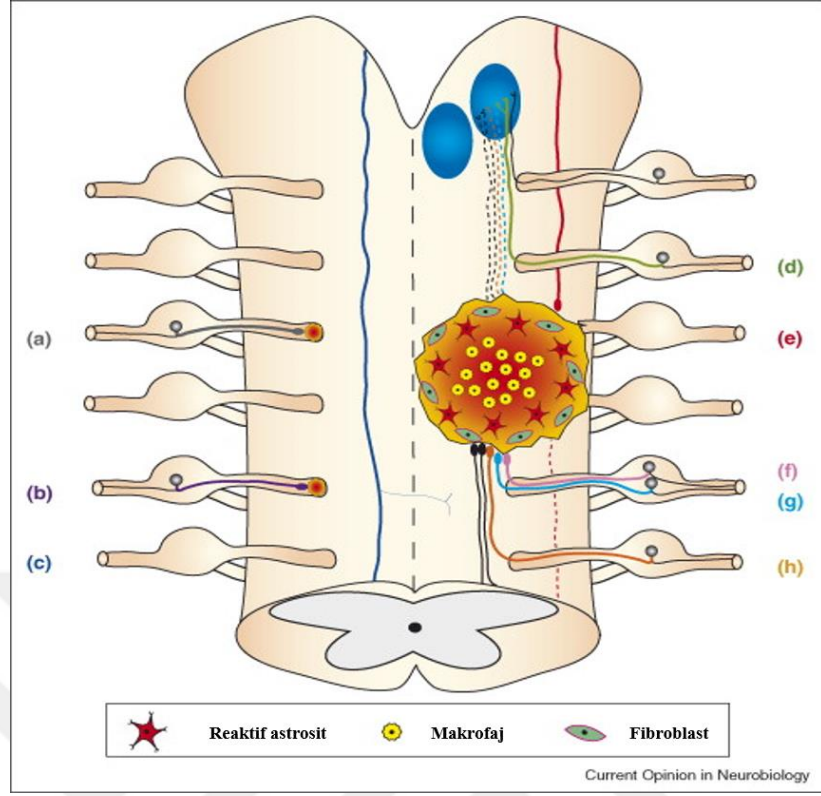
aldığı merkezi bölgeleri (gri madde) çevreleyen uzunlamasına yönelimli omurga yollarını (beyaz madde) içerir. Beyinde ise gri madde yüzey alanını arttırmak için kıvrımlı bir yapıya sahiptir. Gri madde duyuşal ve motor nöronları içeren segmentler halinde düzenlenmiştir. Motor nöronlar segmental sinir veya kökler yoluyla omurilikten ayrılır (4).

Omurilik hasarı (SCI), genellikle duyuşal ve motor fonksiyon kaybına yol açan yıkıcı bir nörolojik bozukluktur. Ağır vakalarda felç ve ölüme yol açabilir (5). SCI olan hastalarda, ilk travmadan kaynaklanan birincil cevap akut fazdır. Burada ilk yaralanma ve vasküler hasar meydana gelir (6). Birincil hasardan sonra, hücreşel ve moleküler olayların tetiklendiğı sekonder yaralanma cevabı gelişir. Sekonder cevap, reaktif oksijen türevleri (ROS), reaktif nitrojen türevleri (RNS) ve serbest radikaller gibi yüksek derecede reaktif türevlerin üretilmesiyle ortaya çıkabilen nörolojik hasarı ve işlev kaybını arttırmaktadır (7) çünkü serbest radikaller hücre membranındaki lipid peroksidasyonuna neden olarak nöral doku hasarının gelişimine neden olurlar (8). Bu değışiklikler aynı zamanda merkezi sinir sisteminin yaralanmasında temel bir patofizyoloji olan oksidatif strese de yol açmaktadır (9). Sekonder hasarın sonuçları, mitokondriyal disfonksiyon, nörotransmitter birikimi, kan-beyin bariyerinin ve kan-omurilik bariyerinin (BSCB) bozulması, apoptoz, eksitotoksisite ve inflamatuvar ve immün süreçlerini içerir (10). Mikro-dolaşımin bozulmasına bağılı olarak, aktive edilmiş nöronlar ve glial hücreler, SCI'dan sonra sıklıkla pro-inflamatuvar fenotipler sergiler. Bu nörotoksik yanıtlar, hasar bölgesine infiltre olmuş periferel lökositler, yerleşik mikroglialar ve astrositler tarafından daha da şiddetlendirilebilir (11). Hasar sonrası açığa çıkan bu şiddetli reaksiyonlarla birlikte SCI sıklıkla kalıcı sakatlık ve yaşam kalitesinin düşük olmasıyla sonuçlandığından, tıbbi bakım maliyeti ve verimlilik kaybı dahil olmak üzere, toplum üzerinde büyük bir mali yük oluşturmaktadır (12).

MSS'ne zarar gördükten sonra çoğı durumda fonksiyonel iyileşme, nöronların yenilenmesi ve geri kazanılması ile sınırlı kalır. Fonksiyonel iyileşme sürecinin altında yatan mekanizmalar henüz anlaşılmamıştır. Son birkaç yılda yapılan çalışmalar MSS'nin hücre dışı ortamının önemli bir rol oynadığını göstermiştir. Nöronal rejenerasyon eksikliği kısmen hücre dışı ortamda aksonal rejenerasyon inhibitörleri ile birlikte, büyümeyi teşvik eden moleküllerin eksikliği ile açıklanabilir (13).

Oligodendrositler, MSS'deki miyelinasasyondan sorumludur. Nöron hasarına ek olarak, SCI sonrası oligodendrosit ölümü ve akson demiyelinizasyonu gözlenir. Oligodendrosit sağkalımı ve akson remiyelinasyonu, motor fonksiyonun iyileşmesi ile yakından ilişkilidir. Bu nedenle, SCI sonrası oligodendrosit yaşamsallığını sürdürmeye dönük araştırmalar önem kazanmaktadır (14).

Glial skar formları MSS'ye hasar verildikten sonra rejenere nöronlara bariyer olarak davranırlar (Şekil 4.1.5) (15). Astrositler, mikroglialar, oligodendrosit progenitörleri ve fibroblastlar dahil olmak üzere çok hücreli bileşenler, glial skar oluşumuna katılır (16, 17). Glial hücreler hasara karşı oldukça duyarlıdır. MSS hasarı sırasında, astrositler ve mikroglialar aktif hale gelir ve çoğalmaya başlar, morfolojik ve fonksiyonel değişiklikler ile karakterize edilir, daha sonra glial skarını oluşturur. Astrositik aktivasyon, hücrel hipertrofi, proliferasyon ve gliosis olarak kendini gösterir (18), bu etkiyi yaralanma bölgesine uzak bölgelerde dahi gözlemlemek mümkündür (19, 20). Neden olduğu olumsuz durumlara rağmen glial skar oluşumunun sağladığı pozitif sonuçlar da vardır. Yaralanma yerinin etraftaki normal dokuya yayılmasını önler, böylece hasarı geri alır ve lezyon boşluğunu doldurur (21). Glial yara, hasarlı bölgeyi yeniden yapılandırmaya ve kan damarlarını yeniden düzenlemeye yardımcı olur, daha sonra epitel hücreleri skar dokusuna götürebilir. Bu düzenlemelerine rağmen glial skarın nöral rejenerasyon için ana engel olduğu düşünülmektedir (22, 23).



Şekil 4.1.5. Omurilik ve dorsal kök bölgesi lezyonlarının elemanları (15).

4.2. Rejenerasyon

Rejenerasyon, biyolojinin en eski alanlarından biridir. İlk bilimsel gözlemler 1712’de kerevit (*crayfish*)’lerde uzuv rejenerasyonu hakkında ayrıntılı açıklama yapan Réne-Antoine Ferchault de Réaumur tarafından yapılmıştır. Bunu takip eden yarım yüzyılda çeşitli ve farklı organizmalarda rejenerasyon üzerine çeşitli araştırmalar yapılmıştır: 1740 yılında Braham Trembley tarafından hidra, 1745’te Charles Bonnet tarafından annelitler, 1769’larda Spallanzani tarafından amfibiler, 1770’lerde P. S. Pallas tarafından planaryalar ile çalışmışlar ve bunları rapor etmişlerdir (24).

Rejenerasyon, hasar, travma yahut amputasyon sonrası kopan veya dejenere olan hücrelerin dokuların organların veya uzuvların fonksiyonel olarak restarasyon sürecine verilen isimdir. Stedman’ın Medical Sözlüğüne göre, rejenerasyon; "kayıp ya da yaralanan bölümün yeniden üretimi ya da yeniden oluşturulması" ya da "bir aseksüel üreme biçimi" dir. Bununla birlikte, böyle bir tanım içinde, farklı mekanizmalar olsa da, geniş bir doğal fenomenler yelpazesini içine alır (24).

Rejenerasyon, yeniden yapılanmanın vazgeçilmez bir parçasıdır (25). Dokularımıza zarar gördüğü mekanik ve biyolojik süreçler ile bu hasarı onaran rejeneratif mekanizmalar arasında bir dengenin sürdürülmesi gerekir. Rejenerasyon kapasitesi bir türden başka türe bir türün içindeki bireyden başka bireye ve bir bireyin farklı yaşam evrelerinde farklılıklar gösterebilir. Yaşlandıkça, rejeneratif yeteneklerimiz yavaş yavaş kaybolurken, akut ve kronik yaralanmalar gibi dejeneratif süreçler oluşmaya devam eder (26).

Tarihsel olarak, rejenerasyon çalışmaları, ya rejenere olabilen (örneğin, aksolot) ya da rejenere olamayan (örneğin, fare) hayvanlara odaklanmıştır. İkinci durumda, strateji tipik olarak rejenerasyonu indüklemek için gerekli olan faktörleri ve tedavileri test etmek ve rejenerasyon ile ilgili hücrel ve moleküler olayları tanımlamak için rejenerasyonu düzenleyen mekanizmaları anlama amacı olmuştur. Semenderler ve balıklar gibi hayvanlarda yapılan deneysel çalışmalar, rejenerasyonun ilk olarak inhibe edildiği ve sonrasında rejenerasyon-indükleyici faktörlerin, rejenerasyonun kurtarılıp kurtarılamayacağını belirlemek için test edildiği işlev kaybı deneyleri olarak tasarlanmıştır. Bu yaklaşım sayesinde, rejenerasyonun gerçekleşmesi için gerekli olan faktörler ve biyolojik süreçler tanımlanmıştır (örneğin hücrel proliferasyonu). (26).

4.3. Semenderler

Tetrapodlar arasında, newts ve aksolot gibi sucul semenderler, en büyük rejeneratif spektruma sahiptirler. Semenderler, kurbağalar ve kardeş grubu olan kara kurbağalarından oluşan bir kuyruklu amfibilerdir (27), hem yırtıcı hem de tatlı su biyotoplarında avlanırlar. Böylece, semenderler, uçuş ve avlanma davranışları gibi erken gelişim aşamalarından çevresel uyaranlara karşı karmaşık tepkiler gösterirler (28-30). Aslında, mevcut nöro-gelişimsel prensipler, yirminci yüzyılın başında semender larvalarında yapılan deneylerle önemli ölçüde şekillenmiştir (28, 31-34). Gelişim çalışmalarına ek olarak, semenderler, beyin, retina ve omurilik gibi karmaşık yapıları yeniden oluşturma yetenekleri nedeniyle uzun süredir araştırmacıları etkilemişlerdir (35-38). Bu nedenle, semenderler, rejeneratif kapasiteleri ve gelişimsel süreçleri ve ikisi arasındaki ilişkiyi incelemek için ideal model organizmalardır.

Semenderlerde MSS rejenerasyonu ile ilgili ilk alışmalar, Spallanzani tarafından kuyruk rejenerasyonu üzerine yapılan gözlemlerle on sekizinci yüzyıla kadar uzanmaktadır (39). Bunu takiben, semenderlerde MSS rejenerasyonu, retina, kuyruk amputasyonu veya spinal transeksiyon MSS'nin çıkarılması gibi çeşitli yaralanma modellerinde incelenmiştir (40-44). Semenderler moleküler analizlere uzun süredir refraktr olsa da, genom düzenlemesinden manyetik rezonansa veya difüzyon tensör görüntülemesine kadar uzanan teknolojik ilerlemeler, daha önce yapılmış olandan çok daha yüksek bir çözünürlükte MSS gelişimi ve rejenerasyonunun moleküler ve hücresel süreçlerinin araştırılmasına olanak sağlar. Büyük lekli genom geniş transkripsiyon analizleri, gen pertürbasyon deneyleri ve semenderlerde hücre soyu takibi yapmak mümkün hale gelmiştir (45-49).

Diğer tetrapodlarda olduğu gibi, semenderlerde de bulunan omurilik, dorsal (duyusal), orta (komissural) ve ventral (motor) olarak alt bölümlere ayrılabilen merkezi bir gri madde içerir ve somatotopik olarak düzenlenmiş yükselen spinal çıkıntılarını içeren bir lif blėesi ile talamusa kadar çevrelenir (50-53). Omuriliğe inen yollarını gönderen nöronlar esas olarak orta beyin ve rhombencephalonda bulunduğu gibi aynı zamanda magnoselüler preoptik ve ventrolateral talamik çekirdeklerde de bulunurlar (51, 54).

4.3.1. Semenderlerde MSS yaralanma modelleri

4.3.1.1. Kuyruk amputasyonu ve spinal transeksiyon

Semenderlerde MSS rejenerasyonu çoğunlukla omurilik yaranlanması sonrası incelenmiştir. Semenderlerdeki iki dominant omurilik yaralanması modeli, en sık larvalar üzerinde gerçekleştirilen kuyruk ampütasyonu ve çoğunlukla yetişkinlerde uygulanan omurilik transeksiyonudur (55, 56).

Semenderler, tüm aksial seviyelerde transeksiyonu sonrası erişkin omuriliklerini yeniden canlandıran tek omurgalılarıdır ve hareket yeteneklerini de geri kazanırlar (yüzme) (56, 57). Semenderlerdeki bu yetenek çeşitli türlerde gösterilmiştir: *Ambystoma* (58), *Cynops* (59), *Notophthalmus* (51, 59, 60) ve *Pleurodeles* (61, 62). Hareket yeteneklerinin geri kazanılması, rhombencephalondaki nöronlardan kaynaklanan azalan glutamaterjik ve serotonerjik projeksiyonlarla yeniden innervasyona bağlıdır (51, 60, 62). Omuriliğin merkezi

kanalını kaplayan ependimal hücreler (beyinde ventriküler ependimoglia hücrelerinin karşılığı olan) aksonal rejenerasyonda önemli bir rol oynar. Rejenere prenöral ependimal tüpte, ependimal hücrelerden radyal uzantılar, aralarında aksonların çoğaldığı kanalları oluşturur (63-65). Bu süreç, amfibi embriyo ve larvadaki longitudinal nöral traktların gelişimine oldukça benzerdir (65, 66). Transdüksiyon sonrası omurilik rejenerasyonu, her bir transeksiyon yüzeyinde yara iyileşmesi ile başlar ve kısa bir süre sonra uzun bir terminal vesikülü oluşturmak için merkezi kanalın genişletilmesi ile izlenir (55). Hücre proliferasyonu, migrasyonu ve lif büyümesi, eksik kısım nöronlar ve aksonlar tarafından yeniden doldurulduğu için boşluk kapanmasına katkıda bulunur (59).

Kuyruk amputasyonu üzerine, amputasyon düzlemine yakın bölge, ön-arka eksen boyunca genişleyen rejenerasyon için nöral progenitörleri üretir. Progenitörlerin çoğu rejenerasyon sırasında dorsal-ventral eksen boyunca pozisyonlarını korur, ancak omuriliğin distal ucundaki bazı hücreler ventralden dorsal alanlara geçmektedir (67). Progenitör hücrelerin ekspansiyonu, hızlı büyümenin başlangıcı sırasında mitotik için yeniden oryantasyonu ile hızlı hücre döngüsü girişi ve bunu takiben yeni oluşan omurilikte nörojenez ile gerçekleşir (68, 69).

4.3.2. Aksolot

Aksolot (Meksika semenderi, *Ambystoma mexicanum*) yüksek rejeneratif kapasitesi nedeniyle uzuv ve omurilik rejenerasyon çalışmalarını incelemek için yararlı bir model organizma haline gelmiştir (70).

Aksolotlar yaşam döngülerinin tamamını suda geçirirler. Erkek aksolotların suya bıraktığı spermleri dişi aksolotlar kloakta toplar, iç döllenme gerçekleştirerek döllenmiş yumurtalarını suya bırakırlar ve gelişimlerini burada tamamlarlar. 20°C'lik ortam koşullarında embriyonik gelişim 2 haftada tamamlanır. Aksolotlar yumurtadan çıktıktan sonra morfolojik değişime uğrayarak uzuvlarını oluştururlar, böylece erişkin hale gelirler. Erişkin aksolotlardan dişi olanlarda yumurtadan çıktıktan 9-12 ay arasında çiftleşme olurken, bu süre erkek aksolotlarda 12-15 ay olmaktadır (70). 18-24 aylık olan aksolotlar erişkin haldedirler ve boyutları 15-45 cm arasında değişmektedir. Aksolotlarda rejenerasyon yaşamları boyunca devam etmekte olup, larval dönemde daha hızlı gerçekleşmektedir (71).

Urodellerin çoğunluğunun aksine, aksolotlar, yaşadıkları ortama tiroid hormonu ilavesiyle yapay olarak indüklenmedikçe, metamorfoza girmeyen zorunlu paedomorflardır (72). Vahşi aksolotların ömrü bilinmemekle birlikte, genellikle 10-15 yıl arasında yaşarlar. Hayvanlar, karasal hale gelen ve yetişkin kaplan salamanderlerine (*Ambystoma tigrinum*) benzeyen metamorfoza uğrayacak şekilde indüklenebilir. Aksolotlar aslında kaplan semenderleri ile yakından ilişkilidir ve bu türlerle birlikte diğer çeşitli ambistomatik semender türlerine ek olarak melezleme yapabilirler (73).



Aksolotlun genel vücut planının, tetrapodların en ilkelleri arasında olduğu düşünülse de, bu semenderler, diğer omurgalılarla birlikte bir dizi bazal özelliği paylaşmaktadır ve birçok farklı sistemin çalışması için yararlı olduklarını kanıtlamıştır.

Aksolotlar, iki atriyum ve bir ventrikülden oluşan üç odalı bir kalbe sahiptirler. Kan, vücudu terk ettikçe, pulmoner arterlere veya vücudun geri kalan kısmına giden bir aorttan geçebilir. Oksijenli kan akciğerleri terk eder ve kalbin yalnızca ventrikülüne geri pompalanır. Burada vücuttan daha önce dolaşımda olan oksijenli kan ile karışır. Bu üç odacıklı sistem, memelilerde ve kuşlarda görülen dört odacıklı sistemden daha az etkilidir. Aortik yay sayısı farklı urodel türleri arasında farklılık gösterebilir, ancak aksolotlar her zaman dört aortik yay sahiptirler (74).

Tüm amfibiler gibi, aksolotların da kalp atım hızları çevrelerinin sıcaklığından etkilenir. Hematopoez, erişkin karaciğer ve dalaktan kaynaklanır (75) ve eritrositleri çok büyük, çekirdekli ve oldukça otofloresan özelliktedir. Hasar, aşırı kan kaybını önlemek için hızlı vazokonstriksiyona neden olur ve pıhtılaşma ile devam eder.

Aksolotlar çok ilkel bir bağışıklık sistemine sahiptirler. Çözünür antijenlere karşı humoral bir tepki oluşturmazlar (76), sadece iki immünoglobülin sınıfı üretirler ve antijenlere karşı antikorları yavaş üretirler (77). Bu immün yetmezlik urodelerde yaygındır ve aksolotlar diğer semenderlerden doku ve organ transplantasyonunu reddetmeme özelliğindedirler. Transgenik GFP aksolotlar sayesinde rejenerasyon sırasında hücresel plastisite ve konumsal belleğin temelini ortaya çıkarmak için kullanılmaktadırlar (78).

Kazanılmış bağışıklık sistemindeki bu eksikliklere rağmen, aksolot hala bakteriyel enfeksiyonlara dirençlidir. Bunun nedeni muhtemelen mukus tabakası ve ürodeller için doğuştan gelen bağışıklık sistemidir. Antimikrobiyal peptitler ek bir savunma katmanı sağlarken, bol nötrofiller ve makrofajlar hızla yabancı istilacıları içine alır ve yok ederler (79). İki haftalık aksolotlar da, cerrahi müdahaleden sonra bile bakteriyel enfeksiyon minimal düzeydedir. Aksolot immün sisteminin başka bir hususu ise makrofajların erken ablasyonu blastema formasyonunu tamamen inhibe ettiği ve ekstremité amputasyonundan sonra aşırı kollajen birikimi ile sonuçlandığı için, makrofajların rejenerasyon için gerekli olduğudur (80).

Erişkin aksolot epidermisi, diğer larval amfibiler ile benzerdir ve memeliler veya metamorfoz geçiren amfibilerin sahip olduğu farklı katmanları içermezler (81). Epidermal leyding hücreleri tarafından salgılanan mukusla kaplanmış dermal mukus bezleri nemi tutmaya yardımcı olur ve mikrobiyal tehditlere karşı dayanıklıdır. Bu mukus tabakası çok yapışkan ve hayvanların cerrahi manipülasyonu sırasında etkili bir doğal yapıştırıcı işlevindedir. Epidermal iyileşme ve rejenerasyon tamamen skarsızdır ve uzun süreli fibrozis olmadan ortaya çıkar (81).

Aksolot beyni basit bir yapıdadır ve memeli embriyonik beyinle birkaç benzerlik göstermektedir. Aksolot beyni telencephalon, mezensefalon ve rhombencephalon arasında belirgin ayrıntılar ile uzamıştır. Koku lobu büyüktür, ancak optik loblar küçük ve zayıf bir şekilde ayrılmıştır ve beyincik nispeten daha az ve zayıf bir şekilde gelişmiştir (82). Beyincik, paraventriküler olmayan tüm diğer nöronlar sabit kalır ve gelişim sırasında germinal bölgeden göç etmeyen, aksolot merkezi sinir sistemindeki tek nöronları içerir (83).

Aksolot uzuv rejenerasyonu, kompleks doku rejenerasyonu arasında klasik olarak çalışılan en uygun örnektir. Aksolot da uzuv amputasyonundan sonra, progenitor hücreler veya farklılaşan hücreler ekstremitayı rejenere etmek için gelişimsel süreçleri çoğaltır ve tekrar ederler (36). Olgun aksolotlar amputasyondan yaklaşık 32 gün sonra uzvu rejenere edebilmekte, 100 gün sonra ise uzvun tamamını eski haline getirebilmektedirler. 3 aylık aksolotlar ise amputasyondan yaklaşık 22 gün sonra uzvu rejenere edebilmekte, 66 gün sonra ise uzvu tekrar eski haline getirebilmektedirler (84).

4.3.2.1. Aksolotta sinir sistemi rejenerasyonu

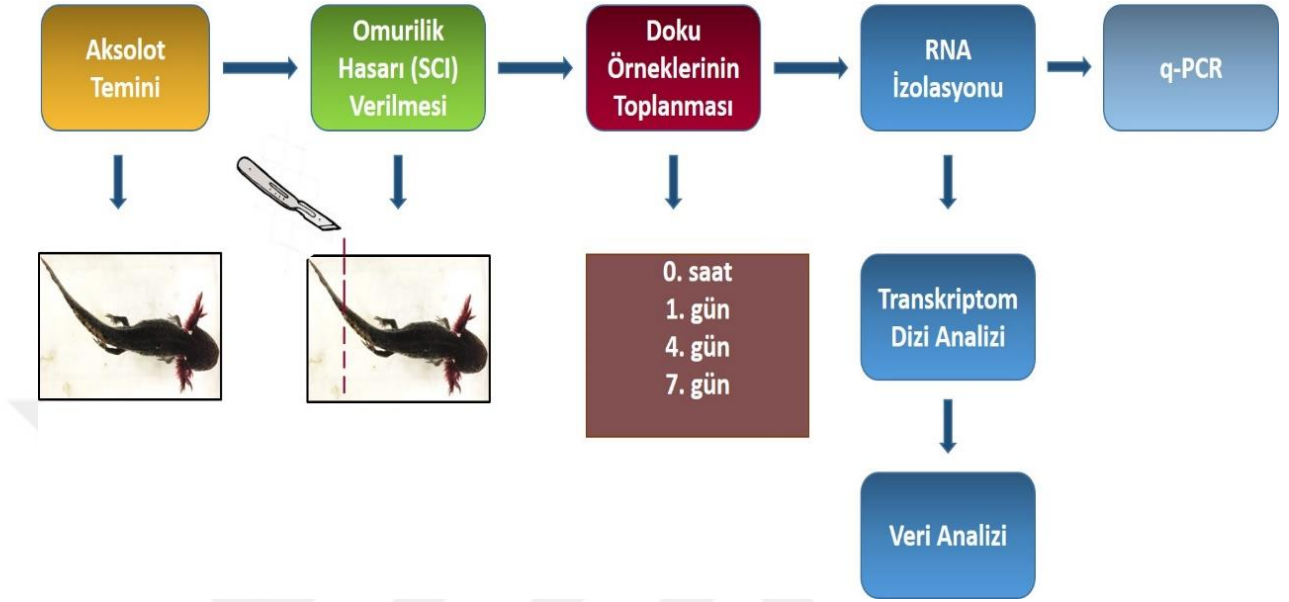
Diğer tetrapodlarla benzer bir şekilde düzenlenen aksolot periferik sinir sistemi (PNS) basittir ve aksolot periferik sinirler özellikle genç hayvanlarda miyelinli olarak bulunmaktadır. Aksolot PNS, sinir bağımlı rejenerasyon olayı nedeniyle araştırmacılar için özellikle ilgi çekicidir. Bir uzvunun kesilmesi ve yaklaşık 7 gün içinde denerve edilmesi durumunda blastema yapısı oluşmaz ve rejenerasyon meydana gelmez. Bu olayın nedeni araştırılmakla beraber, rejeneratif süreci desteklemek için gerekli olan sinir salgılayan mitojenik faktörlerin kaybına bağlı olabildiği de düşünülmektedir (71).

Merkezi sinir siteminde sınırlı rejeneratif potansiyele sahip olan memelilerin aksine, aksolot merkezi sinir sistemi yaralanmalarından kurtulabilir. Beynin büyük bir kısmına hasar verilen aksolot, yeniden beyin tamamını rejenere edebilir (85, 86). Yetişkin aksolot beyinlerin ventriküler bölgesi boyunca nöronal proliferasyon yapılan çalışmalarda gözlemlenmiştir (87). Ayrıca aksolotlar omurilik zedelenmesinden sonra omuriliği rejenere edebilirler ve kuyruk amputasyonu sonrası rejenerasyon ile omurilik ve kuyruk tekrardan eski haline getirebilir. Bu rejeneratif süreçler, memelilerde MSS hasarı sonrası aksonal büyümeyi inhibe ettiği düşünülen bir glial skar oluşmadan gerçekleşir (88, 89).



5 MATERİYAL VE METOD

Bu tez çalışması boyunca izlenen deney planı şekil 5.1’de özetlenmiştir.



Şekil 5.1 Yöntem Figürü.

Bu tez kapsamında gerçekleştirilen çalışmalar belirtildiği gibidir;

- Aksolotların temini,
- Aksolotların bakımı,
- Aksolotlara omurilik hasarı verilmesi,
- Doku örneklerinden RNA kütüphanesinin hazırlanması ve RNA dizi analizinin yapılması,
- Kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (q-PCR).

5.1. Aksolotlar’ın Temini

Bu çalışma için kullanılan Aksolotlar, Ambystoma Genetic Stock Center (AGSC)’dan getirilmiş olup İstanbul Medipol Üniversitesi Tıbbi Araştırmalar Merkezi’nde (MEDİTAM) çoğaltılmıştır. Kullanılan 6 aylık, 8-10 cm boylarında doğal tip 60 Aksolot için İstanbul Medipol Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu’ndan etik kurul onayı (Onay No: 38828770-604.01.01-E.2303) alınmıştır.

5.2. Aksolotlar'ın Bakımı

Çalışmadaki 6 aylık ergen 8-10 cm boyundaki 60 Aksolotun her biri bir akvaryumda olacak şekilde ~ 20°C sıcaklıkta tutulmuştur. Holtfreter's Solüsyonu içerisinde, her iki günde bir pellet yem (JBL novolotl) ile beslenmişlerdir.

5.3. Kullanılan Malzemeler

Tablo 5.3.1 Kullanılan kitlerin ve sarf malzemelerin listesi.

Sarf Malzeme Adı	Firma	Katalog Numarası
Benzocaine	Sigma	E1501-100G
TRIZol Reagent	Thermo Fisher	15596026
Glikojen	Thermo Fisher	R0551
SuperScript revers transkriptaz enzimi	Thermo Fisher	11752250
2X SYBR Green	Bio-Rad	1725141
TrueSeq RNA Sample Preparation Kiti	Illumina	RS-122-2001

5.4. Cihazlar

Tablo 5.4.1 Kullanılan cihazların listesi.

Cihaz	Marka	Model
Spectramax cihazı	SpectraMax-Paradigm	Multi-Mode Microplate Detection Platform from Molecular Devices LLC
Mikrosantrifuj	Thermo Scientific	MicroCL 17R
PCR cihazı	BIO-RAD	Thermal Cycler
qRT-PCR cihazı	BIO-RAD	CFX Connect Real-Time System
NextSeq	Illumina	

5.5. Aksolotlara Omurilik Hasarı Verilmesi

Tek doğumdan elde edilmiş kardeş Aksolotlardan uzunluğu 8-10 cm olan toplamda 60 tane neotenik canlı kullanılmıştır. Hayvanlar ampüte edilmeden önce %0.01 benzokain ile anesteziye sokulmuş ve amputasyon sonrası rejenerasyon için 20 °C'de tutulmuştur. Hayvanlar anestezi altına alındıktan sonra kloakanın ve kuyruk ucunun ortasından bisturi yardımıyla kesilmiştir. Kesim bölgesinin yaklaşık 1 mm'lik proksimal kısmından 0. gün için bisturi yardımıyla örnek toplanmıştır. Diğer günler olan 1. gün yara iyileşmesi ve 4., 7. gün örnekleri içinde, çıkan blastema dikkate alınarak aynı işlem uygulanmıştır. Toplanan her örnek yıklanmaması için sıvı nitrojen içerisine konulmuştur. Kuyruk bölgesinin kesilmesine maruz kalan canlılar cerrahi işlem bitince akvaryumlarına geri konulmuştur.

5.6. Doku Örneklerinden RNA Kütüphanesinin Hazırlanması ve RNA Dizi Analizi Yapılması

Doku örneklerinden RNA kütüphanesinin hazırlanması ve RNA dizi analizinin yapılması için TRIzol Reagent (Thermo Fisher, Kat. No: 15596026) kullanılarak örneklerin RNA izolasyonu yapılmıştır. -80°C'de bekletilen örnekler havan yardımı ile parçalanmadan önce degrade olmaması için sıvı nitrojen içerisine alınmıştır.

5.6.1. Mekanik parçalama

Doku örneklerinin mekanik parçalanması için, aynı zaman dilimlerine ait örnekler önceden sterilize edilmiş ve içine bir miktar sıvı nitrojenin konulduğu havan içerisine alınarak havan tokmağı yardımıyla ezilerek parçalanmıştır. Toz haline gelen doku örnekleri 1 ml TRIzol Reagent içeren ependorf tüpe aktarılmıştır. Örneklerle, çeker ocak altında pipetleme yapılmış sonrasında da vortekslenerek iyice homojenize edilmiştir. 3-5 dakika oda sıcaklığında bekletilen örneklerin üzerine 1 ml TRIzol için 200 µl kloroform eklenmiştir. Kloroform eklendikten sonra 15 saniye vortekslenen örnekler 2-3 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Inkübasyon sonrası 4°C'de 15000 x g'de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası ependorf tüpte üç farklı faz oluşumu görülmüştür. Bu fazlardan en üstte berrak olan faz, dokudaki RNA'ları, ortadaki ara faz DNA'yı içerirken en alttaki organik faz da protein ve lipidleri içermektedir.

RNA izolasyonu için en üstte bulunan berrak faz, diğer fazlarla karışmamasına dikkat edilerek başka bir ependorf tüpe aktarılmıştır.

5.6.2. RNA izolasyonu

Yeni 1.5 ml'lik ependorf tüpe aktarılan üst faza, başlangıçta kullanılan 1 ml TRIzol'e 500 µl olacak şekilde izopropanol eklenmiştir. Elde edilecek RNA miktarının artması amacıyla 5 µl glikojen (Thermo Fisher, Kat. No.: R0551) eklenerek pipetleme yapılmış, 10 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. 4°C de 12000 x g'de 10 dakika santrifüj yapılmış, santrifüj sonrası süpernatant uzaklaştırılarak, elde edilen pelletin üzerine 1 ml TRIzol için 1:1 oranında olacak şekilde 1 ml %75 EtOH konulmuştur. Örnekler vortekslenmiş ve sonrasında da 4°C de 7500 x g'de 5 dakika santrifüj yapılmıştır. Santrifüj sonrası süpernatant uzaklaştırılmış, elde edilen RNA pelletinden EtOH'ı iyice uzaklaştırmak için ependorf tüp havada kurutulmuştur. Pellet üzerine 20 µl RNaz içermeyen su eklenerek pellet çözölmüştür. RNA konsantrasyonunun saflık ölçümü için SpectraMax cihazındaki 230nm, 260nm, 280nm dalga boylarındaki absorbans değerleri ölçölmüştür. Ölçüm sonrası RNA örnekleri transkriptom çalışmasında kullanılmak üzere -80°C'de saklanmıştır.

5.6.3. Transkriptom çalışması

Transkriptom çalışmasına başlanırken Qubit kullanılarak RNA miktar tayini yapılmış ve İllumina RNA sekanslama cihazına uygun olacak şekilde kütüphane hazırlamak için TrueSeq RNA Sample Preparation Kiti kullanılmıştır. RNA fragmanetlerini cDNA'ye çevirmek için reverse transkripsiyon işlemi uygulanmıştır. Bu işlemin ardından PCR yapılmış ve RNA fragmentleri çoğaltılmıştır. Çoğaltılan RNA fragmentlerinin yüzde 6'lık poliakrilamid jel elektroforez metoduyla 145 ile 160 bp arasındaki bant profillerine bakılarak kesilmiş ve 2 ml tüp içine yerleştirilmiş 0,5 ml Gel Breaker tüplere alınmıştır. Örnekler 20000 g'de 2 dakika santifüj edilerek örneğin jelden ayrılması sağlanmıştır. Kısa bir inkübasyon sonrasında örnekler 0,5 mikron metrelik filtresi bulunan özel tüplere alınarak 600 g de 10 saniye santifüj edilmiştir. RNA saflaştırılmasının sağlanmasından sonra örneklerin konsantrasyonları eşitlenmiş ve daha sonra örnekler Illumina MiSeq cihazına yüklenmiştir. Elde edilecek datalar CLC workbench programı kullanılarak analiz edilerek listelenmiştir. Listelenen RNA'ların Aksolot ve diğer organizmalardaki adlandırılmasının yapılması

için The National Center for Biotechnology Information (NCBI) veribankası ve Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) kullanılarak böylece bulunan RNA'ların adlandırılması sağlanmıştır.

5.7. Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR)

SCI sonrası toplanan doku örneklerinden izole edilen RNA'dan cDNA yapımı için SuperScript revers transkriptaz enzimi (ThermoFisher Scientific) kullanıldı ve üretici firmanın protokolü takip edildi. İzlenilen protokole bakıldığında:

1 ng- 5 µg arası total RNA ya da mRNA'ya, 10 mM dNTP karışımından 1 µl ve 1 µl oligo(dT) primeri eklendi ve RNase içermeyen su ile reaksiyon hacmi 10 µl'ye tamamlandı. RNA-primer karışımı 65°C'de 5 dakika inkübe edildi. Bu RNA'daki katlanmaların açılması yani ikincil yapısının kırılması açısından önemlidir. İnkübasyon sonrası örnekler buzda 1 dakika bekletildi. Daha sonra 10X RT tamponundan 2 µl, 25 mM MgCl₂'den 4 µl, 0.1 M DTT'den 2 µl ve RNaseOUT™'dan (40 U/µl) 1 µl tüpe eklendi. Aşağı yukarı yönde pipetleme yapılarak solüsyonun iyice karışması sağlandı. Karışım 42°C'de 2 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrası tüpe 1 µl SuperScript™ II RT enzimi eklendi. Reaksiyon için tüpler 42°C'de 1 saat inkübe edildi. Reaksiyonun durdurulması ve enzimin inaktivasyonu için 70°C'de 15 dakika inkübasyon yapıldı ve örnekler buza konup qPCR reaksiyonuna geçildi.

Deneylerde tüm cDNA örnekleri ve standart örnekler aynı şartlarda ve aynı grup içerisinde 3'er kez çalışıldı ve bu üç ölçümün ortalaması analizlerde kullanıldı. Kontrol olarak aksolot GAPDH geni (housekeeping gen olarak) normalizasyonda kullanıldı. qPCR için hazırlanacak karışım şu şekildedir:

Tablo 5.7.1 qPCR reaksiyon içeriği.

Reaksiyon içeriği	Miktar
2X SYBR Green karışımı	10 µl
Forward Primer (10pmol/ µl)	0.8 µl
Reverse Primer (10pmol/ µl)	0.8 µl
cDNA	1µl
Distile su	7.4 µl

İzlenecek sıcaklık döngüsü ise şu şekildedir:

1. 95°C 5 dk. başlangıç denatürasyonu takiben,
2. 95°C 30 sn. denatürasyon,
3. 55°C 30 sn. primer bağlanması ve
4. 72°C 30 sn. uzama.

Bu basamaklardan 2-4 basamakları 40 döngü şeklinde devam edecektir. Belirtilen koşullardaki reaksiyon Bio-Rad CFX Real-Time PCR cihazında gerçekleştirilecektir.

Bu çalışmada kullanılacak primerler ise tablo 5.7.2’de gösterildiği gibidir;

Tablo 5.7.2 Kullanılan primerlerin adı ve sekansları.

Primer Adı	Primer Sekans
Ax_qPCR_RPL4_F	TGAAGAACTTGAGGGTCATGG
Ax_qPCR_RPL4_R	CTTGCGCTCTGCAGATTTTTT
Ax_qPCR_GAPDH2_F	GGCATTGCCCTCAACGATCACTTT
Ax_qPCR_GAPDH2_R	TCTATTCCTTGCTGGCCATGTGGA
Ax_qPCR_SkeMus_F	TGCCTTCAGTCGATGAGCTA
Ax_qPCR_SkeMus_R	CGTCATCGTCGTCGTCGT
Ax_qPCR_PEG10_F	GGGCCTTGATCACATCAAAC
Ax_qPCR_PEG10_R	TAGACCGTAATTGGCTTCC
Ax_qPCR_LOC107_F	GGACATGTCACCTCGCATGAA
Ax_qPCR_LOC107_R	ACCGCGAGAAAGTTGAAGAA
Ax_qPCR_Zona_F	TCAAACGGAACTGAAACCA
Ax_qPCR_Zona_R	GCACAGGAACTGGAGGTGAT
Ax_qPCR_Per_F	GATTGGAGGTGGCCAGACTA
Ax_qPCR_Per_R	AACAATGGGCTCTCCTTGAA
Ax_qPCR_Dec_F	CCAAAGGATATCCCGTCAGA
Ax_qPCR_Dec_R	TGATGGCAGTTCCTTCAGGT
Ax_qPCR_SSUH2_F	GGAACCAAAGCTGTTCCAAA
Ax_qPCR_SSUH2_R	AATTGAAGCATCTGGGAACG
Ax_qPCR_lum_F	GCAAAGTTGCCCATAGGACT

Ax_qPCR_lum_R	GCTGGGATGCTACTCAGCTC
Ax_qPCR_LOC_F	TAGCTGCCCTGGTGGACTAC
Ax_qPCR_LOC_R	TGTGCCAGCTCCTCTTTCTT
Ax_qPCR_PIF1_F	CAAAGTGAATTTTGTGTGTCACG
Ax_qPCR_PIF1_R	ATGTGTGACCAAGCCACAAC
Ax_qPCR_SCAAT_F	GACCAGGACCAAATGGAATG
Ax_qPCR_SCAAT_R	CTGTTTTCACTCCCGGTGTT
Ax_qPCR_Periplakin_F	ATCTCGGGACAAAGATGCTG
Ax_qPCR_Periplakin_R	CCCAGTCACACTCCTGGTTT

5.8. Biyoinformatik

Transkriptom çalışmasındaki RNA'lara karşılık gelen proteinlerin BLAST üzerinden *Mus musculus* ortoloğu bulunmuştur. Bir sonraki adımda ise belirlenen bu proteinlerin analizi yapılmıştır. Bu amaçla PANTHER Classification System kullanılarak, tüm proteinlerin ortologları PANTHER sistemine yüklenmiş, belirlenen bu proteinlerin biyolojik süreç, moleküler fonksiyon, hücresel bileşen, protein sınıfı PANTHER aracılığıyla grafik haline getirilmiştir.

Bu sırada da proteinlerin BLAST üzerinden bulunan *Mus musculus* ortolokları STRING sistemine yüklenmiş ve belirlenen proteinlerin birbirleriyle olan bağlantısı bulunarak grafik haline getirilmiştir.

6 BULGULAR

Omurilik hasarı verilen aksolotlardan alınan doku örneklerinden, Trizol Reagent ile RNA izolasyonu yapıp, transkriptom ile RNA kütüphanesi oluşturulmuş ve RNA dizi analizi yapılmıştır. PANTHER Sınıflandırma Sistemi ile farklı zaman aralıkları için moleküler fonksiyon, biyolojik süreç, hücresel bileşen ve protein sınıf gruplandırılması yapılmış hem de STRING üzerinden proteinlerin birbirleriyle olan etkileşimleri grafik haline getirilmiştir.

6.1 Transkriptom Analizi

Bu tez çalışması için yapılan transkriptom analizinde RSEM protokolü (90) kullanılmıştır. RSEM; bir referans genomunun varlığına dayanmadığından, de novo transkriptome düzenekleriyle miktar tayini için özellikle faydalıdır.

1.gün örneklerinin 0.gün örneklerine karşılaştırılmasında anlamlı değişim gösteren 605 tane transkript elde edilmiştir. Bunlardan 245 tanesinin *Mus musculus* karşılığı bulunmuş olup, 62 tanesinin daha yüksek seviyede ifade edildiği, 183 tanesinin ise daha düşük seviyede ifade edildiği bulunmuştur.

Aynı işlem diğer zaman aralıklarına da uygulanarak; 4.gün örneklerinin 0.gün örneklerine karşılaştırması yapıldığında anlamlı değişim gösteren 500 tane transkript bulunmuş olup, 217 tanesinin *Mus musculus* karşılığı tanımlanmıştır. Bu tanımlanan transkriptlerin 87 tanesi daha yüksek seviyede ifade edilirken, 130 tanesinin daha düşük seviyede ifade edildiği bulunmuştur.

7.gün örneklerinin 0.gün örneklere karşılaştırılmasında ise; anlamlı değişim gösteren 381 tane transkript elde edilmiştir. Bunlardan 213 tanesinin *Mus musculus* karşılığı tanımlanarak 41 tanesi daha yüksek seviyede ifade edilirken, 172 tanesinin daha düşük seviyede ifade edildiği görülmüştür.

Tüm zaman dilimleri için yapılan transkriptom analizleri içerisinde yüksek seviyede ifade edilen ve düşük seviyede ifade edilenler olarak en uygun 20 RNA tablolar haline getirilmiş olup, bu tablolar ekler kısmında verilmiştir. Ekler kısmında bulunan bu listeler içerisinde sinir sisteminde görevli olanlar ise Tablo 6.1.1’de gösterilmiştir.

Tablo 6.1.1 Tüm zaman dilimleri için sinir sisteminde görev alan RNA'lar.

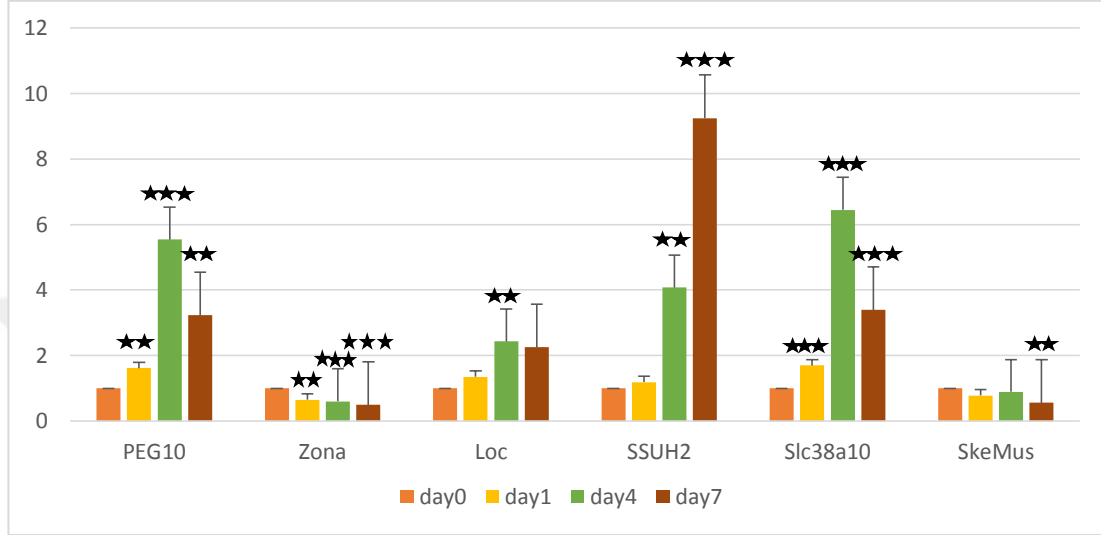
RNA dizileme numarası	PostFC	Zaman aralığı	Açıklama
AMEXTC_0340000126316	89,82712158	D1vsD0 yüksek seviyede ifade edilir.	XP_021489437.1 zinc finger BED domain-containing protein 6 [Meriones unguiculatus]
AMEXTC_0340000067758	0,032951225	D1vsD0 düşük seviyede ifade edilir.	XP_018089084.1 PREDICTED: protein S100-G-like [Xenopus laevis]
AMEXTC_0340000032782	15,94340835	D4vsD0 yüksek seviyede ifade edilir.	ASW28000.1 tenascin-C [Ambystoma mexicanum]
AMEXTC_0340000022484	13,47883787	D4vsD0 yüksek seviyede ifade edilir.	XP_018114574.1 PREDICTED: collagen alpha-1(VII) chain-like isoform X2 [Xenopus laevis]
AMEXTC_0340000242350	0,02712957	D4vsD0 düşük seviyede ifade edilir.	ELW48343.1 High mobility group protein B1 [Tupaia chinensis]
AMEXTC_0340000007234	5,916774809	D7vsD0 yüksek seviyede ifade edilir.	XP_017951799.1 PREDICTED: filamin-A isoform X3 [Xenopus tropicalis]

6.2 Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qPCR)

Elde edilen transkriptome datası incelenerek, rejenerasyon sırasında tüm zaman dilimleri için miktarı değişiklik gösteren RNA'ların rejenerasyon için önemli roller oynayabileceği düşünülüp bu RNA'ları kodlayan genler qPCR analizi için seçilmiştir.

Omurilik hasarı sonrası alınan doku örneklerinin transkriptom analizi sonrası 0.gün, 1.gün,4.gün ve 7.günlerde miktarları değişen retrotransposon-derived protein PEG10 (*PEG10*), zonadhesin-like (*Zona*), uncharacterized protein LOC (*Loc*), protein

SSUH2 homolog (*SSUH2*), putative sodium-coupled neutral amino acid transporter 10 isoform X4 (*Slc38a10*), skeletal muscle (*SkeMus*) genlerinin qPCR analizi yapılmış olup, farklı zaman dilimlerinde rejenerasyon aşamalarına uygun olarak değişim gözlemlenmiştir. (Şekil 6.2.1).



Şekil 6.2.1 Tüm zaman dilimleri için ortak olan genlerin qPCR analizi.

Farklı grup verilerinin ortalamaları arasındaki farklılıkların istatistiksel olarak belirlenmesi için Student's t-testi de yapılmıştır (Şekil 6.2.1). Bu teste göre $p < 0.05$ *, $p < 0.01$ **, $p < 0.001$ *** olacak şekilde qPCR grafiği üzerinde gösterilmiştir.

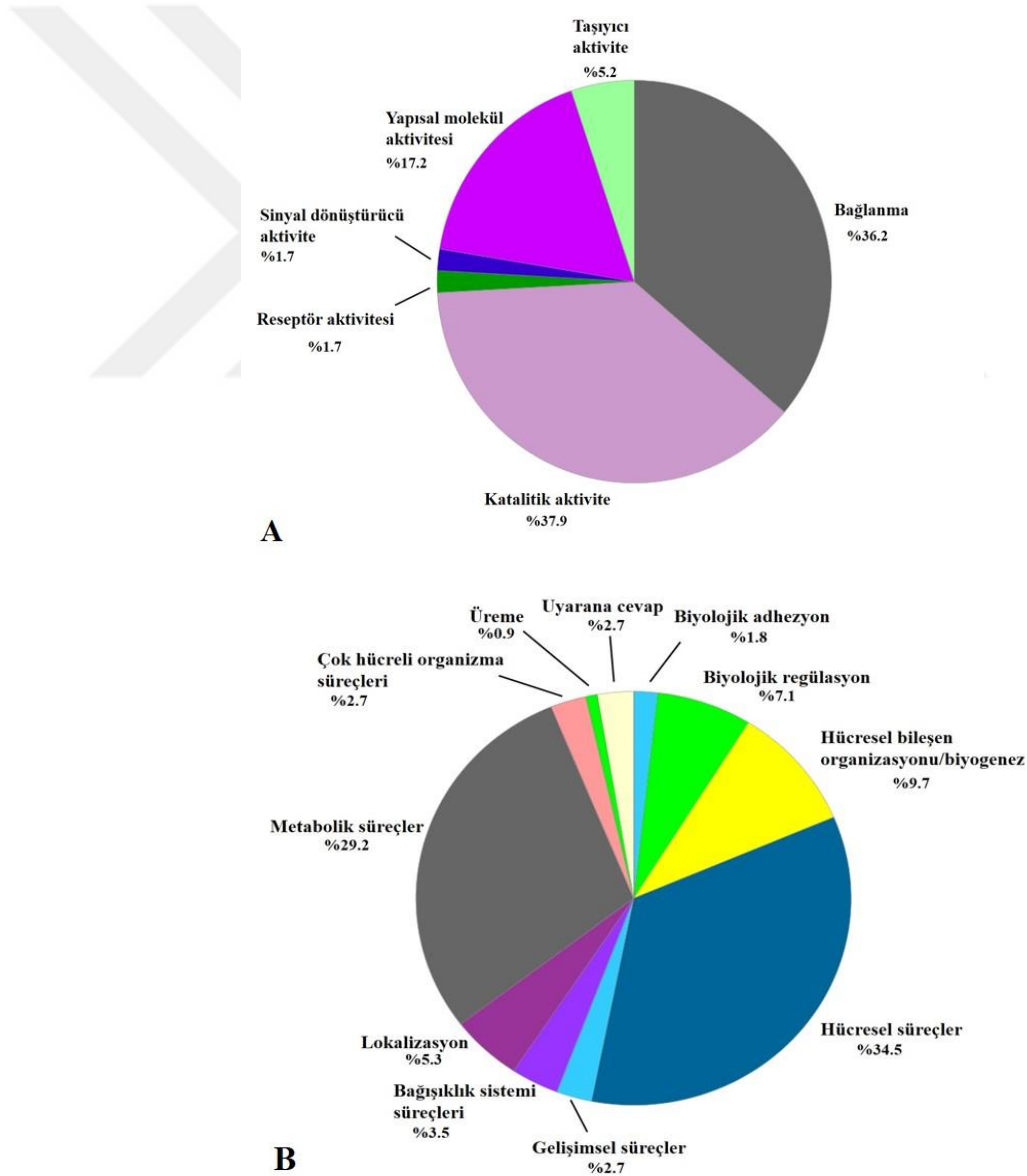
6.3 PANTHER Sınıflandırma Sisteminin Kullanılması

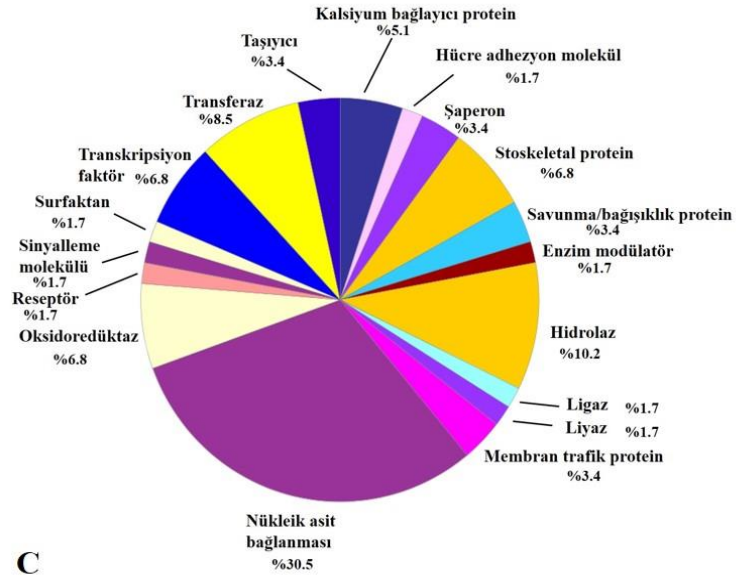
PANTHER Sınıflandırma Sistemi, sekanslama, proteomik veya gen ekspresyonu deneylerinden elde edilen geniş çaplı, genom çapında verileri analiz etmeyi sağlayan gen fonksiyonunu, ontolojiyi, yolları ve istatistiksel analiz araçlarını birleştiren kapsamlı bir sistemdir (91). Bu tez çalışmasında bu sınıflandırma sistemini kullanarak proteinlerin sınıflandırılması amaçlanmıştır.

PANTHER Sınıflandırma Sistemi'ne yüklenecek olan referansların aksolot karşılığı olmadığından, NCBI üzerinden BLAST kullanılarak *Mus musculus* ortologları bulunmuştur. Elde edilen referanslar PANTHER Sınıflandırma Sistemi'ne yüklenerek her bir zaman dilimi için moleküler fonksiyon, biyolojik süreçler, hücresel süreçler ve protein sınıflandırılmaları analizi yapılmıştır.

6.3.1 1.gün RNA örneklerinin 0.gün RNA örneklerine göre PANTHER Sınıflandırma Sistemi ile analiz edilmesi

SCI sonrası örneklerin PANTHER sınıflandırma sistemindeki moleküler fonksiyon, biyolojik süreç, protein sınıflandırması analizine bakılmıştır. 1.gün örneklerinin 0.gün örneklerine karşılaştırılması sonrası moleküler fonksiyon analizine bakıldığında, RNA'ların yaygın olarak aktivite olarak bağlanma (%36.2), katalitik aktivite (%37.9) veya yapısal molekül aktivitesinde (%17.2) görevli olduğu görülmüştür. Bununla beraber, taşıyıcı aktivite, sinyal dönüştürücü aktivite ve reseptör aktivitesinde de görevli RNA'ların yer aldığı görülmektedir (Şekil 6.3.1 A.).





Şekil 6.3.1 1.gün RNA örneklerinin 0.gün RNA örnekleri ile karşılaştırılmasının PANTHER veri tabanı ile analizi. A. Moleküler fonksiyon analizi. B. Biyolojik süreç analizi. C. Protein sınıflandırması analizi.

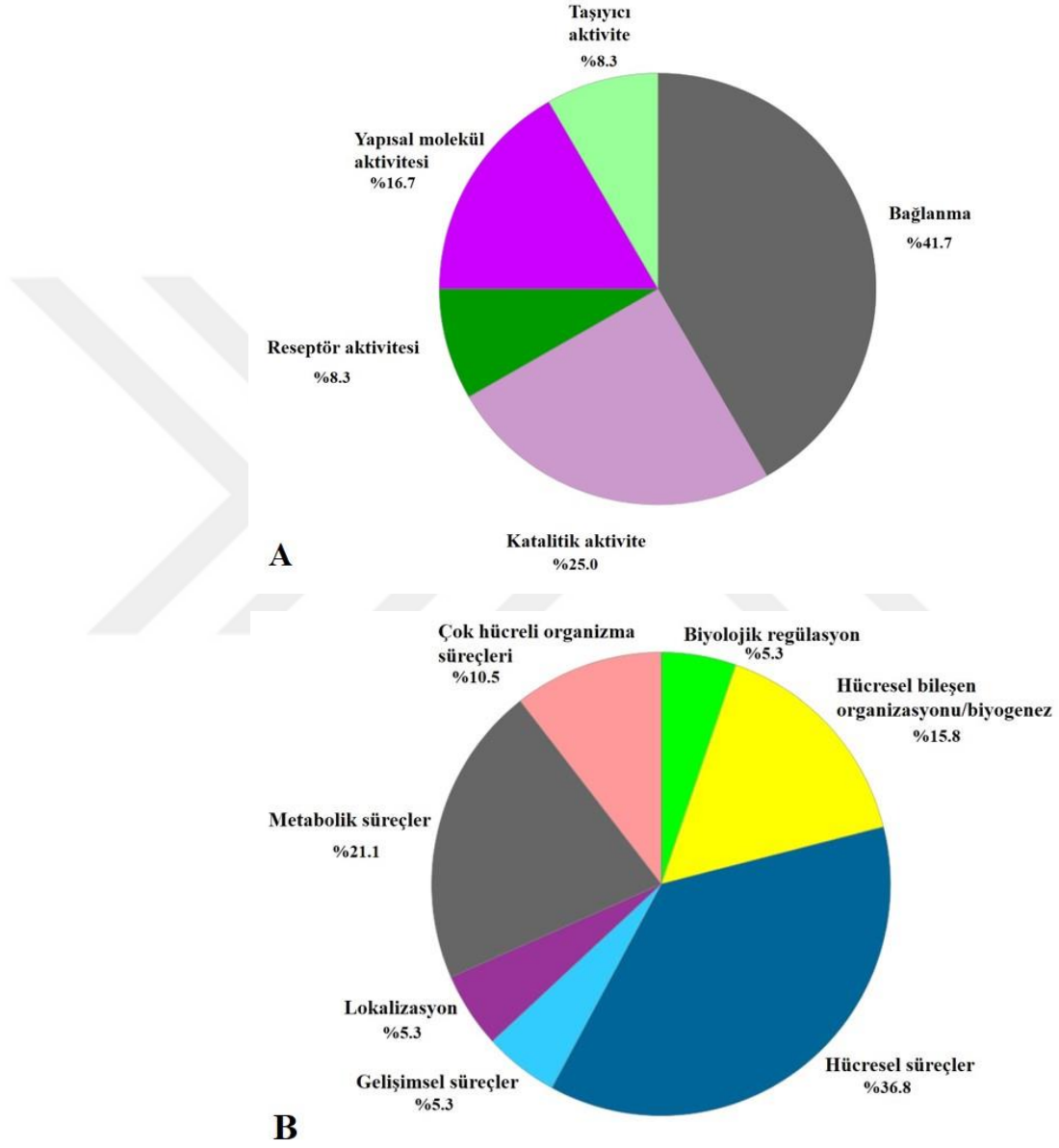
Biyolojik süreçlerin analizinde ise RNA'ların yaygın olarak hücresel süreçler (%34.5), metabolik süreçler (%29.2) ve hücresel bileşen organizasyonunda (%9.7) sınıflandırıldığı görülmektedir. Bunun yanı sıra, biyolojik regülasyon, biyolojik adhezyon, uyarana cevap, üreme, çok hücreli organizma süreçleri, lokalizasyon, bağışıklık sistemi süreçleri ile gelişimsel süreçlerde de RNA'ların yer aldığı görülmektedir (Şekil 6.3.1 B.).

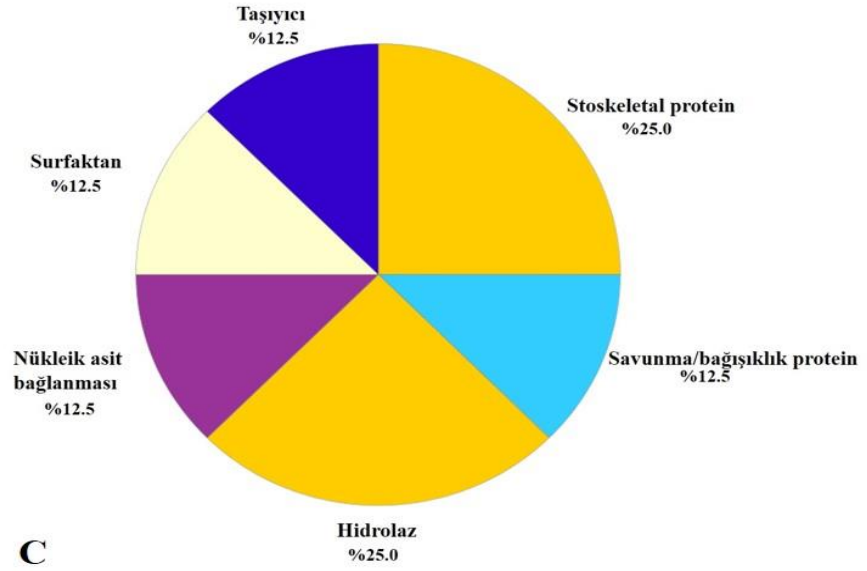
Protein sınıflandırması analizinde, RNA'ların daha çok nükleik asit bağlanmasında (%30.5) yer alırken, bir kısmının da kalsiyum bağlayıcı protein, hücre adhezyon molekülü, şaperon, stokeletal protein, savunma/bağışıklık proteini, enzim modülataör, hidrolaz,ligaz, liyaz, membran trafik proteini, oksidoredüktaz, reseptör, sinyalleme molekülü, surfaktan,transkripsiyon faktör, transferaz, taşıyıcı olarak görevlendirildiği görülmektedir (Şekil 6.3.1 C.).

6.3.2 1.gün RNA örneklerinden 0.gün RNA örneklerine göre daha yüksek seviyede ifade edilenlerin PANTHER Sınıflandırma Sistemi ile analiz edilmesi

SCI sonrası omurilik dokusunda elde edilen transkriptlerden tanımlanarak ifade edilen 245 RNA'dan ifadesi daha yüksek seviyede olan 62 tanesinin PANTHER

sınıflandırma sisteminde moleküler fonksiyon, biyolojik süreç ve protein sınıflandırılmasına bakılmıştır. Moleküler fonksiyon analizine göre bağlanma (%41.7), katalitik aktivite (%25.0), yapısal molekül aktivitesi (%16.2) taşıyıcı aktivite (%8.3) ve reseptör aktivitesi (%8.3)'nde de görevli RNA'ların yer aldığı görülmektedir (Şekil 6.3.2 A.).





Şekil 6.3.2 1.gün RNA örneklerinin 0.gün RNA örnekleri ile karşılaştırılmasında daha yüksek seviyede ifade edilenlerin PANTHER veri tabanı ile analizi. A. Moleküler fonksiyon analizi. B. Biyolojik süreç analizi. C. Protein sınıflandırması analizi.

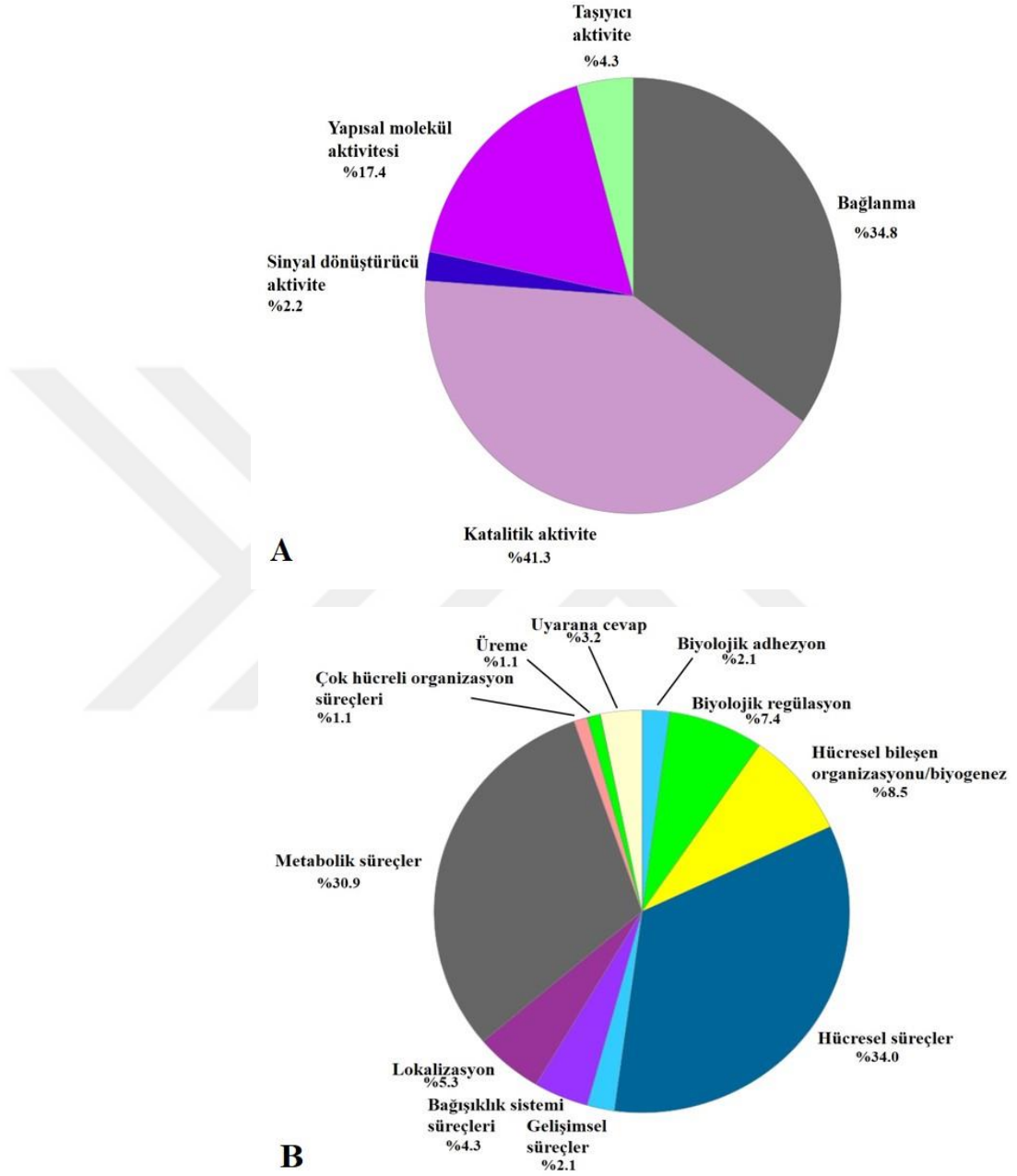
Biyolojik süreçlerin analizine bakıldığında ifadesi daha yüksek seviyede olan 62 tane RNA'nın hücresel süreçler (%36.8), metabolik süreçler (%21.1) ve hücresel bileşen organizasyonu (%15.8), çok hücreli organizma süreçleri (%10.5), biyolojik regülasyon (%5.3), lokalizasyon (%5.3), ile gelişimsel süreçler (%5.3) de RNA'ların sınıflandırıldığı görülmektedir (Şekil 6.3.2 B.).

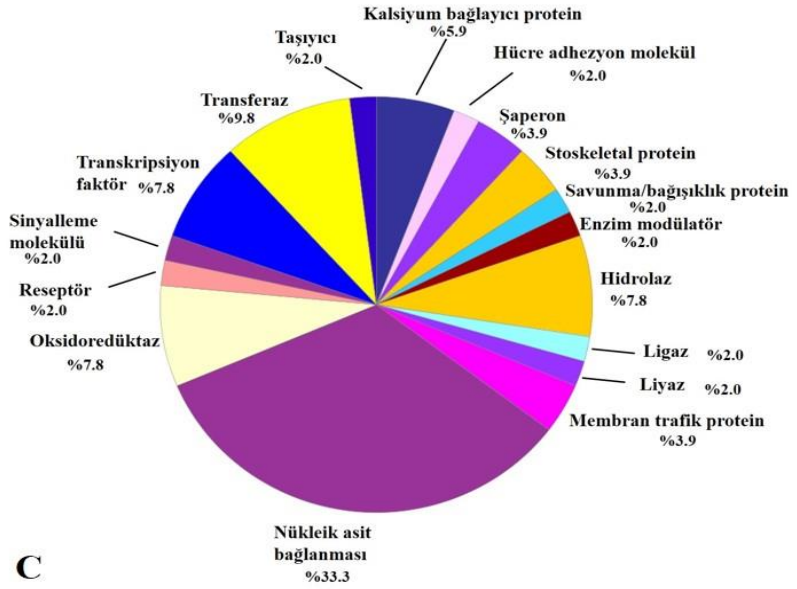
Protein sınıflandırması analizine bakılacak olunursa, yüksek seviyede ifade edilen 62 tane RNA'nın stoskeletal protein (%25.0), hidrolaz (%25.0), savunma/bağışıklık protein (%12.5), nükleik asit bağlanması (%12.5), surfaktan (%12.5) ve taşıyıcı (%12.5) olarak sınıflandırıldığı görülmektedir (Şekil 6.3.2 C.).

6.3.3 1.gün RNA örneklerinden 0.gün RNA örneklerine göre daha düşük seviyede ifade edilenlerin PANTHER Sınıflandırma Sistemi ile analiz edilmesi

SCI sonrası kuyruk dokusundan elde edilen transkriptlerden tanımlanarak ifade edilen 245 RNA'dan ifadesi daha düşük seviyede olan 183 RNA'nın PANTHER sınıflandırma sistemindeki moleküler fonksiyon, biyolojik süreç, protein sınıflandırma analizine bakılmıştır. Moleküler fonksiyon analizinde katalitik aktivite (%41.3), bağlanma (%34.8), yapısal molekül aktivitesi (%17.4), taşıyıcı

aktivite (%4.3) ve sinyal dönüştürücü aktivitesi (%2.2)'nde de görevli RNA'ların yer aldığı görülmektedir (Şekil 6.3.3 A.).





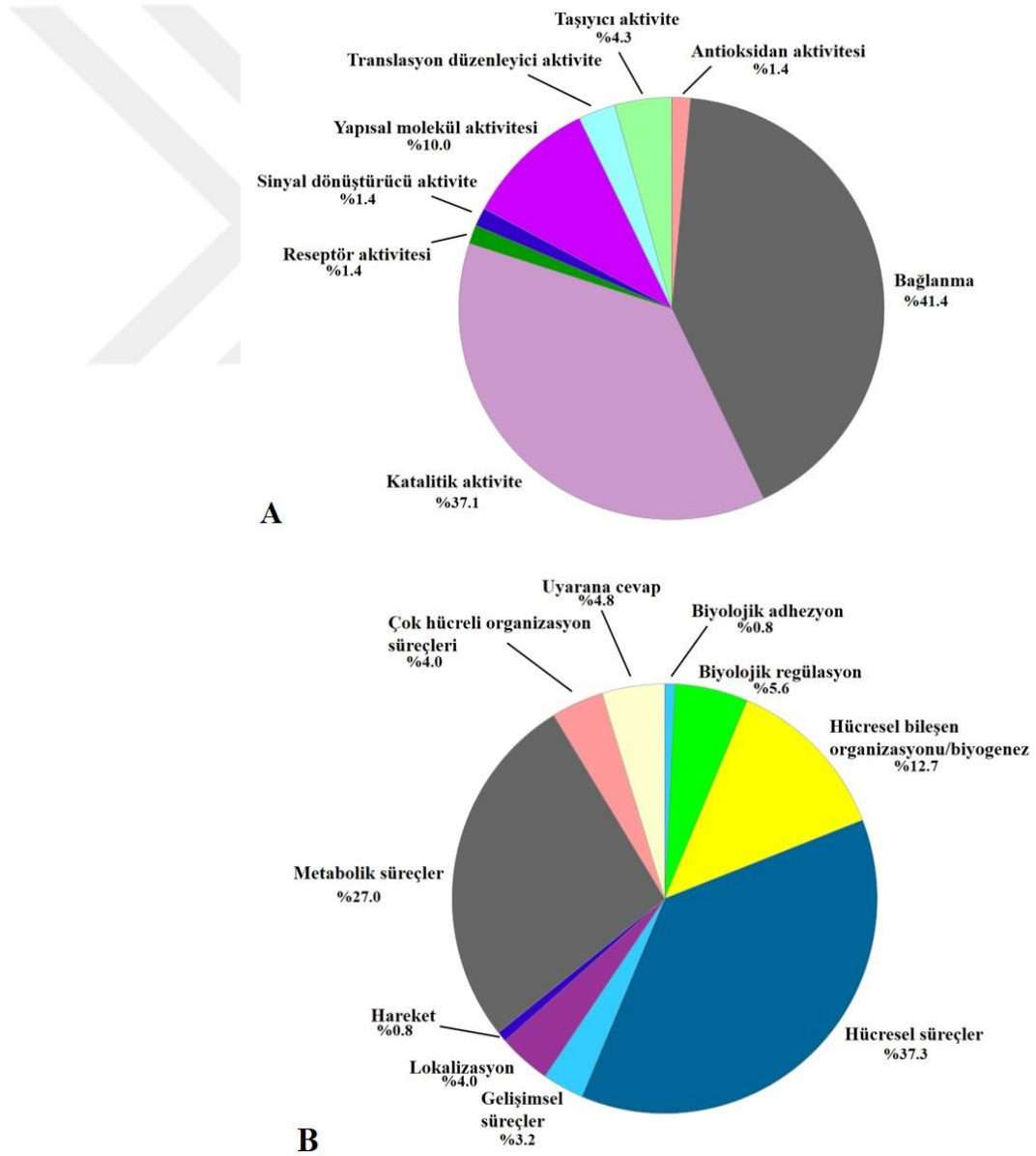
Şekil 6.3.3 1.gün RNA örneklerinin 0.gün RNA örnekleri ile karşılaştırılmasında daha düşük seviyede ifade edilenlerin PANTHER veri tabanı ile analizi. A. Moleküler fonksiyon analizi. B. Biyolojik süreç analizi. C. Protein sınıflandırması analizi.

Biyolojik süreçlerin analizine bakıldığında ifadesi daha düşük seviyede olan 183 RNA'nın hücresel süreçler (%34.0), metabolik süreçler (%30.9), hücresel bileşen organizasyonu/biyogenez (%8.5), biyolojik regülasyon (%7.4), lokalizasyon (%5.3), gelişimsel süreçler (%5.3) bağışıklık sistemi süreçleri (%4.3), uyarana cevap (%3.2), biyolojik adhezyon (%2.1), gelişimsel süreçler (%2.1), çok hücreli organizma süreçleri (%1.1), üreme (%1.1) ve uyarana cevap (%3.2) olarak sınıflandırıldığı görülmektedir (Şekil 6.3.3 B.).

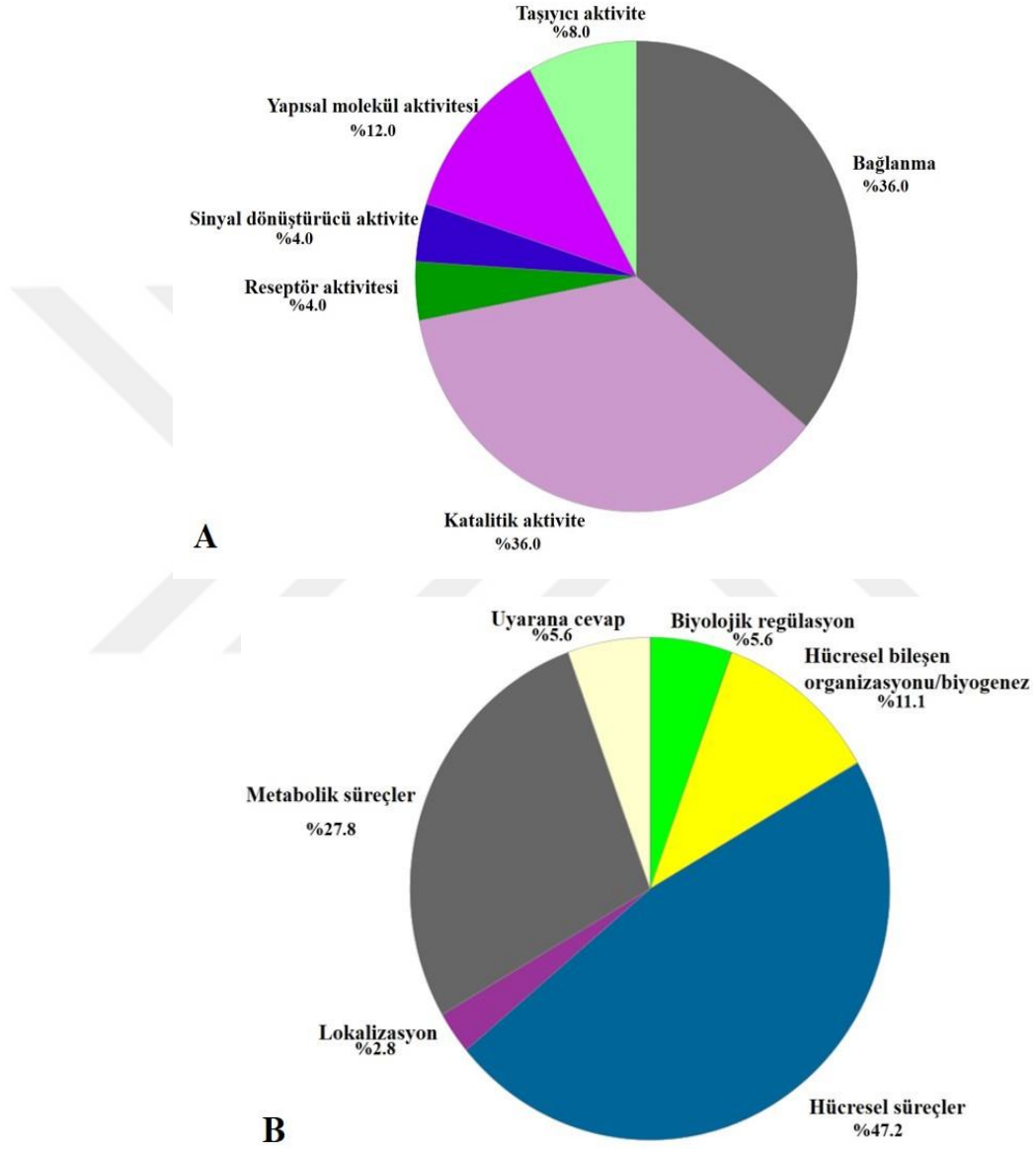
Protein sınıflandırması analizine bakıldığında, düşük seviyede ifade edilen 183 RNA'nın yaygın olarak nükleik asit bağlanması (%33.3), transferaz (%9.8) olarak belirlendiği ve bununla birlikte kalsiyum bağlayıcı protein, hücre adhezyon molekül, şaperon, stoskeletal protein, savunma/bağışıklık protein, enzim modülatör, hidrolaz, ligaz, liyaz ,membran trafik protein, oksidoredüktaz, reseptör, sinyalleme molekülü, transkripsiyon faktör ve taşıyıcı olarak görevlendirildiği görülmektedir (Şekil 6.3.3 C.).

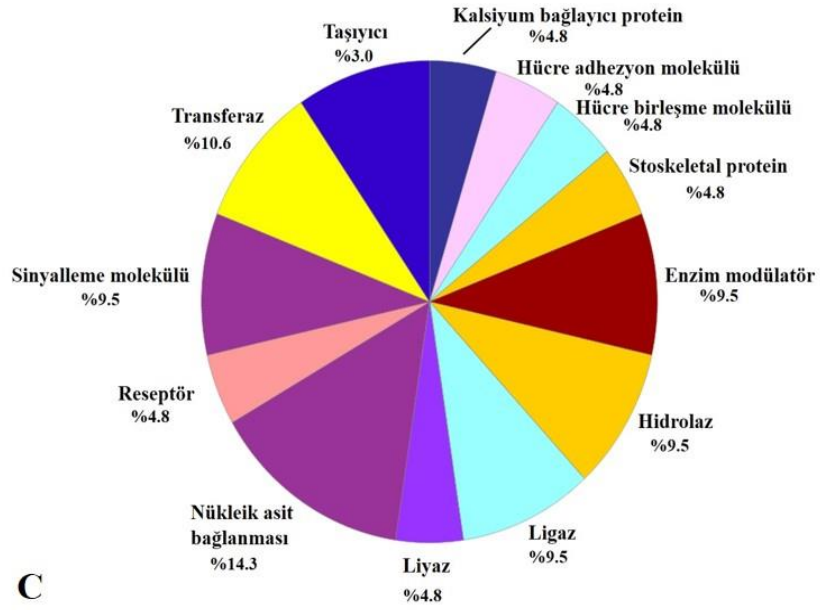
6.3.4 4.gün RNA örneklerinin 0.gün RNA örneklerine göre PANTHER Sınıflandırma Sistemi ile analiz edilmesi

SCI sonrası örneklerin PANTHER sınıflandırma sistemindeki moleküler fonksiyon, biyolojik süreç, protein sınıflandırması analizine bakılmıştır. 4.gün örneklerinin 0.gün örneklerine karşılaştırılması sonrası moleküler fonksiyon analizine bakıldığında, RNA'ların bağlanma (%41.4), katalitik aktivite (%37.1) ve yapısal molekül aktivitesi (%10.0) olarak sınıflandırılmanın yanı sıra, reseptöre aktivitesi, sinyal dönüştürücü aktivite, translasyon düzenleyici aktivite, taşıyıcı aktivite ve antioksidan aktivitesi de yer almaktadır (Şekil 6.3.4. A.).



sınıflandırılması analizleri yapılmıştır. Moleküler fonksiyon analizine bakıldığında, bağlanma (%36.0), katalitik aktivite (%36.0), yapısal molekül aktivitesi (%12.0), taşıyıcı aktivite (%8.0), sinyal dönüştürücü aktivitesi (%4.0) ve reseptör aktivitesi (%8.3)'nde görevli RNA'ların yer aldığı görülmektedir (Şekil 6.3.5 A).





Şekil 6.3.5 4.gün RNA örneklerinin 0.gün RNA örnekleri ile karşılaştırılmasında daha yüksek seviyede ifade edilenlerin PANTHER veri tabanı ile analizi. A. Moleküler fonksiyon analizi. B. Biyolojik süreç analizi. C. Protein sınıflandırması analizi.

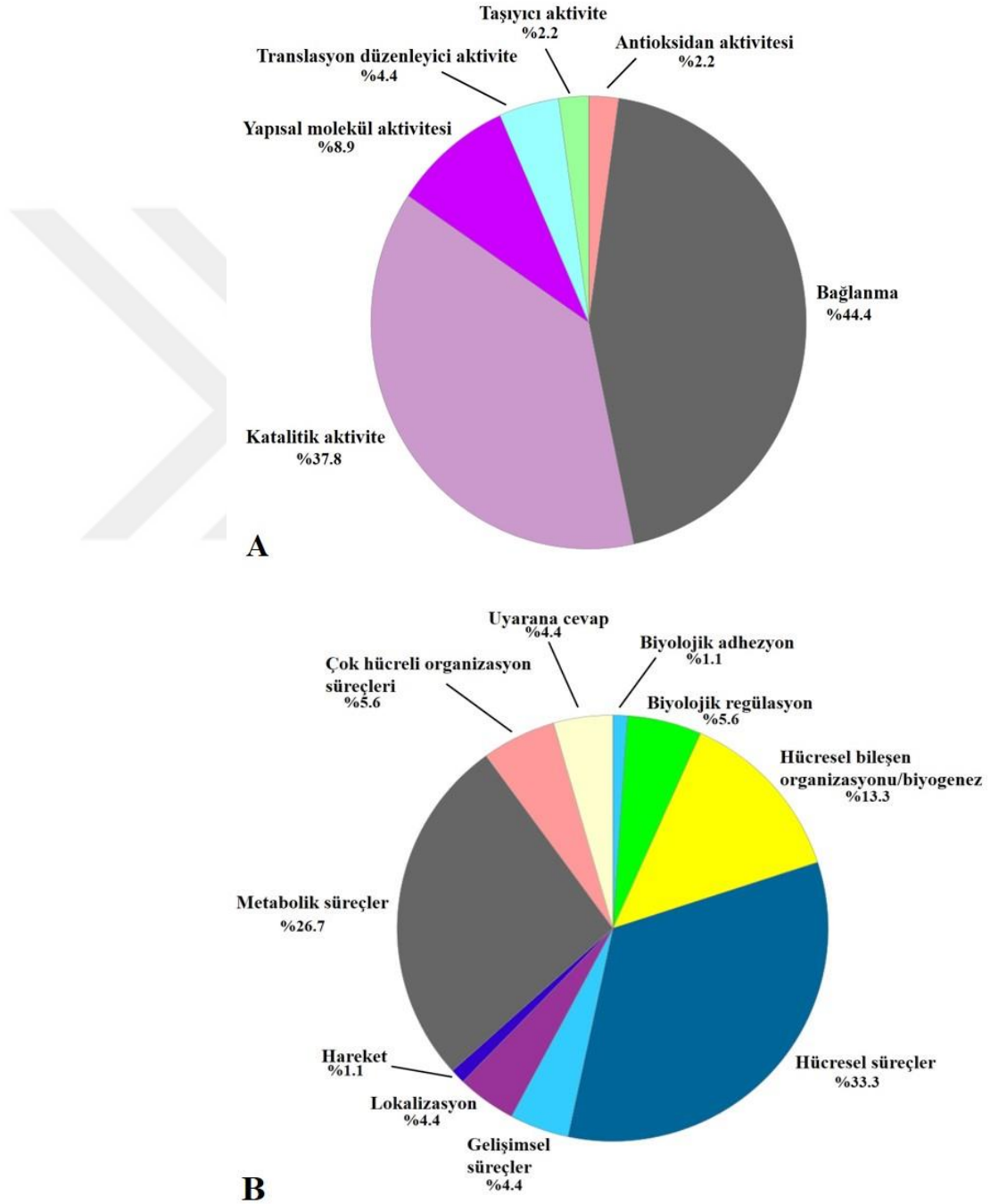
Biyolojik süreçlerin analizine bakıldığında ifadesi daha yüksek seviyede olan 87 RNA'nın hücresel süreçler (%47.2), metabolik süreçler (%27.8), hücresel bileşen organizasyonu/biyogenez (%11.1), biyolojik regülasyon (%5.6), uyarana cevap (%5.6) ve lokalizasyon (%2.8) olarak proteinlerin sınıflandırıldığı görülmektedir (Şekil 6.3.5 B.).

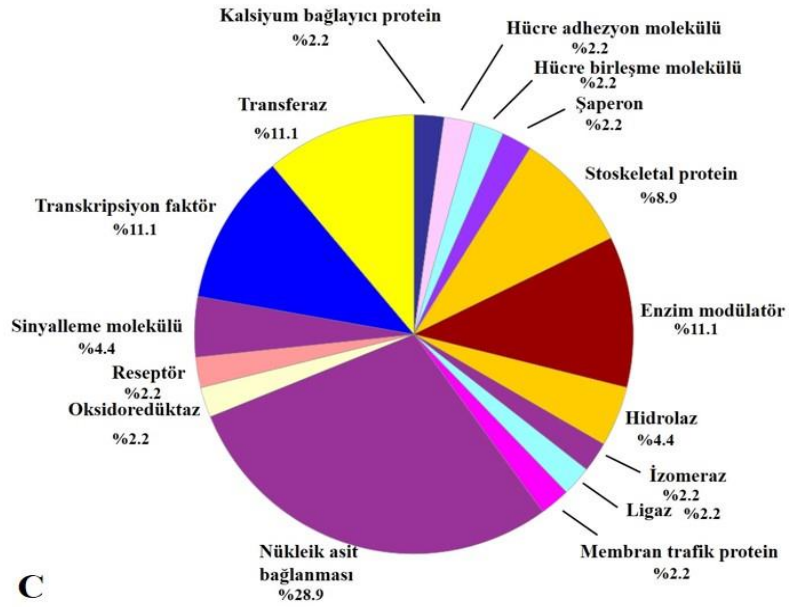
Protein sınıflandırması analizine bakıldığında, yüksek seviyede ifade edilen 87 RNA'nın nükleik asit bağlanması (%14.3), transferaz (10.6), hidrolaz (%9.5), ligaz (%9.5), enzim modülatör (%9.5), sinyalleme molekülü (%9.5), liyaz (%4.8), stoskeletal protein (%4.8), hücre birleşme proteini (%4.8), hücre adhezyon molekülü (%4.8), kalsiyum bağlayıcı protein (%4.8), reseptör (%4.8) ve taşıyıcı (%3.0) olarak sınıflandırıldığı görülmektedir (Şekil 6.3.5 C.).

6.3.6 4.gün RNA örneklerinden 0.gün RNA örneklerine göre daha düşük seviyede ifade edilenlerin PANTHER Sınıflandırma Sistemi ile analiz edilmesi

SCI sonrası kuyruk dokusunda elde edilen transkriptlerden tanımlanarak ifade edilen 217 RNA'dan ifadesi daha düşük seviyede olan 130 RNA'nın PANTHER

sınıflandırma sisteminde moleküler fonksiyon, biyolojik süreç, protein sınıflandırma analizlerine bakılmıştır. Moleküler fonksiyon analizine bakıldığında, katalitik aktivite (%44.4), bağlanma (%37.8), yapısal molekül aktivitesi (%8.9), translasyon düzenleyici aktivite (%4.4), taşıyıcı aktivite (%2.2) ve antioksidan aktivitesi (%2.2)'nde de görevli RNA'ların yer aldığı görülmektedir (Şekil 6.3.6 A.).





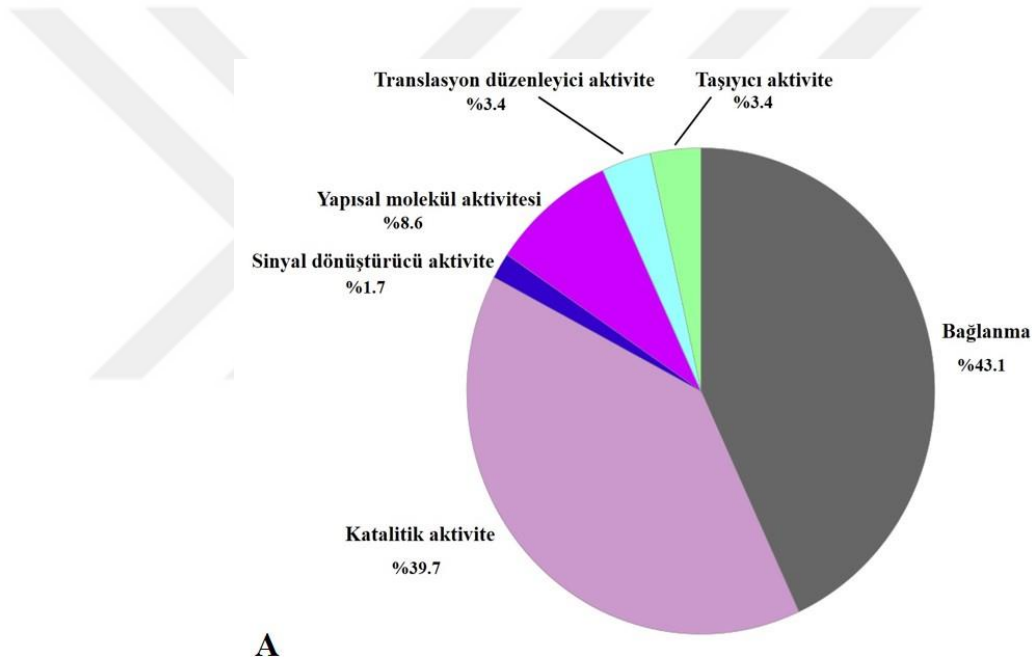
Şekil 6.3.6 4.gün RNA örneklerinin 0.gün RNA örnekleri ile karşılaştırılmasında daha düşük seviyede ifade edilenlerin PANTHER veri tabanı ile analizi. A. Moleküler fonksiyon analizi. B. Biyolojik süreç analizi. C. Protein sınıflandırması analizi.

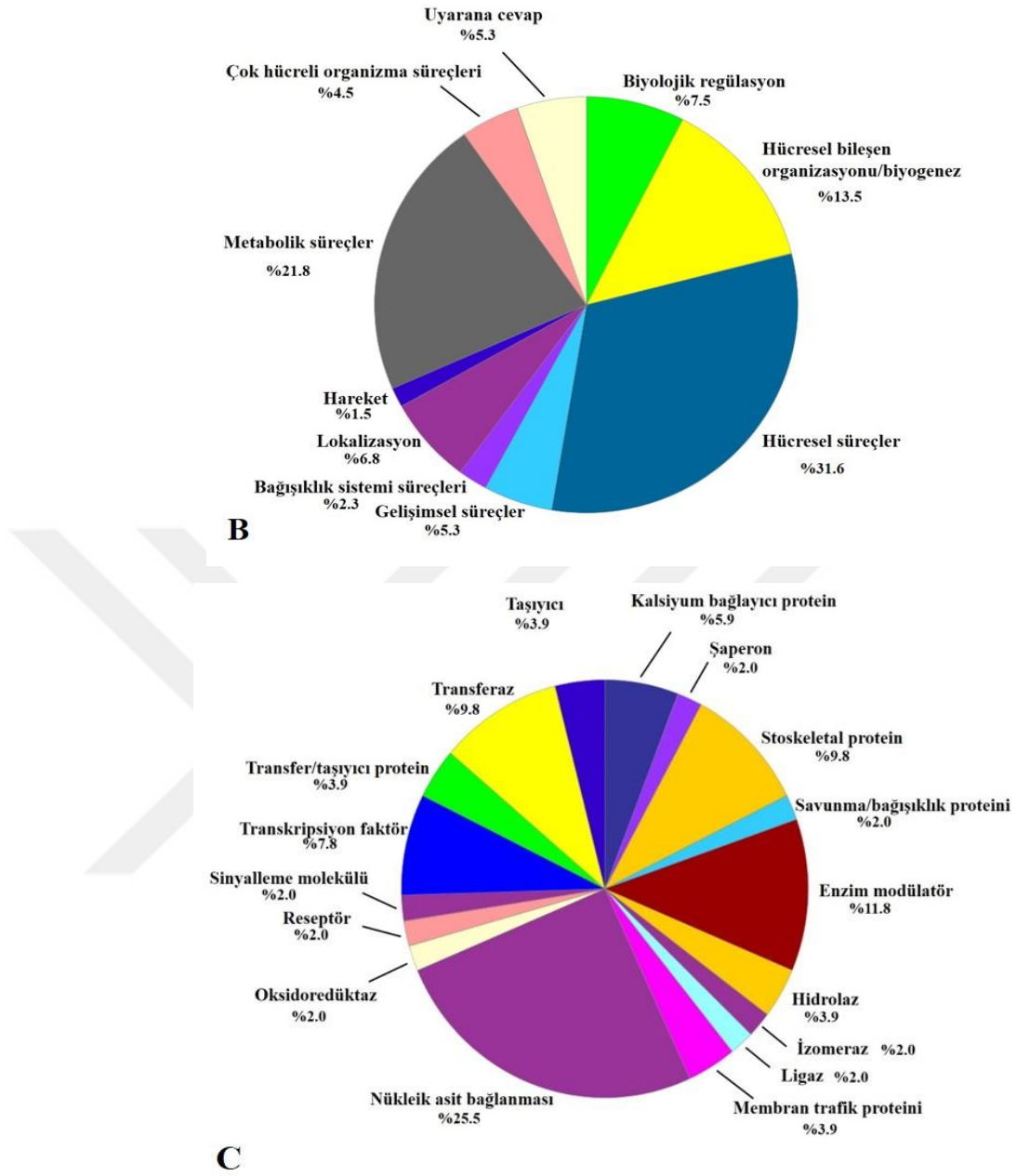
Biyolojik süreçlerin analizine bakıldığında ifadesi daha yüksek seviyede olan 130 RNA'nın yaygın olarak hücresel süreçler (%33.3), metabolik süreçler (%26.7), hücresel bileşen organizasyonu/biyogenez (%13.3), biyolojik regülasyon (%5.6), çok hücreli organizma süreçleri (%5.6), uyarana cevap (%4.4), lokalizasyon (%4.4), gelişimsel süreçler (%4.4), biyolojik adhezyon (%1.1), ve hareket (%1.1) olarak sınıflandırıldığı görülmektedir (Şekil 6.3.6 B.).

Protein sınıflandırması analizine bakılacak olunursa, düşük seviyede ifade edilen 130 RNA'nın yaygın bir şekilde nükleik asit bağlanması (%28.9), transferaz (%11.1), enzim modülatör (%11.1), transkripsiyon faktör (%11.1) olarak belirlendiği ve bununla birlikte kalsiyum bağlayıcı protein, hücre adhezyon molekül, hücre birleşme molekülü, şaperon, stoskeletal protein, hidrolaz, izomeraz, ligaz, membran trafik protein, oksidoredüktaz, reseptör, sinyalleme molekülü olarak görevlendirildiği görülmektedir (Şekil 6.3.6 C.).

6.3.7 7.gün RNA örneklerinin 0.gün RNA örneklerine göre PANTHER Sınıflandırma Sistemi ile analiz edilmesi

SCI sonrası örneklerin PANTHER sınıflandırma sistemindeki moleküler fonksiyon, biyolojik süreç, protein sınıflandırması analizine bakılmıştır. 7.gün örneklerinin 0.gün örneklerine karşılaştırılması sonrası moleküler fonksiyon analizine bakıldığında, moleküler fonksiyon analiz sonuçlarına göre RNA'ların yaygın olarak bağlanma (%43.1) ve katalitik aktive (%39.7) olarak görev almaktadır. Bununla birlikte taşıyıcı aktivite, translasyon düzenleyici aktivite, yapısal molekül aktivitesi, sinyal dönüştürücü aktivite de diğer fonksiyonlar olarak yer almaktadır (Şekil 6.3.7 A.).





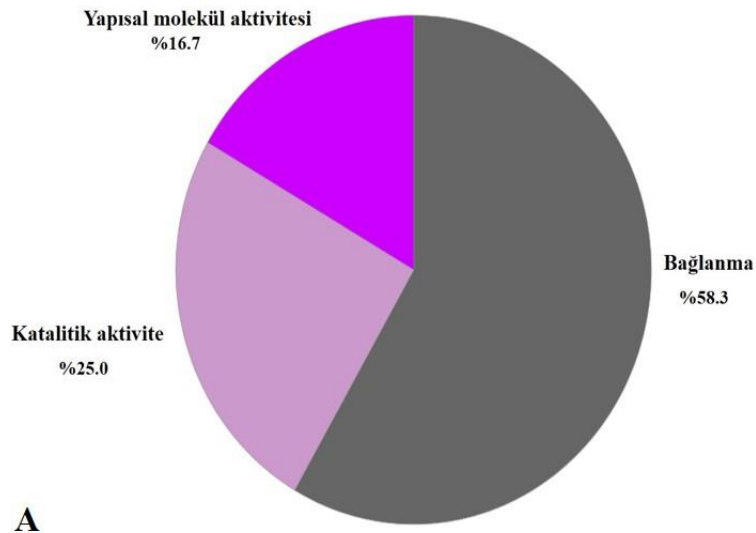
Şekil 6.3.7 7.gün RNA örneklerinin 0.gün RNA örnekleri ile karşılaştırılmasının PANTHER veri tabanı ile analizi. A. Moleküler fonksiyon analizi. B. Biyolojik süreç analizi. C. Protein sınıflandırması analizi.

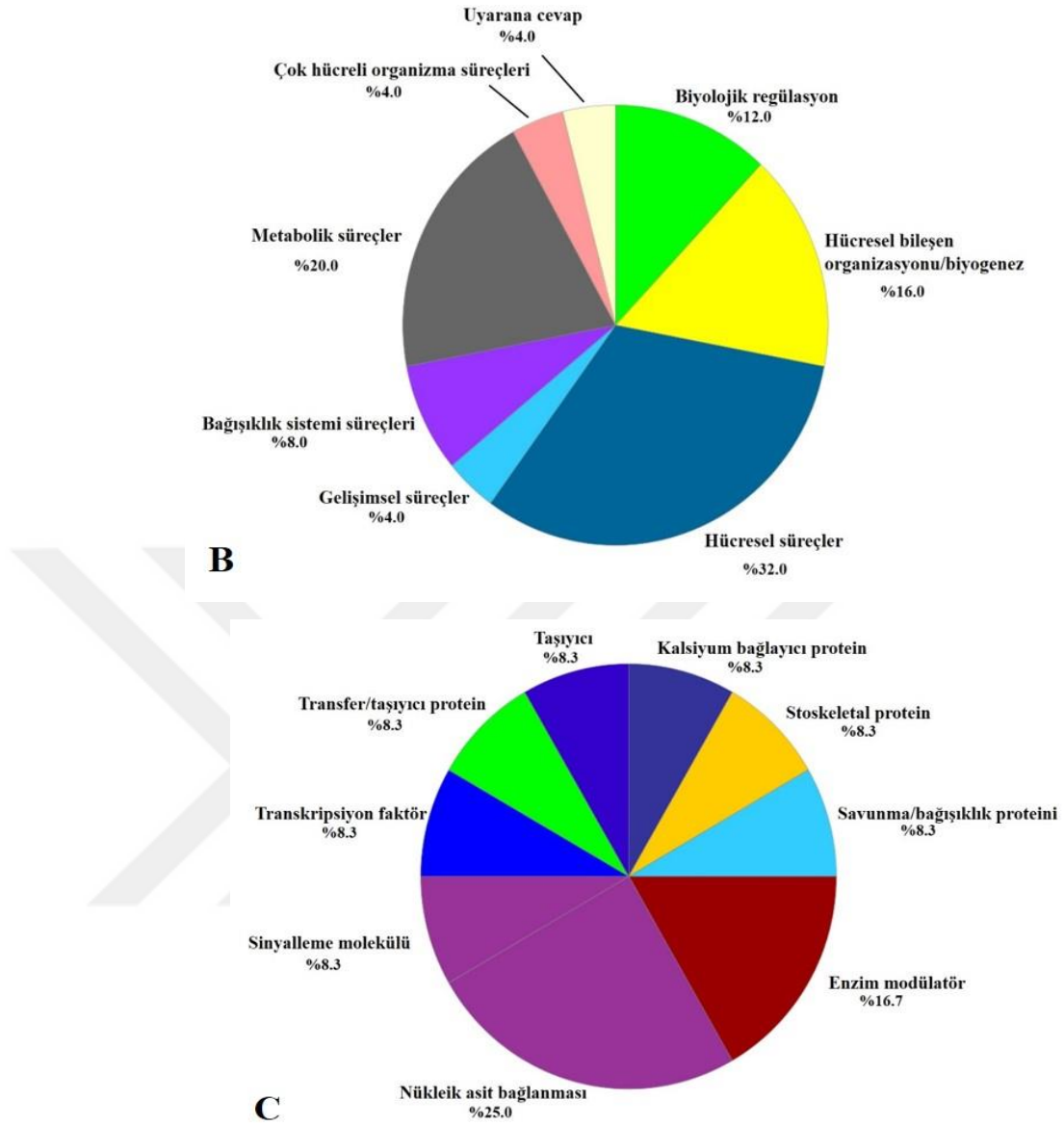
Biyolojik süreç analizinde RNA'ların yaygın olarak hücresel süreçler (%31.6), metabolik süreçler (%21.8) ve hücresel organizasyon/biyogenez (%13.5) de görev aldıkları görülmektedir. Bunun yanı sıra biyolojik regülasyon, uyarana cevap, çok hücreli organizma süreçleri, hareket, lokalizasyon, bağışıklık sistemi süreçleri, gelişimsel süreçler de diğer süreçler arasındadır (Şekil 6.3.7 B.).

Protein sınıflandırmasına baktığımızda ise yaygın olarak nükleik asit bağlanması (%25.5), enzim modülatörü (%11.8), stoskeletal protein (%9.8), transferaz (%9.8) içerisinde yer alırken, membran trafik proteini, ligaz, izomeraz, hidrolaz, savunma/bağıışıklık proteini, şaperon, kalsiyum bağlayıcı protein, taşıyıcı, transfer/taşıyıcı protein, transkripsiyon faktör, sinyalleme molekülü, reseptör ve oksidoredüktaz gruplarının da yer aldığı görölmektedir (Şekil 6.3.7 C.).

6.3.8 7.gün RNA örneklerinden 0.gün RNA örneklerine göre daha yüksek seviyede ifade edilenlerin PANTHER Sınıflandırma Sistemi ile analiz edilmesi

SCI sonrası kuyruk dokusundan elde edilen transkriptlerden tanımlanarak ifade edilen 213 RNA'dan ifadesi daha yüksek seviyede olan 41 RNA'nın PANTHER sınıflandırma sistemindeki moleküler fonksiyon, biyolojik süreç, protein sınıflandırması analizi yapılmıştır. Moleküler fonksiyon analizine bakıldığında RNA'ların, bağlanma (%58.3), katalitik aktivite (%25.0), yapısal molekül aktivitesi (%16.7)'nde yer aldığı görölmektedir (Şekil 6.3.8 A.).





Şekil 6.3.8 7.gün RNA örneklerinin 0.gün RNA örnekleri ile karşılaştırılmasında daha yüksek seviyede ifade edilenlerin PANTHER veri tabanı ile analizi. A. Moleküler fonksiyon analizi. B. Biyolojik süreç analizi. C. Protein sınıflandırması analizi.

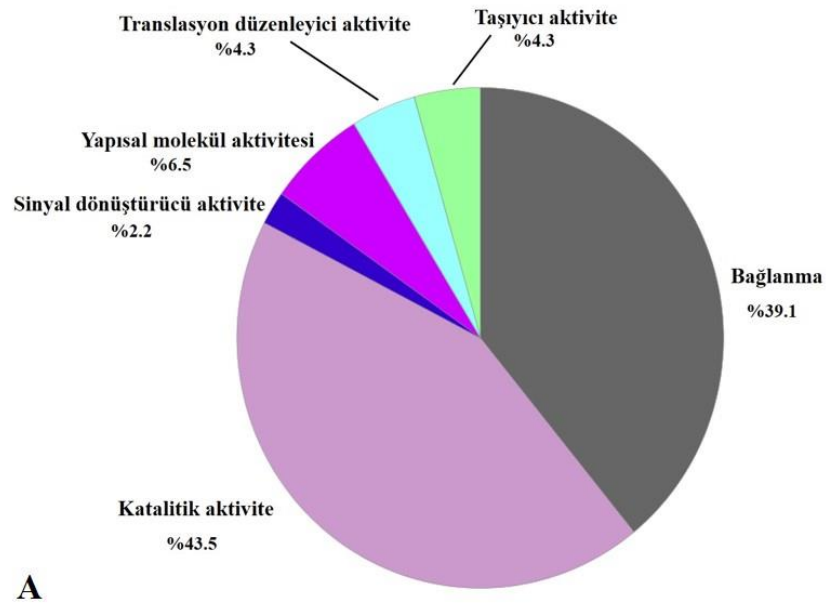
Biyolojik süreçlerin analizine bakıldığında ifadesi daha yüksek seviyede olan 41 RNA'nın hücresel süreçler (%32.0), metabolik süreçler (%20.0), hücresel bileşen organizasyonu/biyogenez (%16.0), biyolojik regülasyon (%12.0), bağışıklık sistemi süreçleri (%8.0), uyarana cevap (%4.0), çok hücreli organizma süreçleri (%4.0) ve gelişimsel süreçler (%4.0) olarak sınıflandırıldığı görülmektedir (Şekil 6.3.8 B.).

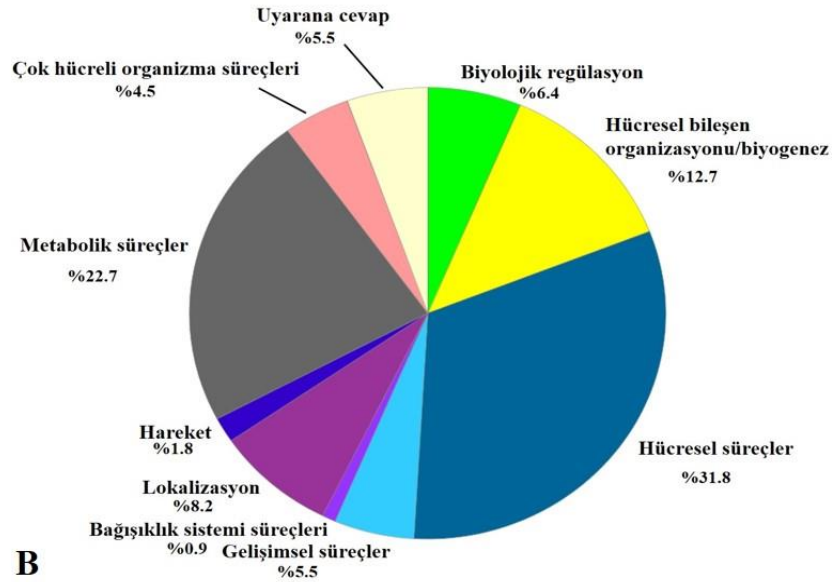
Protein sınıflandırması analizine bakıldığında, yüksek seviyede ifade edilen 41 RNA'nın nükleik asit bağlanması (%25.0), enzim modülatör (%16.7),

savunma/bağıışıklık proteini (%8.3), stoskeletal protein (%8.3), kalsiyum bağlayıcı protein (%8.3), taşıyıcı (%8.3), transfer/taşıyıcı protein (%8.3), transkripsiyon faktör (%8.3) ve sinyalleme molekülü (%8.3) olarak sınıflandırıldığı görölmektedir (Şekil 6.3.8 C.).

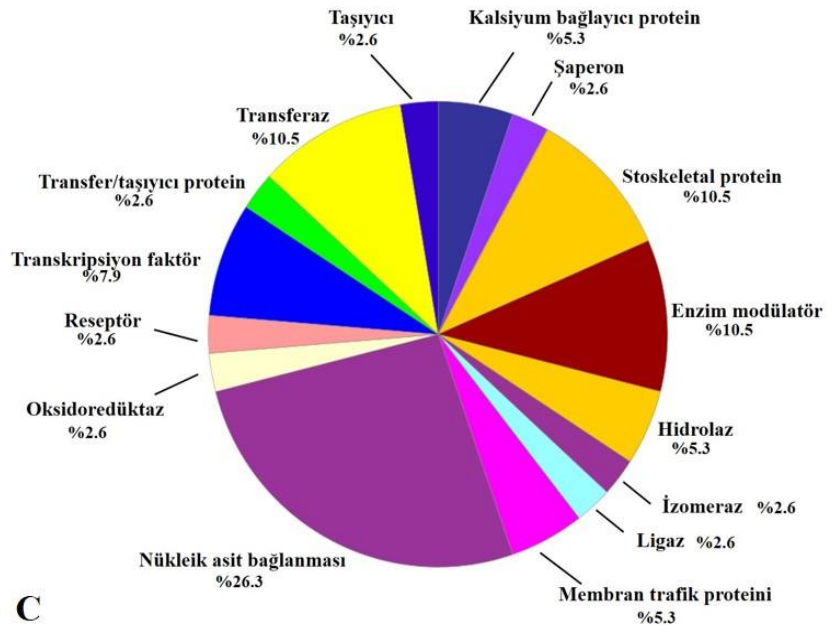
6.3.9 7.gün RNA örneklerinden 0.gün RNA örneklerine göre daha düşük seviyede ifade edilenlerin PANTHER Sınıflandırma Sistemi ile analiz edilmesi

SCI sonrası kuyruk dokusunda tanımlanarak ifade edilen 213 RNA'dan ifadesi daha düşük seviyede olan 172 RNA'nın PANTHER sınıflandırma sisteminde moleküler fonksiyon, biyolojik süreç ve protein sınıf analizleri yapılmıştır. Moleküler fonksiyon analizine bakıldığında, katalitik aktivite (%43.5), bağlanma (%39.1), yapısal molekül aktivitesi (%6.5), translayon düzenleyici aktivite (%4.3), taşıyıcı aktivite (%4.3) ve sinyal dönüştürücü aktivite (%2.2)'de de görevli RNA'ların yer aldığı görölmektedir (Şekil 6.3.9 A.).





B



C

Şekil 6.3.9 7.gün RNA örneklerinin 0.gün RNA örnekleri ile karşılaştırılmasında daha düşük seviyede ifade edilenlerin PANTHER veri tabanı ile analizi. A. Moleküler fonksiyon analizi. B. Biyolojik süreç analizi. C. Protein sınıflandırması analizi.

Biyolojik süreçlerin analizine bakıldığında ifadesi daha yüksek seviyede olan 172 RNA'nın hücresel süreçler (%31.8), metabolik süreçler (%22.7), hücresel bileşen organizasyonu/biyogenez (%12.7), lokalizasyon (%8.2), biyolojik regülasyon (%6.4), uyarana cevap (%5.5), çok hücreli organizma süreçleri (%4.5), gelişimsel süreçler

(%5.5), hareket (%1.8) ve bağışıklık sistemi süreçleri (%0.9) olarak sınıflandırıldığı görülmektedir (Şekil 6.3.9 B.).

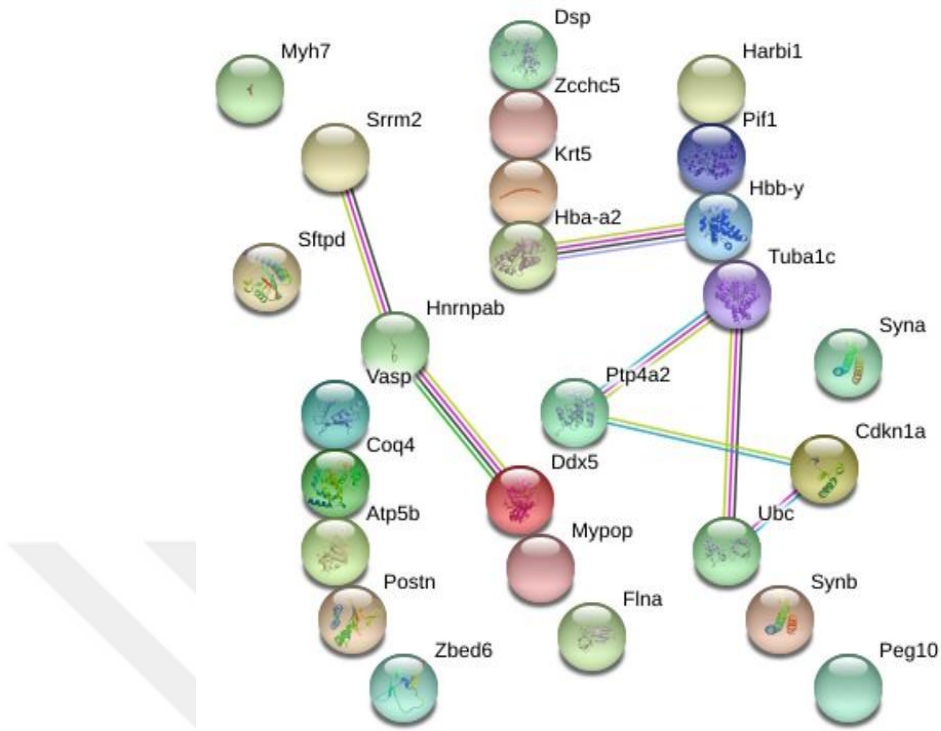
Protein sınıflandırması analizine bakacak olursak, düşük seviyede ifade edilen 130 RNA'nın çoğunluğunun nükleik asit bağlanması (%26.3), transferaz (%10.5), enzim modülatör (%10.5) olarak sınıflandırıldığı ve bununla birlikte kalsiyum bağlayıcı protein, şaperon, stoskeletal protein, hidrolaz, izomerase, ligaz, membran trafik protein, oksidoredüktaz, reseptör, transkripsiyon faktör, transfer/taşıyıcı protein ve taşıyıcı olarak sınıflandırıldığı görülmektedir (Şekil 6.3.9 C.).

6.4 STRING Veritabanı Kullanılarak Protein-Protein Etkileşimi İncelenmesi

HücreSEL fonksiyonun sistem bazında anlaşılması, ifade edilen proteinler arasındaki tüm fonksiyonel etkileşimlerin bilgisini gerektirir. Belirli bir organizma için bilinen ve tahmin edilen tüm proteinlerin fonksiyonel ilişkilerinin toplanması, genom çapında fonksiyonel bir bağlantıya sahip bir protein ağı ile sonuçlanır. STRING veri tabanı, çok sayıda organizma için bilinen ve tahmin edilen protein-protein ilişkilendirme verilerini birleştirerek bu bilgileri toplamayı ve entegre etmeyi amaçlamaktadır (92). Proteinlerin birbirleri ile olan etkileşimleri kadar, işlevsel ve doğrusal protein etkileşimlerini de göstermektedir. Bu analiz yapılırken bir sınırlandırma yapılmamıştır.

6.4.1 1.gün RNA örneklerinin 0.gün RNA örneklerine göre daha yüksek seviyede ifade edilenlerin STRING veritabanı ile analiz edilmesi

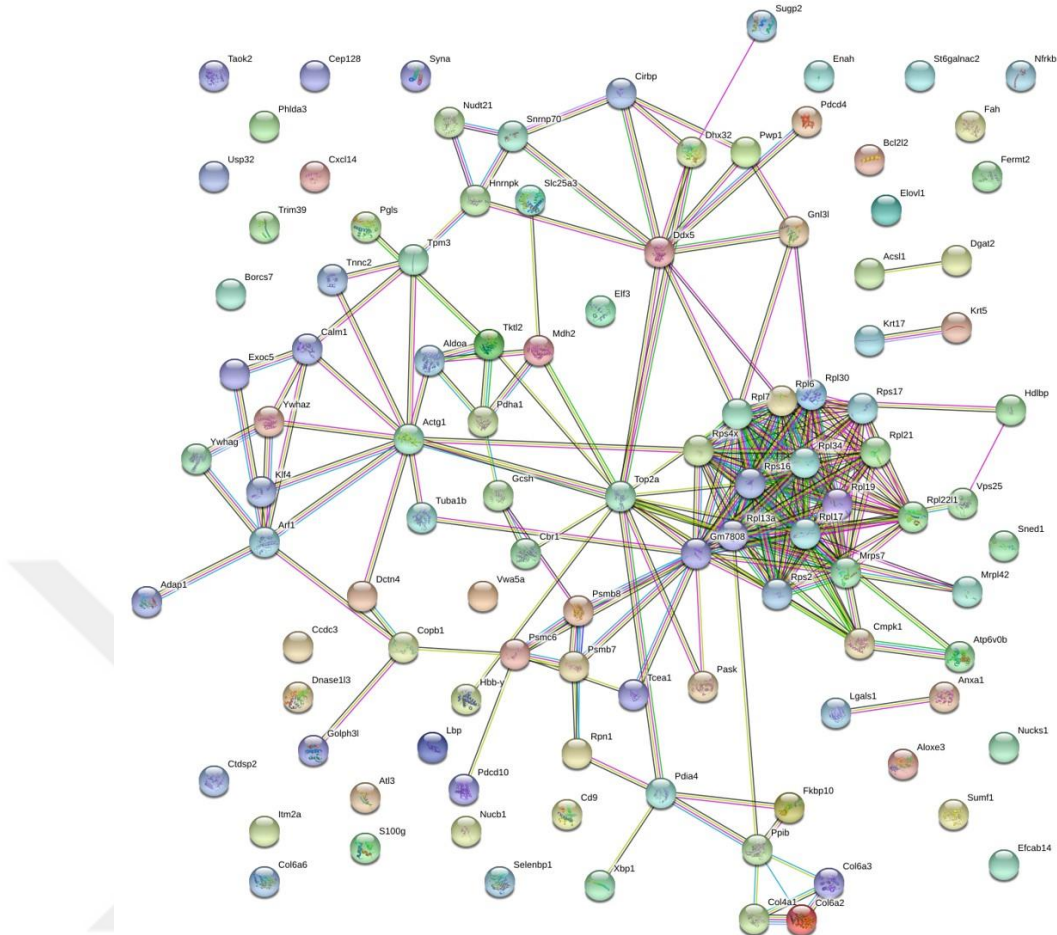
1.gün RNA örneklerinin 0.gün RNA örneklerine göre daha yüksek seviyede ifade edilen RNA'ların STRING veri tabanı ile analizi incelendiğinde, Hba-a2 ile Hbb- α , Srrm2, Vasp ile Ddx5, Tuba1c, Ptp4a2, Ubc ile Cdkn1a'nın etkileşimde olduğu görülmektedir (Şekil 6.4.1).



Şekil 6.4.1 STRING veri tabanı ile tanımlanan 1.gün RNA örneklerinin 0.gün RNA örneklerine göre yüksek seviyede ifade edilenlerin analizi.

6.4.2 1.gün RNA örneklerinin 0.gün RNA örneklerine göre daha düşük seviyede ifade edilenlerin STRING veritabanı ile analiz edilmesi

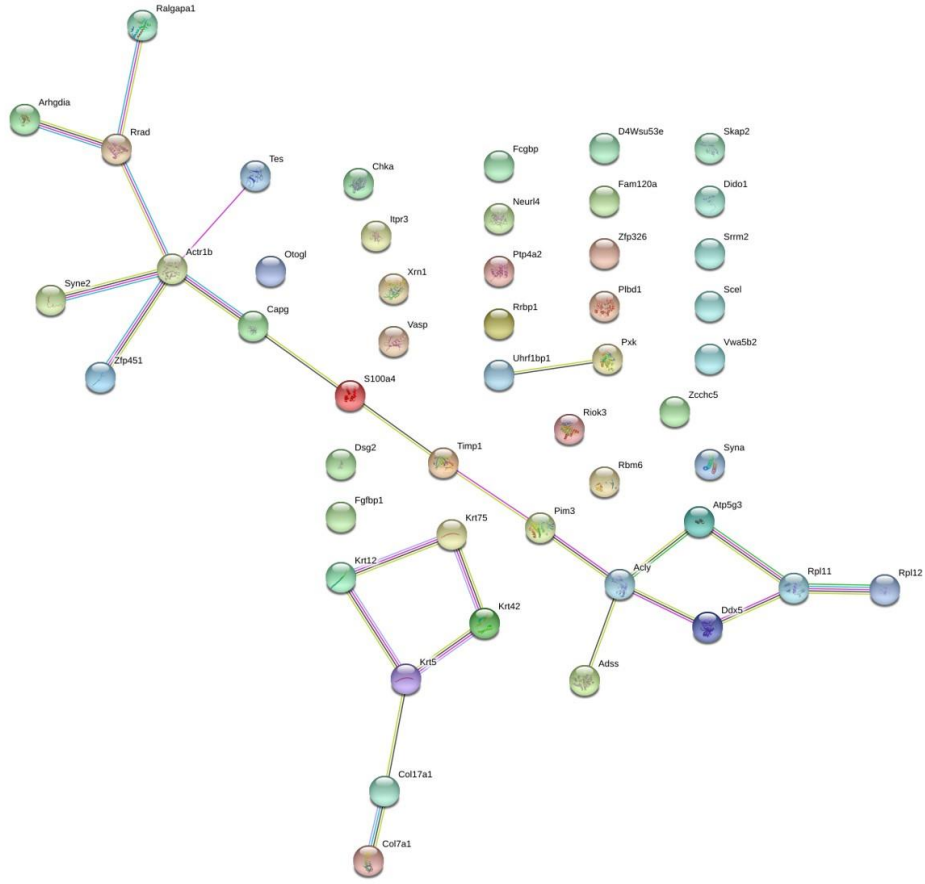
1.gün RNA örneklerinin 0.gün RNA örneklerine göre karşılaştırılmasına bakıldığında daha düşük seviyede ifade edilen RNA'ların STRING veri tabanı ile analizi incelendiğinde, birbirleriyle olan etkileşimi görülmekte ve merkez proteinler olarak olarak ribozomal protein olan Rpl (Ribozomal protein L) protein ailesinin etkili olduğu görülmektedir (Şekil 6.4.2).



Şekil 6.4.2 STRING veri tabanı ile tanımlanan 1.gün RNA örneklerinin 0.gün RNA örneklerine göre düşük seviyede ifade edilenlerin analizi.

6.4.3 4.gün RNA örneklerinin 0.gün RNA örneklerine göre daha yüksek seviyede ifade edilenlerin STRING veritabanı ile analiz edilmesi

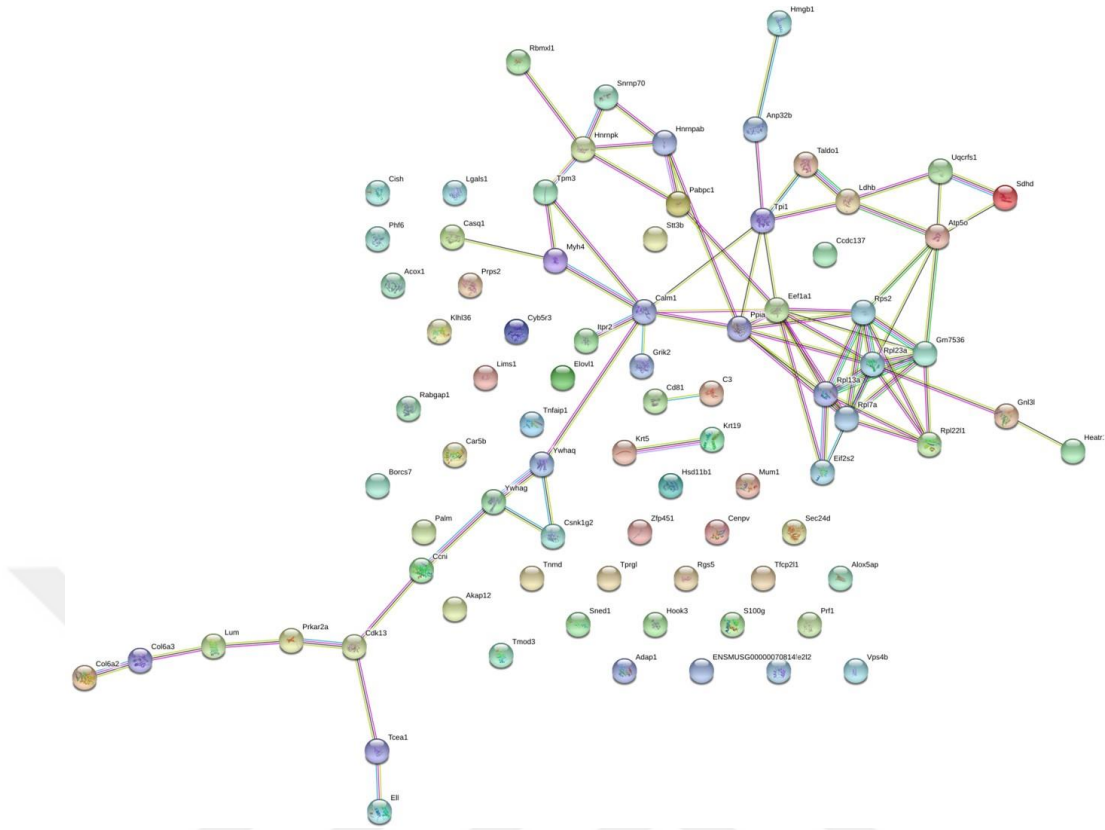
4.gün RNA örneklerinin 0.gün RNA örnekleri ile karşılaştırıldığında daha yüksek seviyede ifade edilen RNA'ların STRING veri tabanı ile analizi incelendiğinde, merkezde ATP bağlayıcı Actr1b (Beta-centractin) proteini olduğu ve diğer proteinler ile etkileşim halinde olduğu görülmektedir (Şekil 6.4.3).



Şekil 6.4.3 STRING veri tabanı ile tanımlanan 4.gün RNA örneklerinin 0.gün RNA örneklerine göre yüksek seviyede ifade edilenlerin analizi.

6.4.4 4.gün protein örneklerinin 0.gün protein örneklerine göre daha düşük seviyede ifade edilenlerin STRING veritabanı ile analiz edilmesi

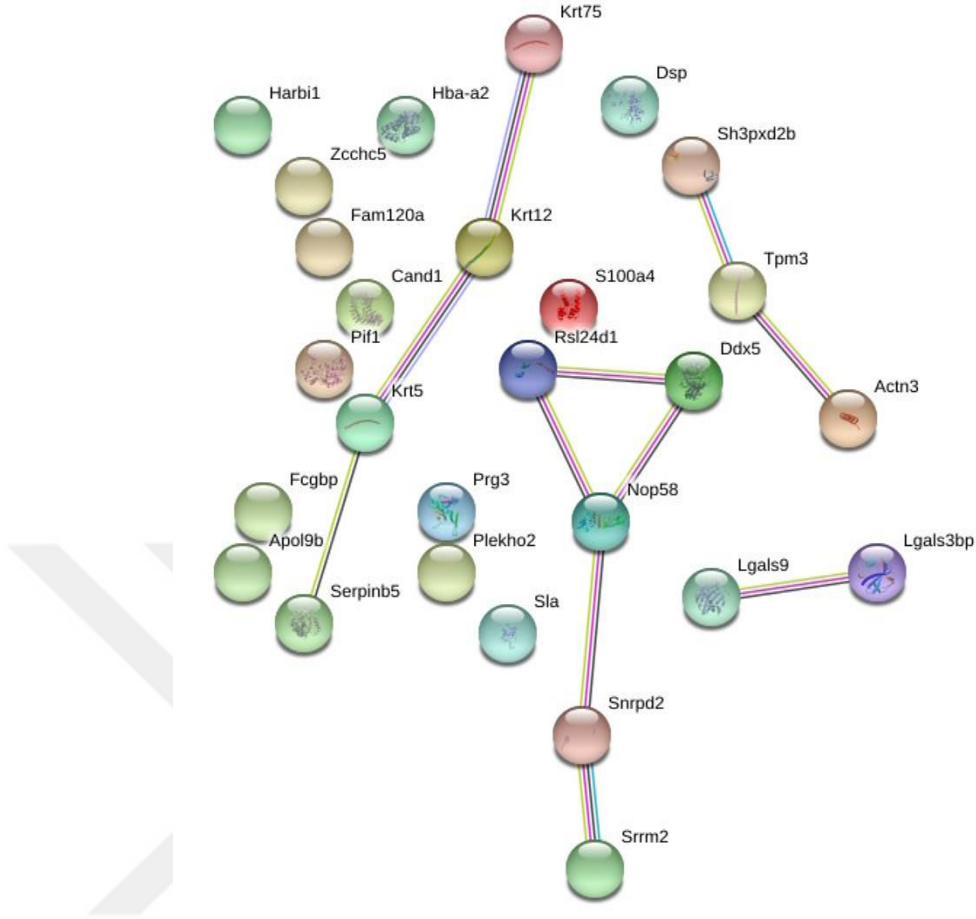
4.gün RNA örneklerinin 0.gün RNA örneklerine göre verilerine bakıldığında SCI sonrası kuyruk dokusunda daha düşük seviyede ifade edilen RNA'ların STRING veri tabanı ile analizi incelendiğinde, proteinlerin birbirleriyle ve merkezdeki ribozomal protein olan Rpl (Ribozomal protein L) protein ailesinin diğer proteinlerle olan etkileşimi görülmektedir (Şekil 6.4.4).



Şekil 6.4.4 STRING veri tabanı ile tanımlanan 4.gün RNA örneklerinin 0.gün RNA örneklerine göre düşük seviyede ifade edilenlerin analizi.

6.4.5 7.gün RNA örneklerinin 0.gün RNA örneklerine göre daha yüksek seviyede ifade edilenlerin STRING veritabanı ile analiz edilmesi

7.gün RNA örneklerinin 0.gün RNA örneklerine göre karşılaştırılmasına bakıldığında daha yüksek seviyede ifade edilen RNA'ların STRING veri tabanı ile analizi incelendiğinde, Rsl24d1 (Probable ribosome biogenesis protein RLP24)'in ve diğer proteinlerin etkileşimleri görülmektedir (Şekil 6.4.5).



Şekil 6.4.5 STRING veri tabanı ile tanımlanan 7.gün RNA örneklerinin 0.gün RNA örneklerine göre yüksek seviyede ifade edilenlerin analizi.

6.4.6 7.gün RNA örneklerinin 0.gün RNA örneklerine göre daha düşük seviyede ifade edilenlerin STRING veritabanı ile analiz edilmesi

7.gün RNA örneklerinin 0.gün RNA örneklerine göre karşılaştırılmasına bakıldığında daha düşük seviyede ifade edilen RNA'ların STRING veri tabanı ile analizi incelendiğinde, merkezdeki ribozomal protein olan Rpl (Ribozomal protein L) protein ailesinin ve Guk1 (Guanylate kinase) proteinin diğer proteinlerle olan etkileşimi görülmektedir (Şekil 6.4.6).

7 TARTIŞMA ve SONUÇ

Daha önceki çalışmalarda yetişkin memeli merkezi sinir sisteminde plastisite ve rejenerasyonun sınırlı olması nedeniyle SCI'nın tedavi edilemez olduğu düşünülmüştür. Bununla birlikte, son yirmi yılda yapılan çalışmalar, omurgalı MSS'nin hem nörojenezini hem de önemli ölçüde plastisitesini göstermiş ve SCI'ya karşı biyolojik yanıtların çalışmalarını uyarmıştır (93). Benzer şekilde, SCI sonrası başarılı rejenerasyonu destekleme yeteneği, rejeneratif kapasitenin sınırlıdan artan rejeneratif yeteneğe doğru değiştiği türlerde, başarı biyolojik süreçlerin tanımlanmasından kaynaklanacaktır (94).

Aksolotlar gibi urodele grubuna ait amfibileri, hasar görmüş organ ve/veya dokularını yeniden rejenere edebilmeleri nedeniyle daha çok tercih edilen deney hayvanlarıdır (95). Bununla birlikte aksolotlar bir omuriliğin tamamını yeniden oluşturabilirler (36, 96) ve bu özellikleri sayesinde MSS çalışmalarında iyi bir model organizma olarak kullanılmaktadırlar.

Bu çalışmada, omurilik hasarı sonrası rejenerasyonu sağlayan moleküler mekanizmalar yeni-nesil RNA dizileme ile tanımlanmıştır. RNA sekanslama yaklaşımları ile örneklerden izole edilen RNA'lar yeni nesil sekanslama yöntemi (NGS) ile fragmentlerine ayrılır ve sekanslanır. Elde edilen fragmentler, temel çözünürlükteki transkriptomları temsil eder ve transkript seviyesindeki genlerin ekspresyonunun kuantitatif olarak ölçülebilmesini sağlar (97). Bu yeni teknoloji, model olmayan organizmalar için veya aksolot gibi referans genomu olmayan organizmalar için uyarlanmıştır. RNA-diz, kodlama ve kodlamayan genlerin varlığını ve ifade düzeyini gözlemlemeye izin vermektedir (98).

Bu tez çalışmasında transkriptom analizindeki tabloları oluşturmada temel amaç; 1.gün yara iyileşmesi ile blastema oluşumunun erken evrelerinin 0.gün ile karşılaştırmasını yapabilmek ve değişen protein profilini görebilmektir. Bununla birlikte qPCR yapılmasındaki amaç ise tüm zaman dilimlerinde ortak olarak tanımlanmış ve her zaman aralığı için hem artan hem de azalanların doğru olup olmadığını gösterebilmektir. Bunun için tüm zaman dilimleri içinden *PEG10*, *SSUH2*, *Zona*, *Loc107*, *Slc38a10*, *SkeMus* seçilmiş olup qPCR analizleri yapılmış ve rejenerasyon sırasında anlamlı olarak değişen profil gözlemlenmiştir.

Neotenik aksolotlardan SCI sonrası farklı zaman aralıklarında (0.gün, 1.gün, 4.gün ve 7.gün) alınan kuyruk dokularının RNA izolasyonu sonrası transkriptom analizleri incelendiğinde; 1.gün örneklerinin 0.gün örneklerine göre 605 tane RNA'nın analiz edildiği, bu RNA'lardan 245 tanesinin tanımlanarak ifade edildiği, 4.gün örneklerinin 0.gün örneklerine göre 500 tane RNA'nın analiz edildiği, bu RNA'lardan 217 tanesinin tanımlanarak ifade edildiği, 7.gün örneklerinin 0.gün örneklerine göre 381 tane RNA'nın analiz edildiği, bu RNA'lardan 213 tanesinin tanımlanarak ifade edildiği bulunmuştur. Kullanılan zaman dilimleri için RNA'ların tanımlanan protein karşılıkları ile PANTHER Sınıflandırma Sistemindeki sonuçlarına bakıldığında tüm zaman dilimlerinin moleküler fonksiyon analizinde bağlanma, katalitik aktivite, yapısal molekül aktivitesi, taşıyıcı aktivitenin ortak olduğu, biyolojik süreç analizinde hücresel süreçler, hücresel bileşen organizasyonu/biyogenez, biyolojik regülasyon, biyolojik adhezyon, uyarana cevap, çok hücreli organizma süreçleri, metabolik süreçler, hareket, lokalizasyon ve gelişimsel süreçlerin ortak olduğu, hücresel bileşen analizinde hücre elemanları, organel ve makromoleküler kompleks olarak gruplandırıldığı ve protein sınıf analizinde ise nükleik asit bağlanması, transferaz, taşıyıcı, stroskeletal protein, hücreler arası matriks protein ve hidrolaz olarak gruplandırıldığı görülmüştür.

Demircan T., ve arkadaşlarının 2016 yılında yapmış olduğu bir çalışmada; aksolot da kuyruk amputasyonu sonrası omurilik hasarı rejenerasyonunda görevli olan proteinlerin mRNA-seq referansı kullanarak proteomik analizini yapmışlardır. Elde ettikleri sonuçlara bakıldığında; tanımlanan proteinlerin, biyolojik regülasyon, gelişimsel süreçler, bağışıklık sistemi süreci ve hücresel bileşen organizasyonu veya biyogenezde rol oynadığını bulmuşlardır (99). Bunlar rejenerasyonun ilk aşamalarında tetiklenen yollardır. Literatürden yola çıkarak bu çalışmanın sonuçlarına baktığımızda, PANTHER biyolojik süreç analizi sonucuna göre 1.gün proteinlerinin 0.gün proteinlerine göre yaygın olarak hücresel bileşen organizasyonu/biyogenez, biyolojik regülasyon ile birlikte hücresel süreçler ve metabolik süreçlerde, bunlarla birlikte gelişimsel süreçler ve bağışıklık sistemi sürecinde görevli oldukları görülmektedir. Literatürde yer alan ve proteom analizi ile tanımlanan proteinler ile bu tez çalışmasında transkriptom analizi ile tanımlanması yapılan örneklerle bakıldığında; sitoplazmik ribozomların büyük alt bileşeni (100) olan 60S ribosomal protein L3 (*Rpl3*), dinein

motor kompleksi ile çeşitli kargolara bağlanan bir adaptör proteini olarak işlev gören (101) Protein Hook homolog 3 (*Hook3*), kofaktör bağlanmada görevli olan Transketolase (*Tkt*), mRNA bağlayıcı protein (102) olan Cold-inducible RNA-binding protein (*Cirbp*), kalsiyum bağlayıcı S100-A4 (*S100a4*), pre-mRNA birleştirilmesinde rol alan (103) Probable ATP-dependent RNA helicase DDX5 (*Ddx5*)'in ortak olarak yer aldığı görülmektedir.

STRING veri tabanı analiz sonuçları incelendiğinde; çalışılan tüm zaman dilimleri için protein-protein etkileşiminde merkez protein olarak ribozomal protein L (Rpl ailesi) ailesi görülmektedir. Yapılan çalışmalara bakıldığında ise translasyon için gerekli olan ribozomal proteinlerin de rejeneratif dokularda up-regüle edildiği belirlenmiş olup, bu rejenerasyonun büyük miktarda translasyonu gerektirdiğini göstermektedir (104).

Endo T., ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmada, uzuv amputasyonu sonrası uzuv rejenerasyonunda meydana gelen bir dizi olayları incelemişlerdir. Literatürdeki sonuçlara göre uzuv amputasyonunu takiben hasarlı bölgede yara iyileşmesi, hasarlı kısımdaki hücrelerin göçü, sinir hücrelerinden gelen sinyaller ile farklılaşmış hücrelerin yara bölgesine göç etmesi ile blastema formunun oluşumu rejenerasyon için gerçekleşen aşamalardır (105). Bu çalışmada elde ettiğimiz sonuçları incelediğimizde, literatürü takiben (105); rejenerasyonun ilk evresi olan 1.gün proteinlerinin 0.gün proteinlerine göre olan sonuçlarına bakıldığında anlamlı olarak düşük seviyede ifade edilenlerin apoptoz, nörodejenerasyon, hücre yıkımı gibi süreçler ile hücrelerin göçüne ve anlamlı olarak daha yüksek seviyede ifade edilenlerin ise yara iyileşmesine katkıda bulunduğu önceki görülmektedir. Bunu takiben kullanılan diğer zaman dilimlerinin analizi ile rejenerasyonun sonraki aşamalarının da gerçekleştiği görülmektedir.

Paternal olarak ifade edilen gen 10 (*PEG10*), beyin gelişimi sırasında transkripsiyonel bir faktör olarak işlev gören ayırt edici bir proteini kodlayan murin miyelin ekspresyon faktörü 3 (*MyEF - 3*) ile %61.4 homoloji gösterir. CCHC tipi çinko parmak motifinin korunması *PEG10*'un ayrıca bir transkripsiyon faktörü olarak da işlev görebileceğini düşündürmektedir (106, 107). *PEG10* geni, temel işlevlerini gösteren eutherian memelilerde yüksek oranda korunmuştur ve retroviral gag-pol proteinleri ile yüksek benzerlik göstermektedir

(108, 109). Fareler üzerinde yapılan araştırmalar, plasenta oluşumu ve adiposit farklılaşmasında önemli bir rol oynadığı için *PEG10*'u önermektedir (110). *PEG10*, plasenta, yumurtalık, testis ve ayrıca beyin, böbrek, akciğer gibi somatik yetişkin organlarda güçlü bir şekilde ifade edilir (111). Bununla birlikte, *PEG10*'un düzensiz ifadesi hücre proliferasyonu, apoptoz ve malignitelerin gelişimi ile yakından ilişkilidir. Bununla birlikte, *PEG10* ifadesinin düzenlenmesinin kapsamlı mekanizması henüz başlangıç aşamasındadır (112).

Kromozom 3p26.1'de yer alan *SSUH2* geni, ilk olarak en az üç açık okuma çerçevesini (ORF) içeren ve muhtemelen farklı fonksiyonel ilgisi olan çeşitli translasyon ürünlerini kodladığı varsayılmış olup cDNA kütüphanesinde tanımlanmıştır (113). Aynı zamanda *SSUH2* geninin fare dokuları ve organlarında yaygın bir şekilde eksprese edildiği ve *SSUH2* geninin spesifik hücre tiplerinin gelişiminde kritik bir rol oynayabileceği gösterilmiştir. Subselüler lokalizasyon analizi ile *SSUH2* proteininin bir nükleer protein olduğu gösterilmiştir. Kantitatif reverse transkripsiyon PCR (qRT-PCR) kullanılarak periferel kan hücrelerinde ve diş eti hücrelerinde *SSUH2* ekspresyonunu ölçölmüş olup, düşük seviyelerde *SSUH2* mutant transkriptleri bulunmuştur (114). Anormal *SSUH2* transkriptlerinin azalmış stabilitesinin, mRNA'nın bozulmasına ve dolayısıyla protein ekspresyonunda bir azalmaya neden olduğunu varsayılmıştır (115). Zebra balığının erken diş gelişimi memeliler ile önemli ölçüde benzer olup (116) bu sayede Zebra balığı genom dizisinin bir araştırması, insan *SSUH2*'ye üç homolog gen ortaya çıkarmıştır. şimdiye kadar *SSUH2* ve onun farklı izoformlarının fonksiyonel önemi ile ilgili herhangi bir veri bulunmamaktadır. *SSUH2* ekspresyonu ayrıca faredeki çoklu dokularda da meydana gelmiştir. Aslında, bu ifade *SSUH2*^{+/-} ve *SSUH2*^{-/-} farelerin dokularında düşük seviyelerde gerçekteşir. Bununla birlikte, *SSUH2*'deki mutasyonlar temel olarak knock-in farelerde diş anomalileri ile ilişkilidir. Bu ilişki muhtemelen diğer dokularda *SSUH2*'nin işlevini telafi eden proteinlerden kaynaklanmaktadır (114).

Zonadhesin-like (*Zona*) sperm transmembran proteindir. Başlangıçta çözönen domuz sperm membranlarından izole edilmiş olup, zona pellucida'ya türe özđu bir şekilde bağlandığı bulunmuştur (117). Bunu takiben cDNA klonlama ve domuz zonadesin sekanslaması, insanlarda (118, 119) ve farelerde (120) sekans homologlarının izolasyonuna yol açmıştır. Zonadhesin, büyük, mozaik tipli, çok

domainli bir proteindir. Domain adı ve düzenlemesinde bazı tür farklılıkları olmasına rağmen, her türün dört farklı ayırıcı domaini vardır (120). Bunların her biri, genel olarak protein fonksiyonunun farklılığına rağmen, her bir alanın benzer bir rol oynadığı çeşitli fonksiyonel olarak hücre dışı proteinlerde meydana geldiği tarif edilmektedir. Spesifik olarak, bu alanların her biri ya protein-protein ya da protein-karbonhidrat etkileşimleri yoluyla yapışmada bir rol oynayabilir. Tipik olarak, bunlar hücre yüzeyinde meydana gelir ve hücre-hücre ya da hücre-hücre dışı matris bağlanmasını getirir (121). Bununla uyumlu olarak, zonadhesinin önerilen işlevi, spermatozoanın yumurta ekstraselüler matriksine (zona pellucida) (117) bağlanmasına yardımcı olan adezyonlardan biridir. Bu zonadhesinin fertilizasyonda oynadığı rolü gösterse de proteinin testiste ek olarak henüz tanımlanmamış bir rol oynaması mümkündür (121).

Yetişkin iskelet kası (*SkeMus*) kimyasal, mekanik veya fiziksel yaralanmalara tepki olarak yeniden rejenere olma yeteneğine sahiptir. Hasar görmüş veya yaralanan iskelet kası, ekstrasellüler metriksin bazal laminası ile kas liflerinin plazma arasına yerleştirilen, çok uzak durağan mononükleer kök hücrelerin aktivasyon alanını satelit hücre olarak adlandırır (122).

Uncharacterized protein LOC (*Loc*), yapısal olarak bir genin var olduğu ancak karşılık gelen transkripsiyon ürününün izole edilmediği ve karakterize edilmediği anlamına gelmektedir. Her yeni dizilenmiş genomda kodlanan proteinlerin %20 ile %40'ını oluşturmaktadırlar (123).

Merkezi sinir sisteminde amino asit taşıyıcıları, nörotransmitterlerin, örneğin glutamat ve aspartat için taşıyıcılar olarak önemli bir rol oynarlar (124). Ayrıca, amino asit taşıyıcıları aynı zamanda besin sensörleri olarak da işlev görebilir ve taşıma işlevlerinden dolayı, besin sentezine (125) bağlı olarak sentezini artırarak veya azaltarak protein sentezini kontrol edebilirler (126). Hellsten SV. ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada (127), *SLC38A10*'un immün boyama ile fare beyinde bol olduğu ve boyanmanın hem nöronlar hem de astrositler için markerlar ile birlikte renklendirildiğini göstermişlerdir. Ayrıca taşımının çift yönlü olduğu ve L - glutamin, L alaninin, L -glutamat ve D -aspartate alımını ve dışa akımını göstermişlerdir. Tüm bunlar ele alındığında hücre tipi lokalizasyonu ve *SLC38A10* için

substrat profili, bu taşıyıcının hem uyarıcı hem de inhibitör nörotransmisyonunda yer alan yollarda potansiyel bir role sahip olduğunu düşündürmektedir.

Bu yaptığımız çalışmanın transkriptom sonuçlarında çıkan proteinlerin görevlerine bakıldığında protein üretim ve yıkım mekanizması, yara iyileşmesinin tetiklenmesi gibi birçok görev ve fonksiyonda yer alan RNA'ların varlığı görülmektedir ve bu sonuçlar genel bir veri çalışmasını ifade etmektedir. Bununla birlikte transkriptom tablolarında (Tablo 8.1 ile 8.6 aralığında gösterilmiştir) tüm zaman dilimleri için artan ve azalan proteinlere bakıldığında aslında sinir sisteminde de görev almakta olan RNA'ların varlığı söz konusudur. Bunlardan bazılarına bakılacak olunursa tablo 8.1'de 1.gün örneklerinin 0.gün örneklerine göre kıyaslandığında artan proteinlerden zinc finger BED domain-containing protein 6; düzenleyici, yapısal ve enzimatik de dahil olmak üzere sayısız proteinin yapısı ve işlevi için gereklidir.

Merkezi sinir sisteminde çinko, sinir koruyucu bir ürün veya kofaktör olarak ek bir role sahiptir. Bu rolde çinko, "çinko içeren" nöronlar olarak adlandırılan belirli bir nöron grubunun sinaptik veziküllerinde yoğunlaşmıştır. Çinkonun, nöron hasarının eksitotoksik mekanizmalarını içeren beyin hastalıklarında veya yaralanmalarında nöronal yaralanmaya neden olan bir etken olabileceğine dair bol miktarda kanıt vardır (128). Tablo 8.2'de 1.gün örneklerinin 0.gün örneklerine göre kıyaslandığında azalan proteinlerden protein S100-G-like; genellikle sinyal iletimi, hücre farklılaşması, hücre hareketliliğinin düzenlenmesi, transkripsiyon ve hücre döngüsünün ilerlemesi gibi çok sayıda hücresel aktiviteye katılırlar (129). Bununla birlikte nörodejenerasyon, nöron sağkalımı ve büyümesinde aşırı ekspresyonu görülmektedir (130). Tablo 8-3'de 4.gün örneklerinin 0.gün örneklerine göre kıyaslandığında artan proteinlerden tenascin-C; esas olarak embriyonik gelişimde ifade edilen ve yetişkinlikte down-regüle edilen bir hücre dışı matriks molekülüdür. Erişkinde yeniden ifadesi, iltihaplanma, rejenerasyon veya neoplazi gibi patolojik koşullar altında gerçekleşir. Tenaskin ailesinin en önemli üyesi olan Tenascin-C'nin (TN-C), glioma dokusunda yüksek oranda eksprese edildiği ve artan kanıtlar ile TN-C'nin hücre göçü veya invazyonunda önemli rolü olduğunu göstermektedir (131). Collagen alpha-1(VII) chain-like isoform X2; sinir dokusunun büyümesini ve rejenerasyonunu modüle eden faktörler, en ilginç biyolojik ve klinik problemin bir parçasıdır. Hem in vivo hem de in vitro yapılan

çalışmalar, kollajen tarafından bu sürecin güçlendirilmesi veya inhibe edilmesinde aktif rol üzerinde önemli bir ışık tutmuştur. Hücre yapışması, büyüme ve farklılaşma için koşullar sağlama kabiliyeti nedeniyle doku kültüründe sıklıkla substrat olarak kullanılan kollajen, Schwann hücreleri tarafından sinir lifi ve sinir lifi miyelinasyonu için gereklidir (132). Tablo 8.4’de 4.gün örneklerinin 0.gün örneklerine göre kıyaslandığında azalan proteinlerden High mobility group protein B1 (HMGB1); Daha önce sadece transkripsiyonu arttıran bir nükleer faktör olarak işlev gördüğü düşünülen protein, son zamanlarda enfeksiyona, yaralanmaya ve enflamasyona verilen cevaba aracılık eden önemli bir sitokin olduğu keşfedilmiştir. Yapılan çalışmalar Alzheimer hastalığının sıçan modellerinde ölmekte olan nöronlar etrafında bulunur ve HMGB1 enjeksiyonu β -amiloidin temizlenmesini geciktirir ve Alzheimer hastalığının ilerlemesini hızlandırır. Alternatif olarak, artan HMGB1 seviyeleri, çeşitli klinik ortamlarda gözlenen yüksek HMGB1 seviyeleri göz önüne alındığında, rejeneratif sürecin (ekstraserebral bölgelerde de meydana gelebilir) bir göstergesi olabilir (133). Tablo 8.5’de 7.gün örneklerinin 0.gün örneklerine göre kıyaslandığında artan proteinlerden filamin-A isoform X3; yaklaşık 30 yıl önce ilk kas dışı aktin bağlayıcı protein olarak keşfedilmiştir ve memelilerde 3 farklı izoformu bulunmuştur. Filamin A ve B’deki null ve spesifik missense mutasyonlarının, insanlarda beyin, kemik ve diğer organlarda geniş bir gelişimsel malformasyona neden olduğu bildirilmiş olup, muhtemelen farklı hastalıkların farklı filamin etkileşimleri vurguladığı düşünülmektedir. Filamin A gelişmekte olan serebral krotekte fonksiyon oluşturabilir; göç eden nöronların ucundaki filamentöz aktinin dinamik olarak düzenlenmesi için, filamin A hareketsiz nöronların tamamen yokluğunu ve böylece ventriküler zondan ayrılmasını önler (134).

Elde edilen proteinlerin sinir sistemindeki etkilerinin yanısıra, kan hücrelerinin üretiminde, proteinlerin üretim ve yıkım mekanizmalarında, yara iyileşmesinin tetiklenmesi ile RNA bağlayıcı protein olarak da görev yaptıkları görülmektedir.

Bu çalışma ile omurilik hasarı sonrası merkezi sinir sisteminde meydana gelen rejeneratif süreç, sinir sistemindeki gelişimsel süreç, omurilik gelişimi gibi etkenlerde rol alan RNA’ların varlığı tespit edilmiş olup, yapılan çalışma neticesinde aksolot transkriptom veri tabanı arttırılmıştır.

8 EKLER

Tablo 8.1 1.gün örneklerinin 0.gün örneklerine göre en yüksek değişimi gösteren RNA'lar.

RNA dizileme numarası	PostFC	Açıklama
AMEXTC_0340000126316	89,82712158	XP_021489437.1 zinc finger BED domain-containing protein 6 [Meriones unguiculatus]
AMEXTC_0340000029886	54,64597303	XP_007070961.1 PREDICTED: periostin isoform X1 [Chelonia mydas]
AMEXTC_0340000195584	54,40736515	BAE47565.1 beta-globin [Cynops pyrrhogaster]
AMEXTC_0340000059884	40,98040617	XP_023808666.1 uncharacterized protein LOC101166204 isoform X3 [Oryzias latipes]
AMEXTC_0340000006001	29,85543857	XP_006117710.1 PREDICTED: uncharacterized protein LOC102449186 isoform X1 [Pelodiscus sinensis]
AMEXTC_0340000063544	23,95043545	XP_017736557.1 PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: zinc finger BED domain-containing protein 6 [Rhinopithecus bieti]
AMEXTC_0340000043230	16,54381096	XP_014351169.1 PREDICTED: uncharacterized protein K02A2.6-like [Latimeria chalumnae]
AMEXTC_0340000126973	15,87534138	XP_017945114.1 PREDICTED: retrotransposon-derived protein PEG10 [Xenopus tropicalis]
AMEXTC_0340000125567	15,86353629	OCA19210.1 hypothetical protein XENTR_v90029571mg [Xenopus tropicalis]
AMEXTC_0340000051557	15,36071879	XP_014339909.1 PREDICTED: endogenous

		retrovirus group 3 member 1 Env polyprotein-like, partial [Latimeria chalumnae]
AMEXTC_0340000234723	14,54615917	XP_017578166.1 PREDICTED: protein NYNRIN-like [Pygocentrus nattereri]
AMEXTC_0340000046647	13,87988762	XP_019112704.1 PREDICTED: protein NYNRIN-like [Larimichthys crocea]
AMEXTC_0340000086004	12,81603484	XP_015265085.1 PREDICTED: cold shock domain-containing protein E1 isoform X1 [Gekko japonicus]
AMEXTC_0340000024435	12,54052454	AUO29847.1 MucXS [Xenopus tropicalis]
AMEXTC_0340000057674	12,43422175	XP_018408340.1 PREDICTED: putative nuclease HARBI1 [Nanorana parkeri]
AMEXTC_0340000086013	11,62155907	XP_011175023.1 PREDICTED: ATP-dependent DNA helicase PIF1-like, partial [Solenopsis invicta]
AMEXTC_0340000067022	11,56329336	NP_001292069.1 tubulin alpha-8 chain [Gallus gallus]
AMEXTC_0340000040619	11,45264267	OCT57199.1 hypothetical protein XELAEV_18003842mg [Xenopus laevis]
AMEXTC_0340000123158	10,72110522	XP_023653258.1 myb-related transcription factor, partner of profilin-like [Paramormyrops kingsleyae]
AMEXTC_0340000031971	10,64635423	XP_014665334.1 PREDICTED: putative nuclease HARBI1 [Priapulus caudatus]

Tablo 8.2 1.gün örneklerinin 0.gün örneklerine göre en düşük değişimi gösteren RNA'lar.

RNA dizileme numarası	PostFC	Açıklama
AMEXTC_0340000066390	0,112177018	XP_007431701.1 PREDICTED: 60S ribosomal protein L13a [Python bivittatus]
AMEXTC_0340000124334	0,110915975	XP_005300453.1 protein disulfide-isomerase A4 [Chrysemys picta bellii]
AMEXTC_0340000038193	0,109303376	XP_007070961.1 PREDICTED: periostin isoform X1 [Chelonia mydas]
AMEXTC_0340000131159	0,10406764	AAH43955.1 Gdi2-prov protein [Xenopus laevis]
AMEXTC_0340000067480	0,102756633	XP_008945582.1 PREDICTED: 40S ribosomal protein S4, partial [Merops nubicus]
AMEXTC_0340000160357	0,098308883	XP_018411455.1 PREDICTED: protein CDV3 homolog isoform X1 [Nanorana parkeri]
AMEXTC_0340000266531	0,097698312	NP_001079885.1 transketolase-like 2 L homeolog [Xenopus laevis]
AMEXTC_0340000193725	0,081504655	AAH87521.1 LOC496093 protein, partial [Xenopus laevis]
AMEXTC_0340000066990	0,081070157	XP_415765.1 PREDICTED: malate dehydrogenase, mitochondrial [Gallus gallus]
AMEXTC_0340000070761	0,077616108	KOB75968.1 beta-actin [Operophtera brumata]
AMEXTC_0340000174517	0,076855397	XP_006272431.1 PREDICTED: signal transducer and activator of transcription 1-alpha/beta [Alligator mississippiensis]

AMEXTC_0340000192858	0,076701263	XP_007065975.1 PREDICTED: A-kinase anchor protein 8-like [Chelonia mydas]
AMEXTC_0340000054658	0,072668825	NP_001120075.1 60S ribosomal protein L3 [Xenopus tropicalis]
AMEXTC_0340000005238	0,071517078	XP_012820988.1 PREDICTED: collagen alpha-6(VI) chain-like isoform X1 [Xenopus tropicalis]
AMEXTC_0340000156910	0,071073361	XP_007067431.1 PREDICTED: vigilin isoform X1 [Chelonia mydas]
AMEXTC_0340000057045	0,065905229	BAO00931.1 proteasome subunit beta type 8,F-type, partial [Cynops pyrrhogaster]
AMEXTC_0340000066700	0,063319705	BAE23941.1 unnamed protein product, partial [Mus musculus]
AMEXTC_0340000067461	0,049379854	XP_006627823.1 PREDICTED: 60S ribosomal protein L21 [Lepisosteus oculatus]
AMEXTC_0340000067758	0,032951225	XP_018089084.1 PREDICTED: protein S100-G-like [Xenopus laevis]
AMEXTC_0340000041076	0,030332325	XP_023605507.1 nucleosome assembly protein 1-like 1 isoform X2 [Myotis lucifugus]

Tablo 8.3 4.gün örneklerinin 0.gün örneklerine göre en yüksek değişimi gösteren RNA'lar.

RNA dizileme numarası	PostFC	Açıklama
AMEXTC_0340000071773	29,2503962	AGH15796.1 Rpl11 protein [Pachytriton brevipes]
AMEXTC_0340000066686	23,87970781	XP_003768263.1 keratin, type I cytoskeletal 42 [Sarcophilus harrisii]
AMEXTC_0340000207707	18,87611513	ADX36088.1 thrombospondin-1 [Ambystoma mexicanum]
AMEXTC_0340000032782	15,94340835	ASW28000.1 tenascin-C [Ambystoma mexicanum]
AMEXTC_0340000052945	15,33847079	XP_009665719.1 PREDICTED: nuclear pore complex-interacting protein family member B3-like [Struthio camelus australis]
AMEXTC_0340000184568	13,79015806	XP_006278775.2 PREDICTED: alpha- centractin [Alligator mississippiensis]
AMEXTC_0340000022484	13,47883787	XP_018114574.1 PREDICTED: collagen alpha- 1(VII) chain-like isoform X2 [Xenopus laevis]
AMEXTC_0340000054226	11,67060519	XP_014351169.1 PREDICTED: uncharacterized protein K02A2.6-like [Latimeria chalumnae]
AMEXTC_0340000069679	8,604436889	NP_001011499.1 40S ribosomal protein S23 [Xenopus tropicalis]
AMEXTC_0340000186727	7,537346541	AAI51542.1 ADSS protein, partial [Bos taurus]
AMEXTC_0340000008900	7,461563372	XP_018414343.1 PREDICTED: ATP-citrate synthase isoform X2 [Nanorana parkeri]

AMEXTC_0340000063329	7,314048436	XP_018424440.1 PREDICTED: keratin, type II cytoskeletal 5-like [Nanorana parkeri]
AMEXTC_0340000167006	7,225531739	XP_019812656.1 PREDICTED: DBIRD complex subunit ZNF326 isoform X2 [Bos indicus]
AMEXTC_0340000046163	7,058542688	BAT33741.1 LINE-1 type transposase domain containing 1-like, partial [Xenopus laevis]
AMEXTC_0340000066381	6,897943064	AFN68290.1 keratin 5, partial [Ambystoma mexicanum]
AMEXTC_0340000024435	6,745138058	AUO29847.1 MucXS [Xenopus tropicalis]
AMEXTC_0340000064147	5,318803416	BAB18863.1 Ras like G protein Rad [Cynops pyrrhogaster]
AMEXTC_0340000238110	4,959651805	XP_019361392.1 PREDICTED: CCR4-NOT transcription complex subunit 1 isoform X8 [Gavialis gangeticus]
AMEXTC_0340000002829	4,851119335	XP_002191975.2 PREDICTED: keratin, type II cytoskeletal cochlear-like [Taeniopygia guttata]
AMEXTC_0340000123695	4,6750839	XP_020662528.1 dual specificity protein phosphatase 1 [Pogona vitticeps]

Tablo 8.4 4.gün örneklerinin 0.gün örneklerine göre en düşük değişimi gösteren RNA'lar.

RNA dizileme numarası	PostFC	Açıklama
AMEXTC_0340000069444	0,134106967	XP_009930666.1 PREDICTED: 40S ribosomal protein S2, partial [Opisthocomus hoazin]
AMEXTC_0340000216277	0,117033479	KHK12987.1 hypothetical protein I614_14939, partial [Listeria monocytogenes SHL006] %iden=93.137
AMEXTC_0340000064919	0,114296537	XP_019967856.1 PREDICTED: alpha-actinin-3-like [Paralichthys olivaceus]
AMEXTC_0340000057204	0,098678053	P31231.1 RecName: Full=Calsequestrin-1; AltName: Full=Calsequestrin, skeletal muscle isoform; Flags: Precursor
AMEXTC_0340000055424	0,087552447	XP_018426105.1 PREDICTED: tropomyosin alpha-3 chain isoform X5 [Nanorana parkeri]
AMEXTC_0340000069589	0,077361142	XP_007453897.1 PREDICTED: 60S ribosomal protein L22-like 1-like [Lipotes vexillifer]
AMEXTC_0340000038193	0,073885613	XP_007070961.1 PREDICTED: periostin isoform X1 [Chelonia mydas]
AMEXTC_0340000170437	0,069218137	KHM22702.1 endonuclease, partial [Enterobacter hormaechei subsp. oharae]
AMEXTC_0340000030945	0,030441097	XP_012826675.1 PREDICTED: collagen alpha-3(VI) chain isoform X2 [Xenopus tropicalis]

AMEXTC_0340000055571	0,030131341	XP_018092323.1 PREDICTED: myosin-4 [Xenopus laevis]
AMEXTC_0340000175183	0,027319212	XP_021066260.1 peptidyl- prolyl cis-trans isomerase A isoform X2 [Mus pahari]
AMEXTC_0340000242350	0,02712957	ELW48343.1 High mobility group protein B1 [Tupaia chinensis]
AMEXTC_0340000191248	0,026615128	XP_007995756.1 PREDICTED: 60S ribosomal protein L13a isoform X1 [Chlorocebus sabaeus]
AMEXTC_0340000214366	0,016781551	KFV02792.1 40S ribosomal protein S2, partial [Tauraco erythrophus]
AMEXTC_0340000191714	0,013956324	XP_004413149.1 PREDICTED: elongation factor 1-alpha 1, partial [Odobenus rosmarus divergens]
AMEXTC_0340000143922	0,013543182	ACL53389.1 unknown [Zea mays] %iden=38.542
AMEXTC_0340000091473	0,010360707	XP_010952794.1 PREDICTED: 60S ribosomal protein L7a, partial [Camelus bactrianus]
AMEXTC_0340000178983	0,010125287	XP_005298314.1 60S ribosomal protein L23a [Chrysemys picta bellii]
AMEXTC_0340000239742	0,007582248	XP_005974090.1 PREDICTED: elongation factor 1-alpha 1-like [Pantholops hodgsonii]
AMEXTC_0340000239738	0,007116458	AAH14892.1 Unknown (protein for IMAGE:3909122), partial [Homo sapiens]

Tablo 8.5 7.gün örneklerinin 0.gün örneklerine göre en yüksek değişimi gösteren RNA'lar.

RNA dizileme numarası	PostFC	Açıklama
AMEXTC_0340000195584	20,3550853	BAE47565.1 beta-globin [Cynops pyrrhogaster] %iden=61.644
AMEXTC_0340000067344	18,3538159	BAD30049.1 minor alpha globin chain [Ambystoma mexicanum]
AMEXTC_0340000145853	16,49444589	XP_012811743.1 PREDICTED: galectin-9 isoform X2 [Xenopus tropicalis]
AMEXTC_0340000024435	13,12461294	AUO29847.1 MucXS [Xenopus tropicalis]
AMEXTC_0340000201758	8,640504709	PIO14833.1 hypothetical protein AB205_0089960 [Rana catesbeiana]
AMEXTC_0340000126973	8,458992079	XP_017945114.1 PREDICTED: retrotransposon- derived protein PEG10 [Xenopus tropicalis]
AMEXTC_0340000003048	7,0783676	XP_018082069.1 PREDICTED: IgGfc-binding protein-like [Xenopus laevis]
AMEXTC_0340000007234	5,916774809	XP_017951799.1 PREDICTED: filamin-A isoform X3 [Xenopus tropicalis]
AMEXTC_0340000071015	5,59953858	XP_021410234.1 tropomyosin beta chain isoform X11 [Lonchura striata domestica]
AMEXTC_0340000002081	5,261707105	AAH43901.1 LOC398464 protein, partial [Xenopus laevis]
AMEXTC_0340000000072	4,637548196	XP_015678832.1 PREDICTED: serine/arginine repetitive matrix protein 2-like [Protothirops mucrosquamatus]

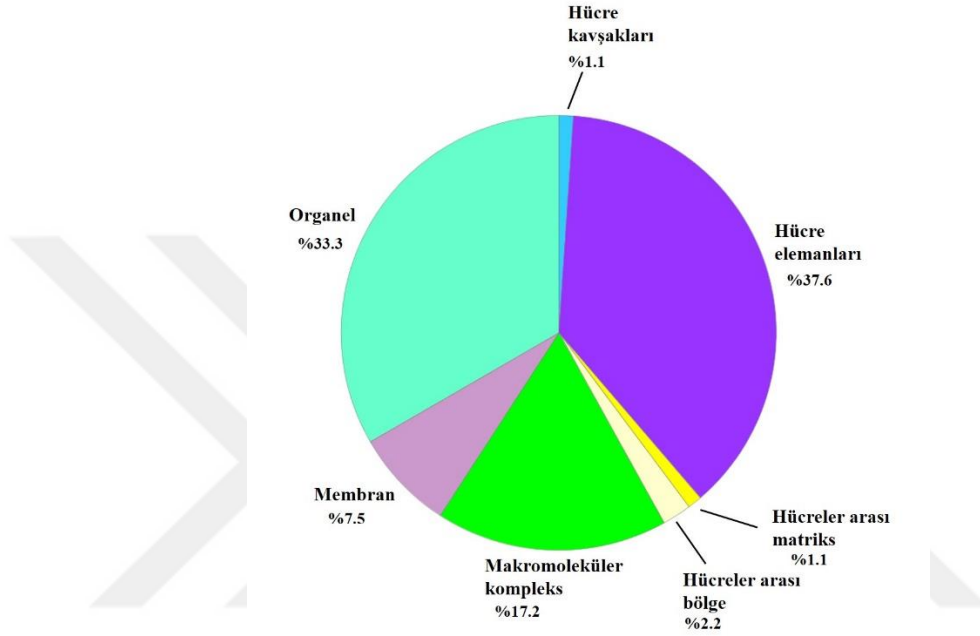
AMEXTC_0340000177473	4,492107164	XP_006118433.1 PREDICTED: dipeptidyl peptidase 1 [Pelodiscus sinensis]
AMEXTC_0340000063329	4,37947738	XP_018424440.1 PREDICTED: keratin, type II cytoskeletal 5-like [Nanorana parkeri]
AMEXTC_0340000047971	4,377567723	XP_006862233.1 PREDICTED: KH domain- containing, RNA-binding, signal transduction-associated protein 1 isoform X1 [Chrysochloris asiatica]
AMEXTC_0340000065249	4,074194512	XP_003229218.1 PREDICTED: alpha-actinin-3 [Anolis carolinensis]
AMEXTC_0340000066381	3,487983765	AFN68290.1 keratin 5, partial [Ambystoma mexicanum]
AMEXTC_0340000174310	3,14800565	XP_018415849.1 PREDICTED: desmoplakin isoform X2 [Nanorana parkeri]
AMEXTC_0340000013314	3,090599409	XP_019591155.1 PREDICTED: galectin-3- binding protein [Rhinolophus sinicus]
AMEXTC_0340000277558	2,725419466	OCA16073.1 hypothetical protein XENTR_v900287892mg, partial [Xenopus tropicalis]
AMEXTC_0340000060089	2,663527307	XP_005310567.1 PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: src-like-adaptor [Chrysemys picta bellii] %iden=66.787

Tablo 8.6 7.gün örneklerinin 0.gün örneklerine göre en düşük değişimi gösteren RNA'lar.

RNA dizileme numarası	PostFC	Açıklama
AMEXTC_0340000047259	0,144282309	XP_010626665.1 PREDICTED: CCR4-NOT transcription complex subunit 6-like [Fukomys damarensis]
AMEXTC_0340000184733	0,143594623	KFQ14876.1 Pleckstrin homology-like domain family A member 3, partial [Leptosomus discolor]
AMEXTC_0340000171595	0,13162458	XP_003215431.1 PREDICTED: 14-3-3 protein theta [Anolis carolinensis]
AMEXTC_0340000066593	0,131444255	XP_019397857.1 PREDICTED: 60S ribosomal protein L38 isoform X1 [Crocodylus porosus]
AMEXTC_0340000057204	0,128984775	P31231.1 RecName: Full=Calsequestrin-1; AltName: Full=Calsequestrin, skeletal muscle isoform; Flags: Precursor
AMEXTC_0340000127006	0,128077555	XP_014351693.1 PREDICTED: uncharacterized protein LOC106705974 [Latimeria chalumnae]
AMEXTC_0340000143490	0,120742005	XP_007498108.1 PREDICTED: acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein 32 family member B isoform X1 [Monodelphis domestica]
AMEXTC_0340000066974	0,114711096	XP_018081912.1 PREDICTED: 40S ribosomal protein S9-like [Xenopus laevis]
AMEXTC_0340000005844	0,113810691	XP_019373457.1 PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: selenoprotein P [Gavialis gangeticus]
AMEXTC_0340000070761	0,11110713	KOB75968.1 beta-actin [Operophtera brumata]
AMEXTC_0340000084244	0,08607903	XP_004684642.1 PREDICTED: myosin-3 [Condylura cristata]
AMEXTC_0340000122053	0,085272744	XP_013806534.1 PREDICTED: neuroblast differentiation-associated protein AHNAK, partial [Apteryx australis mantelli]
AMEXTC_0340000156911	0,071314018	XP_007067431.1 PREDICTED: vigilin isoform X1 [Chelonia mydas]

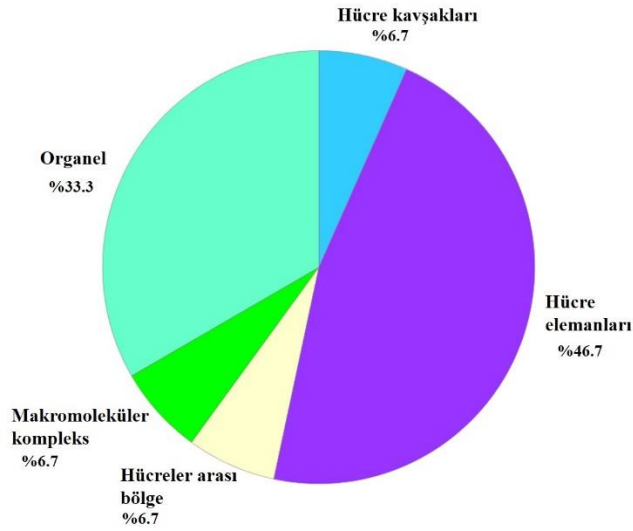
AMEXTC_0340000123641	0,067984786	XP_023652093.1 ribosome-binding protein 1 isoform X5 [Paramormyrops kingsleyae]
AMEXTC_0340000055571	0,064639076	XP_018092323.1 PREDICTED: myosin-4 [Xenopus laevis]
AMEXTC_0340000038193	0,057817215	XP_007070961.1 PREDICTED: periostin isoform X1 [Chelonia mydas]
AMEXTC_0340000044071	0,054199741	XP_014799912.1 PREDICTED: fibrillin-1 isoform X1 [Calidris pugnax]
AMEXTC_0340000067758	0,047829404	XP_018089084.1 PREDICTED: protein S100-G-like [Xenopus laevis]
AMEXTC_0340000011144	0,034924723	XP_002191975.2 PREDICTED: keratin, type II cytoskeletal cochlear-like [Taeniopygia guttata]
AMEXTC_0340000067636	0,028349747	CYJ58040.1 3-ketoacyl-ACP reductase [Streptococcus pneumoniae]

1.gün örneklerinin 0.gün örnekleri ile karşılaştırılmasında elde edilen sonuçlarda, hücresel bileşen analiz sonuçlarına göre proteinlerinin yaygın olarak organel (%33.3), hücre elemanları (%37.6) ve makromoleküler kompleks (%17.2) de görevli oldukları görülmektedir. Membran, hücre kavşakları, hücreler arası bölge ve hücresel arası matrikste de görevli olan RNA'ların varlığı görülmektedir (Şekil 8.1).



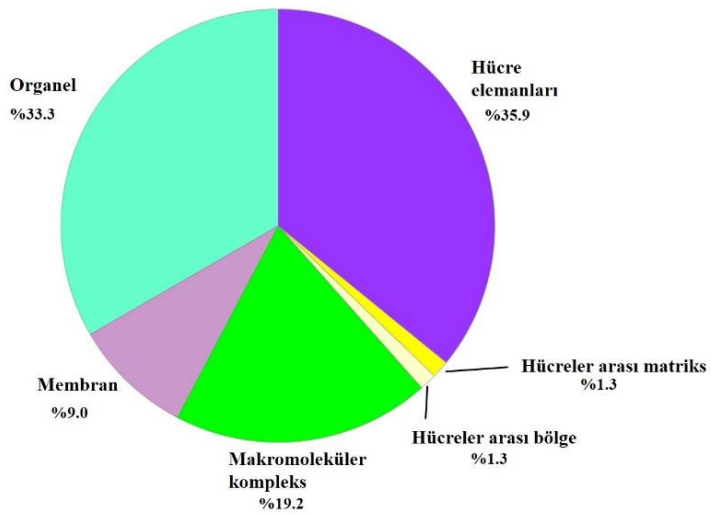
Şekil 8.1 PANTHER veri tabanı ile tanımlanan 1.gün RNA örneklerinin 0.gün RNA örneklerine göre hücresel bileşen analizi.

1.gün örneklerinin 0.gün örnekleri ile karşılaştırılmasında elde edilen sonuçlarda, daha yüksek seviyede ifade edilen 62 RNA'nın hücresel bileşen analiz sonuçlarına göre; hücre elemanları (%46.7), organel (%33.3), makromoleküler kompleks (%6.7), hücre kavşakları (%6.7), hücreler arası bölge (%6.7) de görevli olan RNA'ların varlığı görülmektedir (Şekil 8.2).



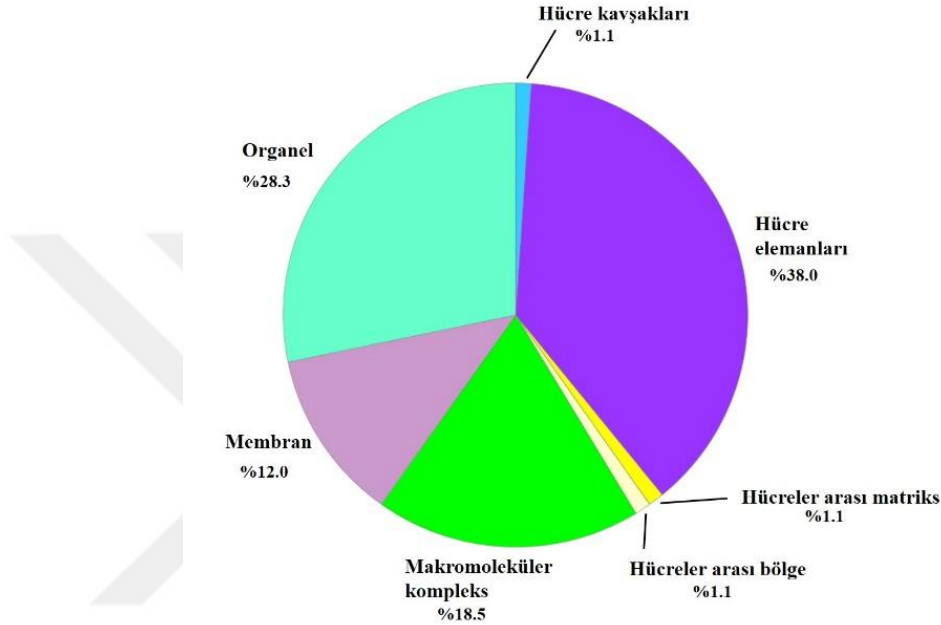
Şekil 8.2 PANTHER veri tabanı ile tanımlanan 1.gün RNA örneklerinin 0.gün RNA örneklerine göre daha yüksek seviyede ifadesinin hücresel bileşen analizi.

1.gün örneklerinin 0.gün örnekleri ile karşılaştırılmasında elde edilen sonuçlarda, daha düşük seviyede ifade edilen 183 proteinin (PostFC<1) hücresel bileşen analiz sonuçlarına göre; hücre elemanları (%35.9), organel (%33.3), makromoleküler kompleks (%19.2), membran (%9.0), hücreler arası bölge (%1.3) ve hücreler arası matriks (%1.3) de görevli olan RNA'ların varlığı görülmektedir (Şekil 8.3).



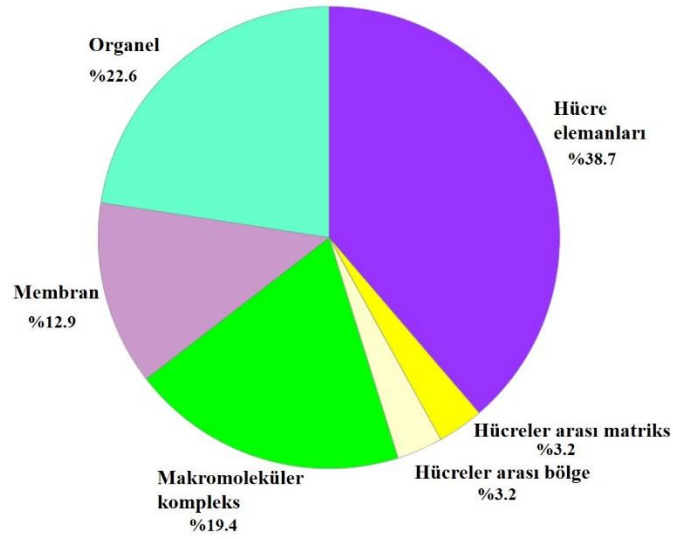
Şekil 8.3 PANTHER veri tabanı ile tanımlanan 1.gün RNA örneklerinin 0.gün RNA örneklerine göre daha düşük seviyede ifadesinin hücresel bileşen analizi.

4.gün örneklerinin 0.gün örnekleri ile karşılaştırılmasında elde edilen sonuçlarda, hücresel bileşen analiz sonuçlarına bakıldığında yaygın olarak hücre kavşakları (%38.0), organel (%28.3), makromoleküler kompleks (%18.5) ve membran (%12.0) oluştururken, hücreler arası bölge, hücreler arası matriks, hücreler arası kavşakları da sınıflandırmada yer almaktadır (Şekil 8.4).



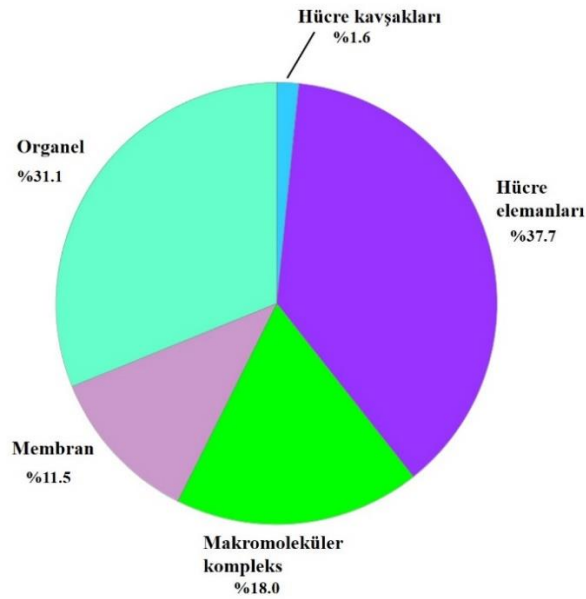
Şekil 8.4 PANTHER veri tabanı ile tanımlanan 4.gün RNA örneklerinin 0.gün RNA örneklerine göre hücresel bileşen analizi.

4.gün örneklerinin 0.gün örnekleri ile karşılaştırılmasında elde edilen sonuçlarda, daha yüksek seviyede ifade edilen 87 RNA'nın hücresel bileşen analiz sonuçlarına göre; hücre elemanları (%38.7), organel (%22.6), makromoleküler kompleks (%19.4), membran (%12.9), hücreler arası matriks (%3.2) ve hücreler arası bölge (%3.2)'de görevli olan RNA'ların varlığı görülmektedir (Şekil 8.5).



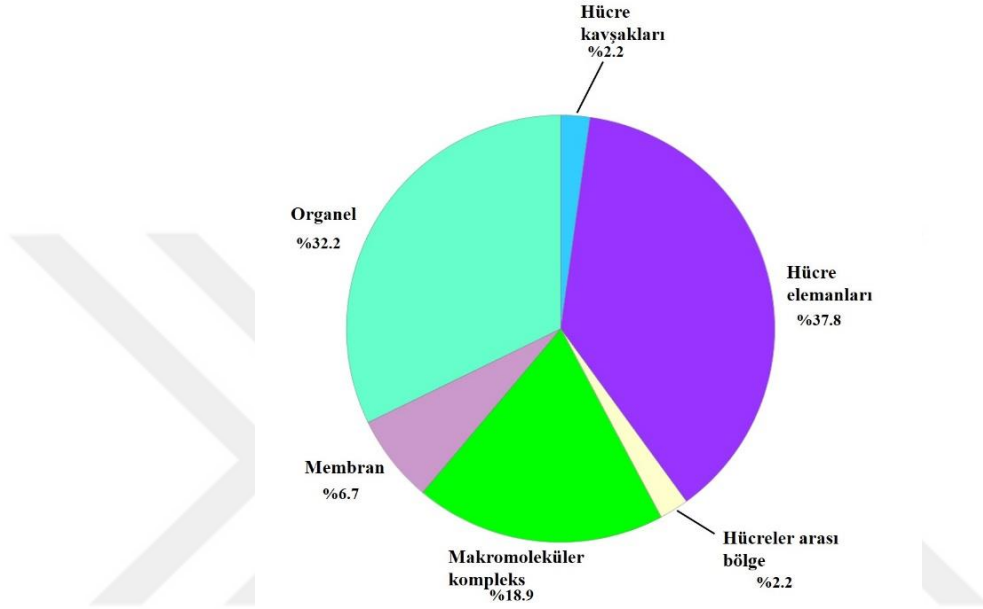
Şekil 8.5 PANTHER veri tabanı ile tanımlanan 4.gün RNA örneklerinin 0.gün RNA örneklerine göre daha yüksek seviyede ifadesinin hücresel bileşen analizi.

4.gün örneklerinin 0.gün örnekleri ile karşılaştırılmasında elde edilen sonuçlarda, daha düşük seviyede ifade edilen 130 proteinin (PostFC<1) hücresel bileşen analiz sonuçlarına göre; hücre elemanları (%37.7), organel (%31.1), makromoleküler kompleks (%18.0), membran (%11.5), hücre kavşakları (%1.6)'nda görevli olan RNA'ların varlığı görülmektedir (Şekil 8.6).



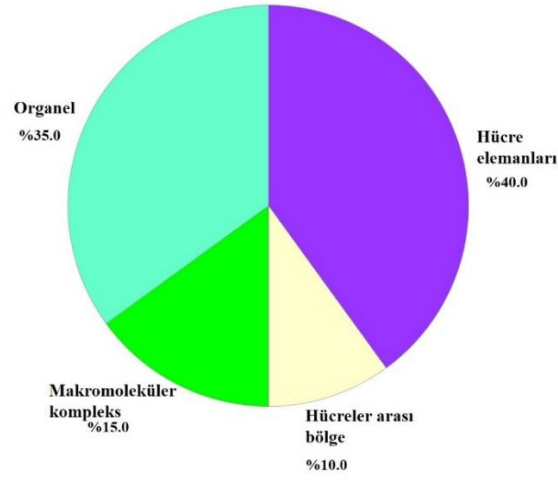
Şekil 8.6 PANTHER veri tabanı ile tanımlanan 4.gün RNA örneklerinin 0.gün RNA örneklerine göre daha düşük seviyede ifadesinin hücresel bileşen analizi.

7.gün örneklerinin 0.gün örnekleri ile karşılaştırılmasında elde edilen sonuçlarda, hücresel bileşen analizi sonuçlarına göre hücre elemanları (%37.8), organel (%32.2) ve makromoleküler kompleks (%18.9) olarak yer aldığı, bunlarla birlikte hücreler arası bölge, hücre kavşakları, membran sınıflandırılması yapılmıştır (Şekil 8.7).



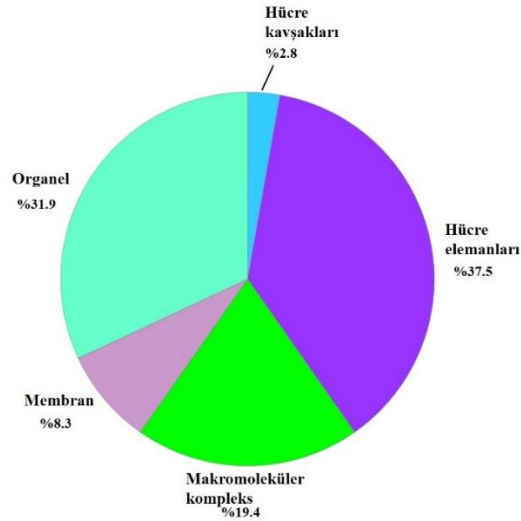
Şekil 8.7 PANTHER veri tabanı ile tanımlanan 7.gün RNA örneklerinin 0.gün RNA örneklerine göre hücresel bileşen analizi.

7.gün örneklerinin 0.gün örnekleri ile karşılaştırılmasında elde edilen sonuçlarda, daha yüksek seviyede ifade edilen 41 RNA'nın hücresel bileşen analiz sonuçlarına göre; hücre elemanları (%40.0), organel (%35.0), makromoleküler kompleks (%15.0) ve hücreler arası bölge (%10.0)'de görevli olarak sınıflandırıldığı görülmektedir (Şekil 8.8).



Şekil 8.8 PANTHER veri tabanı ile tanımlanan 7.gün RNA örneklerinin 0.gün RNA örneklerine göre daha yüksek seviyede ifadesinin hücresel bileşen analizi.

7.gün örneklerinin 0.gün örnekleri ile karşılaştırılmasında elde edilen sonuçlarda, daha düşük seviyede ifade edilen 130 RNA'nın hücresel bileşen analiz sonuçlarına göre; hücre elemanları (%37.5), organel (%31.9), makromoleküler kompleks (%19.4), membran (%8.3), hücre kavşakları (%2.8)'nda görevli olan proteinlerin varlığı görülmektedir (Şekil 8.9).



Şekil 8.9 PANTHER veri tabanı ile tanımlanan 7.gün RNA örneklerinin 0.gün RNA örneklerine göre daha düşük seviyede ifadesinin hücresel bileşen analizi.

9 KAYNAKLAR

1. Rhoades RA, Bell DR. Medical physiology: Principles for clinical medicine: Lippincott Williams & Wilkins; 2012.
2. Fox SI. Fundamentals of human physiology: McGraw-Hill; 2009.
3. Shanes AM. Electrochemical aspects of physiological and pharmacological action in excitable cells. *Pharmacological reviews*. 1958;10(2):165-273.
4. Kirshblum SC, Burns SP, Biering-Sorensen F, Donovan W, Graves DE, Jha A, et al. International standards for neurological classification of spinal cord injury (revised 2011). *The journal of spinal cord medicine*. 2011;34(6):535-46.
5. Gómez RM, Sánchez MY, Portela-Lomba M, Ghotme K, Barreto GE, Sierra J, et al. Cell therapy for spinal cord injury with olfactory ensheathing glia cells (OECs). *Glia*. 2018;66(7):1267-301.
6. Scholpa NE, Schnellmann RG. Mitochondrial-based therapeutics for the treatment of spinal cord injury: mitochondrial biogenesis as a potential pharmacological target. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2017;363(3):303-13.
7. Hewson D, Bedford N, Hardman J. Spinal cord injury arising in anaesthesia practice. *Anaesthesia*. 2018;73:43-50.
8. Demopoulos H, Flamm E, Pietronigro D, Seligman M. The free radical pathology and the microcirculation in the major central nervous system disorders. *Acta Physiologica Scandinavica*. 1980;110(Suppl. 492):91-119.
9. Naseem M, Parvez S. Role of melatonin in traumatic brain injury and spinal cord injury. *The Scientific World Journal*. 2014;2014.
10. Bains M, Hall ED. Antioxidant therapies in traumatic brain and spinal cord injury. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*. 2012;1822(5):675-84.
11. Rodrigues LF, Moura-Neto V. Biomarkers in Spinal Cord Injury: from Prognosis to Treatment. *Molecular neurobiology*. 2018:1-13.
12. Yang R, Guo L, Wang P, Huang L, Tang Y, Wang W, et al. Epidemiology of spinal cord injuries and risk factors for complete injuries in Guangdong, China: a retrospective study. *PloS one*. 2014;9(1):e84733.

13. Wan Y, Yang J-S, Xu L-C, Huang X-J, Wang W, Xie M-J. Roles of Eph/ephrin bidirectional signaling during injury and recovery of the central nervous system. *Neural Regeneration Research*. 2018;13(8):1313-21.
14. Ward R, Huang W, Kostusiak M, Pallier P, Michael-Titus A, Priestley J. A characterization of white matter pathology following spinal cord compression injury in the rat. *Neuroscience*. 2014;260:227-39.
15. Busch SA, Silver J. The role of extracellular matrix in CNS regeneration. *Current opinion in neurobiology*. 2007;17(1):120-7.
16. Bunge RP. Observations on the pathology of several types of human spinal cord injury, with emphasis on the astrocyte response to penetrating injuries. *Adv Neurol*. 1997;72:305-15.
17. Dawson MR, Levine JM, Reynolds R. NG2-expressing cells in the central nervous system: are they oligodendroglial progenitors? *Journal of neuroscience research*. 2000;61(5):471-9.
18. Schnell L, Fearn S, Klassen H, Schwab ME, Perry VH. Acute inflammatory responses to mechanical lesions in the CNS: differences between brain and spinal cord. *European Journal of Neuroscience*. 1999;11(10):3648-58.
19. McGraw J, Hiebert G, Steeves J. Modulating astrogliosis after neurotrauma. *Journal of neuroscience research*. 2001;63(2):109-15.
20. Xie M, Yi C, Luo X, Xu S, Yu Z, Tang Y, et al. Glial gap junctional communication involvement in hippocampal damage after middle cerebral artery occlusion. *Annals of neurology*. 2011;70(1):121-32.
21. Faulkner JR, Herrmann JE, Woo MJ, Tansey KE, Doan NB, Sofroniew MV. Reactive astrocytes protect tissue and preserve function after spinal cord injury. *Journal of Neuroscience*. 2004;24(9):2143-55.
22. Goldshmit Y, Galea MP, Wise G, Bartlett PF, Turnley AM. Axonal regeneration and lack of astrocytic gliosis in EphA4-deficient mice. *Journal of Neuroscience*. 2004;24(45):10064-73.
23. Fernández-Klett F, Priller J. The fibrotic scar in neurological disorders. *Brain Pathology*. 2014;24(4):404-13.
24. Carlson BM. *Principles of regenerative biology*: Elsevier; 2011.
25. Goss RJ. *Principles of regeneration*: Elsevier; 2013.

26. McCusker C, Gardiner DM. The axolotl model for regeneration and aging research: a mini-review. *Gerontology*. 2011;57(6):565-71.
27. Griffiths R, Teunis B. *Newts and salamanders of Europe*: T & AD Poyser London; 1996.
28. Cogbill G. *Anatomy and the problem of behaviour*. Cambridge University Press; 1929.
29. Nieuwenhuys R. *Morphogenesis and general structure. The central nervous system of vertebrates*: Springer; 1998. p. 159-228.
30. Roberts A, Clarke J. The sensory systems of embryos of the newt: *Triturus vulgaris*. *Journal of comparative physiology*. 1983;152(4):529-34.
31. Coghill GE. Correlated anatomical and physiological studies of the growth of the nervous system of Amphibia. IV. Rates of proliferation and differentiation in the central nervous system of *Amblystoma*. *Journal of Comparative Neurology*. 1924;37(1):71-120.
32. Holtfreter J. Die totale exogastrulation, eine selbstablösung des ektoderms vom entomesoderm. *Wilhelm Roux'Archiv für Entwicklungsmechanik der Organismen*. 1933;129(4):669-793.
33. Spemann H, Mangold H. Über induktion von Embryonalanlagen durch Implantation artfremder Organisatoren. *Archiv für mikroskopische Anatomie und Entwicklungsmechanik*. 1924;100(3-4):599-638.
34. Twitty VC. *Of scientists and salamanders*. 1966.
35. Brockes JP, Kumar A. Appendage regeneration in adult vertebrates and implications for regenerative medicine. *Science*. 2005;310(5756):1919-23.
36. Simon A, Tanaka EM. *Limb regeneration*. Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology. 2013;2(2):291-300.
37. Voss SR, Epperlein HH, Tanaka EM. *Ambystoma mexicanum*, the axolotl: a versatile amphibian model for regeneration, development, and evolution studies. *Cold Spring Harbor protocols*. 2009;2009(8):pdb.emo128.
38. Yun MH. Changes in regenerative capacity through lifespan. *International journal of molecular sciences*. 2015;16(10):25392-432.

39. Tsonis PA, Fox TP. Regeneration according to Spallanzani. *Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists*. 2009;238(9):2357-63.
40. Chiba C. The retinal pigment epithelium: an important player of retinal disorders and regeneration. *Experimental eye research*. 2014;123:107-14.
41. Rio-Tsonis KD, Tsonis PA. Eye regeneration at the molecular age. *Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists*. 2003;226(2):211-24.
42. Grigorian E. The urodelean retina as a model for studying the retinal regeneration potentials of other vertebrates. *Ontogenez*. 1996;27(3):173-85.
43. Mitashov VI. Mechanisms of retina regeneration in urodeles. *International Journal of Developmental Biology*. 2004;40(4):833-44.
44. Moshiri A, Close J, Reh TA. Retinal stem cells and regeneration. *International Journal of Developmental Biology*. 2004;48(8-9):1003-14.
45. Amamoto R, Huerta VGL, Takahashi E, Dai G, Grant AK, Fu Z, et al. Adult axolotls can regenerate original neuronal diversity in response to brain injury. *eLife*. 2016;5:e13998.
46. Elewa A, Wang H, Talavera-López C, Joven A, Brito G, Kumar A, et al. Reading and editing the *Pleurodeles waltl* genome reveals novel features of tetrapod regeneration. *Nature communications*. 2017;8(1):2286.
47. Fei J-F, Schuez M, Knapp D, Taniguchi Y, Drechsel DN, Tanaka EM. Efficient gene knockin in axolotl and its use to test the role of satellite cells in limb regeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2017:201706855.
48. Joven A, Wang H, Pinheiro T, Hameed LS, Belnoue L, Simon A. Cellular basis of brain maturation and acquisition of complex behaviors in salamanders. *Development*. 2017;dev. 160051.
49. Sandoval-Guzmán T, Wang H, Khattak S, Schuez M, Roensch K, Nacu E, et al. Fundamental differences in dedifferentiation and stem cell recruitment during skeletal muscle regeneration in two salamander species. *Cell stem cell*. 2014;14(2):174-87.

50. Muñoz A, Muñoz M, González A, Ten Donkelaar H. Spinal ascending pathways in amphibians: cells of origin and main targets. *Journal of Comparative Neurology*. 1997;378(2):205-28.
51. Davis BM, Duffy MT, Simpson Jr SB. Bulbosplinal and intraspinal connections in normal and regenerated salamander spinal cord. *Experimental neurology*. 1989;103(1):41-51.
52. Harper C, Roberts A. Spinal cord neuron classes in embryos of the smooth newt *Triturus vulgaris*: a horseradish peroxidase and immunocytochemical study. *Phil Trans R Soc Lond B*. 1993;340(1291):141-60.
53. Ten Donkelaar H. *Urodeles. The central nervous system of vertebrates*: Springer; 1998. p. 1045-150.
54. Clarke J, Alexander R, Holder N. Regeneration of descending axons in the spinal cord of the axolotl. *Neuroscience letters*. 1988;89(1):1-6.
55. Chernoff EA, Sato K, Corn A, Karcavich RE, editors. *Spinal cord regeneration: intrinsic properties and emerging mechanisms. Seminars in cell & developmental biology*; 2002: Elsevier.
56. Piatt J. Regeneration of the spinal cord in the salamander. *Journal of Experimental Zoology*. 1955;129(1):177-207.
57. Stefanelli A. Some comments on regeneration in the central nervous system. *Genetic Neurology*. 1950;210.
58. Butler EG, Ward MB. Reconstitution of the spinal cord following ablation in urodele larvae. *Journal of Experimental Zoology*. 1965;160(1):47-65.
59. Butler EG, Ward MB. Reconstitution of the spinal cord after ablation in adult *Triturus*. *Developmental biology*. 1967;15(5):464-86.
60. Davis BM, Ayers JL, Koran L, Carlson J, Anderson MC, Simpson Jr SB. Time course of salamander spinal cord regeneration and recovery of swimming: HRP retrograde pathway tracing and kinematic analysis. *Experimental neurology*. 1990;108(3):198-213.
61. Cabelguen J-M, Chevallier S, Amontieva-Potapova I, Philippe C. Anatomical and electrophysiological plasticity of locomotor networks following spinal transection in the salamander. *Neuroscience bulletin*. 2013;29(4):467-76.

62. Chevallier S, Landry M, Nagy F, Cabelguen JM. Recovery of bimodal locomotion in the spinal-transected salamander, *Pleurodeles waltlii*. *European Journal of Neuroscience*. 2004;20(8):1995-2007.
63. Egar M, Singer M. The role of ependyma in spinal cord regeneration in the urodele, *Triturus*. *Experimental neurology*. 1972;37(2):422-30.
64. Nordlander RH, Singer M. The role of ependyma in regeneration of the spinal cord in the urodele amphibian tail. *Journal of Comparative Neurology*. 1978;180(2):349-73.
65. Singer M, Nordlander RH, Egar M. Axonal guidance during embryogenesis and regeneration in the spinal cord of the newt: the blueprint hypothesis of neuronal pathway patterning. *Journal of Comparative Neurology*. 1979;185(1):1-21.
66. Nordlander RH, Singer M. Morphology and position of growth cones in the developing *Xenopus* spinal cord. *Developmental Brain Research*. 1982;4(2):181-93.
67. Mchedlishvili L, Epperlein HH, Telzerow A, Tanaka EM. A clonal analysis of neural progenitors during axolotl spinal cord regeneration reveals evidence for both spatially restricted and multipotent progenitors. *Development*. 2007;134(11):2083-93.
68. Benraiss A, Arsanto J, Coulon J, Thouveny Y. Neurogenesis during caudal spinal cord regeneration in adult newts. *Development genes and evolution*. 1999;209(6):363-9.
69. Albors AR, Tanaka EM. High-efficiency electroporation of the spinal cord in larval axolotl. *Salamanders in Regeneration Research*: Springer; 2015. p. 115-25.
70. Khattak S, Murawala P, Andreas H, Kappert V, Schuez M, Sandoval-Guzmán T, et al. Optimized axolotl (*Ambystoma mexicanum*) husbandry, breeding, metamorphosis, transgenesis and tamoxifen-mediated recombination. *nature protocols*. 2014;9(3):529.
71. Farkas JE, Monaghan JR. Housing and maintenance of *Ambystoma mexicanum*, the Mexican axolotl. *Salamanders in Regeneration Research*: Springer; 2015. p. 27-46.
72. Page RB, Voss SR. Induction of metamorphosis in axolotls (*Ambystoma mexicanum*). *Cold Spring Harbor protocols*. 2009;2009(8):pdb. prot5268.

73. Voss SR, Shaffer HB. What insights into the developmental traits of urodeles does the study of interspecific hybrids provide? *International Journal of Developmental Biology*. 2004;40(4):885-93.
74. Putnam J, Parkerson Jr J. Anatomy of the heart of the *Amphibia* II. *Cryptobranchus alleganiensis*. *Herpetologica*. 1985:287-98.
75. Lopez D, Lin L, Monaghan JR, Cogle CR, Bova FJ, Maden M, et al. Mapping hematopoiesis in a fully regenerative vertebrate: the axolotl. *Blood*. 2014;blood-2013-09-526970.
76. Ching Y-C, Wedgwood RJ. Immunologic responses in the axolotl, *Siredon mexicanum*. *The Journal of Immunology*. 1967;99(1):191-200.
77. Charlemagne J. Thymus independent anti-horse erythrocyte antibody response and suppressor T cells in the Mexican axolotl (*Amphibia*, *Urodela*, *ambystoma mexicanum*). *Immunology*. 1979;36(4):643.
78. Sobkow L, Epperlein H-H, Herklotz S, Straube WL, Tanaka EM. A germline GFP transgenic axolotl and its use to track cell fate: dual origin of the fin mesenchyme during development and the fate of blood cells during regeneration. *Developmental biology*. 2006;290(2):386-97.
79. Froese JM, Smits JE, Wickstrom ML. Evaluation of two methods for measuring nonspecific immunity in tiger salamanders (*Ambystoma tigrinum*). *Journal of wildlife diseases*. 2005;41(1):209-17.
80. Godwin JW, Pinto AR, Rosenthal NA. Macrophages are required for adult salamander limb regeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2013;110(23):9415-20.
81. Seifert AW, Monaghan JR, Voss SR, Maden M. Skin regeneration in adult axolotls: a blueprint for scar-free healing in vertebrates. *PloS one*. 2012;7(4):e32875.
82. Francis ETB. *The anatomy of the salamander*: At the Clarendon Press; 1934.
83. Armstrong JB, Malacinski GM. *Developmental biology of the axolotl*: Oxford University Press; 1989.
84. Monaghan JR, Stier AC, Michonneau F, Smith MD, Pasch B, Maden M, et al. Experimentally induced metamorphosis in axolotls reduces regenerative rate and fidelity. *Regeneration*. 2014;1(1):2-14.

85. Kirsche K, Kirsche W. REGENERATIVE processes in the telencephalon of *Ambystoma mexicanum*. *Journal fur Hirnforschung*. 1964;7:421.
86. Richter W. Regenerative processes following removal of the caudal sector of the telencephalon including the telencephalo-diencephalic border region in *Ambystoma mexicanum*. *Journal fur Hirnforschung*. 1968;10(6):515.
87. Maden M, Manwell LA, Ormerod BK. Proliferation zones in the axolotl brain and regeneration of the telencephalon. *Neural development*. 2013;8(1):1.
88. Parish CL, Beljajeva A, Arenas E, Simon A. Midbrain dopaminergic neurogenesis and behavioural recovery in a salamander lesion-induced regeneration model. *Development*. 2007;134(15):2881-7.
89. Okamoto M, Ohsawa H, Hayashi T, Owaribe K, Tsonis PA. Regeneration of retinotectal projections after optic tectum removal in adult newts. *Molecular vision*. 2007;13.
90. Li B, Dewey CN. RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. *BMC bioinformatics*. 2011;12(1):323.
91. Mi H, Muruganujan A, Casagrande JT, Thomas PD. Large-scale gene function analysis with the PANTHER classification system. *Nature protocols*. 2013;8(8):1551.
92. Szklarczyk D, Morris JH, Cook H, Kuhn M, Wyder S, Simonovic M, et al. The STRING database in 2017: quality-controlled protein–protein association networks, made broadly accessible. *Nucleic acids research*. 2016:gkw937.
93. Thuret S, Moon LD, Gage FH. Therapeutic interventions after spinal cord injury. *Nature Reviews Neuroscience*. 2006;7(8):628.
94. Bloom O. Non-mammalian model systems for studying neuro-immune interactions after spinal cord injury. *Experimental neurology*. 2014;258:130-40.
95. Satoh A, Mitogawa K, Makanae A. Regeneration inducers in limb regeneration. *Development, growth & differentiation*. 2015;57(6):421-9.
96. Kragl M, Knapp D, Nacu E, Khattak S, Schnapp E, Epperlein H-H, et al., editors. Novel insights into the flexibility of cell and positional identity during urodele limb regeneration. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*; 2008: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
97. Mortazavi A, Williams BA, McCue K, Schaeffer L, Wold B. Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *Nature methods*. 2008;5(7):621.

98. Caballero-Pérez J, Espinal-Centeno A, Falcon F, García-Ortega LF, Curiel-Quesada E, Cruz-Hernández A, et al. Transcriptional landscapes of Axolotl (*Ambystoma mexicanum*). *Developmental biology*. 2018;433(2):227-39.
99. Demircan T, Keskin I, Dumlu SN, Aytürk N, Avşaroğlu ME, Akgün E, et al. Detailed tail proteomic analysis of axolotl (*Ambystoma mexicanum*) using an mRNA-seq reference database. *Proteomics*. 2017;17(1-2):1600338.
100. Gaudet P, Livstone MS, Lewis SE, Thomas PD. Phylogenetic-based propagation of functional annotations within the Gene Ontology consortium. *Briefings in bioinformatics*. 2011;12(5):449-62.
101. Shotland Y, Krämer H, Groisman EA. The Salmonella SpiC protein targets the mammalian Hook3 protein function to alter cellular trafficking. *Molecular microbiology*. 2003;49(6):1565-76.
102. Nishiyama H, Itoh K, Kaneko Y, Kishishita M, Yoshida O, Fujita J. A glycine-rich RNA-binding protein mediating cold-inducible suppression of mammalian cell growth. *The Journal of cell biology*. 1997;137(4):899-908.
103. Jensen ED, Niu L, Caretti G, Nicol SM, Teplyuk N, Stein GS, et al. p68 (Ddx5) interacts with Runx2 and regulates osteoblast differentiation. *Journal of cellular biochemistry*. 2008;103(5):1438-51.
104. King MW, Nguyen T, Calley J, Harty MW, Muzinich MC, Mescher AL, et al. Identification of genes expressed during *Xenopus laevis* limb regeneration by using subtractive hybridization. *Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists*. 2003;226(2):398-409.
105. Endo T, Bryant SV, Gardiner DM. A stepwise model system for limb regeneration. *Developmental biology*. 2004;270(1):135-45.
106. Ono R, Kobayashi S, Wagatsuma H, Aisaka K, Kohda T, Kaneko-Ishino T, et al. A retrotransposon-derived gene, PEG10, is a novel imprinted gene located on human chromosome 7q21. *Genomics*. 2001;73(2):232-7.
107. Youngson NA, Kocialkowski S, Peel N, Ferguson-Smith AC. A small family of sushi-class retrotransposon-derived genes in mammals and their relation to genomic imprinting. *Journal of molecular evolution*. 2005;61(4):481-90.
108. Clark MB, Jänicke M, Gottesbühren U, Kleffmann T, Legge M, Poole ES, et al. Mammalian gene PEG10 expresses two reading frames by high efficiency—1

frameshifting in embryonic-associated tissues. *Journal of Biological Chemistry*. 2007;282(52):37359-69.

109. Ono R, Nakamura K, Inoue K, Naruse M, Usami T, Wakisaka-Saito N, et al. Deletion of Peg10, an imprinted gene acquired from a retrotransposon, causes early embryonic lethality. *Nature genetics*. 2006;38(1):101.

110. Hishida T, Naito K, Osada S, Nishizuka M, Imagawa M. peg10, an imprinted gene, plays a crucial role in adipocyte differentiation. *FEBS letters*. 2007;581(22):4272-8.

111. Okabe H, Satoh S, Furukawa Y, Kato T, Hasegawa S, Nakajima Y, et al. Involvement of PEG10 in human hepatocellular carcinogenesis through interaction with SIAH1. *Cancer research*. 2003;63(12):3043-8.

112. Xie T, Pan S, Zheng H, Luo Z, Tembo KM, Jamal M, et al. PEG10 as an oncogene: expression regulatory mechanisms and role in tumor progression. *Cancer cell international*. 2018;18(1):112.

113. Reinartz A, Ehling J, Franz S, Simon V, Bravo IG, Tessmer C, et al. Small intestinal mucosa expression of putative chaperone fls485. *BMC gastroenterology*. 2010;10(1):27.

114. Xiong F, Ji Z, Liu Y, Zhang Y, Hu L, Yang Q, et al. Mutation in SSUH2 Causes Autosomal-Dominant Dentin Dysplasia Type I. *Human mutation*. 2017;38(1):95-104.

115. Cheng J, Zhu Y, He S, Lu Y, Chen J, Han B, et al. Functional mutation of SMAC/DIABLO, encoding a mitochondrial proapoptotic protein, causes human progressive hearing loss DFNA64. *The American Journal of Human Genetics*. 2011;89(1):56-66.

116. Bloch-Zupan A, Jamet X, Etard C, Laugel V, Muller J, Geoffroy V, et al. Homozygosity mapping and candidate prioritization identify mutations, missed by whole-exome sequencing, in SMOC2, causing major dental developmental defects. *The American Journal of Human Genetics*. 2011;89(6):773-81.

117. Hardy DM, Garbers DL. Species-specific binding of sperm proteins to the extracellular matrix (zona pellucida) of the egg. *Journal of Biological Chemistry*. 1994;269(29):19000-4.

118. Glöckner G, Scherer S, Schattevoy R, Borigt A, Weber J, Tsui L-C, et al. Large-scale sequencing of two regions in human chromosome 7q22: analysis of 650

kb of genomic sequence around the EPO and CUTL1 loci reveals 17 genes. *Genome research*. 1998;8(10):1060-73.

119. Gao Z, Harumi T, Garbers DL. Chromosome localization of the mouse zonadhesin gene and the human zonadhesin gene (ZAN). *Genomics*. 1997;41(1):119-22.

120. Gao Z, Garbers DL. Species diversity in the structure of zonadhesin, a sperm-specific membrane protein containing multiple cell adhesion molecule-like domains. *Journal of Biological Chemistry*. 1998;273(6):3415-21.

121. Lea IA, Sivashanmugam P, O'Rand MG. Zonadhesin: characterization, localization, and zona pellucida binding. *Biology of reproduction*. 2001;65(6):1691-700.

122. Husmann I, Soulet L, Gautron J, Martelly I, Barritault D. Growth factors in skeletal muscle regeneration. *Cytokine & growth factor reviews*. 1996;7(3):249-58.

123. Galperin MY. Conserved 'hypothetical' proteins: new hints and new puzzles. *International Journal of Genomics*. 2001;2(1):14-8.

124. Amara SG, Fontana AC. Excitatory amino acid transporters: keeping up with glutamate. *Neurochemistry international*. 2002;41(5):313-8.

125. Kilberg M, Pan Y-X, Chen H, Leung-Pineda V. Nutritional control of gene expression: how mammalian cells respond to amino acid limitation. *Annu Rev Nutr*. 2005;25:59-85.

126. Hundal HS, Taylor PM. Amino acid transceptors: gate keepers of nutrient exchange and regulators of nutrient signaling. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*. 2009;296(4):E603-E13.

127. Hellsten SV, Hägglund MG, Eriksson MM, Fredriksson R. The neuronal and astrocytic protein SLC 38A10 transports glutamine, glutamate, and aspartate, suggesting a role in neurotransmission. *FEBS open bio*. 2017;7(6):730-46.

128. Frederickson CJ, Suh SW, Silva D, Frederickson CJ, Thompson RB. Importance of zinc in the central nervous system: the zinc-containing neuron. *The Journal of nutrition*. 2000;130(5):1471S-83S.

129. Heizmann CW, Fritz G, Schafer B. S100 proteins: structure, functions and pathology. *Front Biosci*. 2002;7(1):1356-68.

130. Marenholz I, Heizmann CW, Fritz G. S100 proteins in mouse and man: from evolution to function and pathology (including an update of the nomenclature). *Biochemical and biophysical research communications*. 2004;322(4):1111-22.
131. Brösicke N, Faissner A. Role of tenascins in the ECM of gliomas. *Cell adhesion & migration*. 2015;9(1-2):131-40.
132. Nimni ME, editor *Collagen: structure, function, and metabolism in normal and fibrotic tissues*. Seminars in arthritis and rheumatism; 1983: Elsevier.
133. Hou C, Zhao H, Liu L, Li W, Zhou X, Lv Y, et al. High mobility group protein B1 (HMGB1) in Asthma: comparison of patients with chronic obstructive pulmonary disease and healthy controls. *Molecular medicine*. 2011;17(7-8):807.
134. Feng Y, Walsh CA. The many faces of filamin: a versatile molecular scaffold for cell motility and signalling. *Nature cell biology*. 2004;6(11):1034.

MEDİPOL UNV ÜNİVERSİTESİ	T.C. İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU BAŞKANLIĞI	 E-İmza
---	---	--

Sayı : 38828770-604.01.01-E.2303 Konu : Etik Kurulu Kararı	12/02/2016
---	------------

Sayın Yrd. Doç. Dr. Turan Demircan

Üniversitemizin Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kuruluna yapmış olduğumuz "Axolotl'da Kuyruk Rejenerasyonu Sağlayan Moleküler Mekanizmaların Yeni Nesil RNA Dizileme ve Proteomik Yöntemleri ile Tanımlanması" isimli başvurusuz incelenmiş olup, etik kurulu kararı ekte sunulmuştur.

Bilgilerinize rica ederim.

Doç. Dr. Haneli ÖZBEK
 Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu
 (İMÜ-HADYEK) Başkanı

EK:
 -Karar Formu (1 sayfa)

Bu belge 5070 sayılı e-İmza Kanununa göre Doç. Dr. Haneli ÖZBEK tarafından 12.02.2016 tarihinde e-imzalanmıştır.
 Doğrulama linki: <http://ebys.medipol.edu.tr/e-imza/confirmant/CodeDocumentViewer.aspx> linkinden
 5B5E14CX0 kodu ile doğrulayabilirsiniz.



T.C.

İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ,
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU (İMÜ-HADYEK)
ETİK KURULU KARARI

Toplantı Tarihi	Karar No	İlgi	Proje Yürütücüsü
10/02/2016	18		Yrd. Doç. Dr. Tuza Demiroan

"Axolotl'da Kuyruk Rejenerasyonu Sağlayan Moleküler Mekanizmaların Yeni Nesil RNA Dizileme ve Proteomika Yöntemleri ile Tanımlanması" başlıklı bilimsel araştırma Etik Kurulumuzda görüşülmüş olup, çalışmanın etik kurallara uygun olduğuna "oybirliği" ile karar verilmiştir.

Etik Onay Geçerlilik Süresi: 12 ay

GÖREVİ	ADI SOYADI	İMZA
Başkan	Doç. Dr. Haneî ÖZBEK	
Üye	Prof. Dr. Ökan KILIÇ	
Üye	Prof. Dr. Mustafa ÖZTÜRK	
Üye	Yrd. Doç. Dr. H. Emre YÜZBAŞIOĞLU	
Üye	Yrd. Doç. Dr. Sina Özmen TOĞAY	
Üye	Yrd. Doç. Dr. Mehmet Yalçın GÜNAL	
Üye	Taha KELEŞTEMUR	
Üye	Özge Şeyda DURGUT	
Üye	Fahriye ŞENBAHÇE	

11 ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Harbiye	Soyadı	HACİBEKTAŞOĞLU
Doğum Yeri	HAYRAT	Doğum Tarihi	15/06/1992
Uyruğu	TC	TC Kimlik No	
E-mail	harbiyehbo@gmail.com	Tel	

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Doktora/Uzmanlık		
Yüksek Lisans		
Lisans	Kültür Üniversitesi	2015
Lise	Erenköy Kız Lisesi	2010

İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre
Bursiyer	İstanbul Medipol Üniversitesi, TÜBİTAK Proje No:315S027	1 yıl

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*
İngilizce	iyi	orta	orta

Yabancı Dil Sınav Notu

YDS	
ALES	

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma Becerisi
Windows Office	İyi

