T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DESMA VE DESMB KNOCKOUT ZEBRA BALIĞI MODELLERİNDE DESMİN İFADESİNİN İNCELENMESİ

Cansu KOYUNLAR

Tıbbi Biyoloji Programı

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Ankara

2017

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DESMA VE DESMB KNOCKOUT ZEBRA BALIĞI MODELLERİNDE DESMİN İFADESİNİN İNCELENMESİ

Cansu KOYUNLAR

Tıbbi Biyoloji Programı

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Pervin DİNÇER

Ankara

2017

ONAY SAYFASI

DESMA VE DESMB KNOCKOUT ZEBRA BALIĞI MODELLERİNDE DESMİN İFADESİNİN İNCELENMESİ

Cansu Koyunlar

Bu çalışma 27.02.2017 tarihinde jürimiz tarafından "Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Tezli Yüksek Lisans Programı" nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı:	***Doç. Dr. Özlen Konu*** *Bilkent Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik AD*	*(imza)*
Tez Danışmanı:	*Prof. Dr. Pervin Dinçer* *Hacettepe Üniversitesi Tıbbi Biyoloji AD*	*(imza)*
Üye:	*Prof. Dr. Çetin Kocaefe* *Hacettepe Üniversitesi Tıbbi Biyoloji AD*	*(imza)*
Üye:	*Yrd. Doç. Dr. Burcu Hayta* *Hacettepe Üniversitesi Tıbbi Biyoloji AD*	*(imza)*
Üye:	*Yrd. Doç. Dr. Ekim Taşkıran* *Hacettepe Üniversitesi Tıbbi Genetik AD*	*(imza)*

ONAY

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun bulunmuş ve Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu kararıyla onaylanmıştır.

(imza)

Prof. Dr. Diclehan Orhan

Enstitü Müdürü

YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

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

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

o **Tezimin tamamı dünya çapında erişime açılabilir ve bir kısmı veya tamamının fotokopisi alınabilir.**

o **Tezimin 13/03/2019 tarihine kadar erişime açılmasını ve fotokopi alınmasını (İç Kapak, Özet, İçindekiler ve Kaynakça hariç) istemiyorum.**

o **Tezimin …….. tarihine kadar erişime açılmasını istemiyorum ancak kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı veya tamamının fotokopisinin alınmasını onaylıyorum.**

o **Serbest Seçenek/Yazarın Seçimi**

13/03/2017

Cansu KOYUNLAR

ETİK BEYAN

Bu çalışmadaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurullar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında özgül olduğunu, Prof. Dr. Pervin DİNÇER danışmanlığında tarafımdan üretildiğini ve Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Yönergesine göre yazıldığını beyan ederim.

Cansu KOYUNLAR

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca bana yol gösteren, sevgisini esirgemeyen ve destek olan değerli hocam ve danışmanım Prof. Dr. Pervin Dinçer'e, tez çalışmama değerli katkılarda bulunan jüri üyeleri Prof. Dr. Çetin Kocaefe, Doç. Dr. Özlen Konu, Yrd. Doç. Dr. Burcu Hayta'ya, bilimsel düşünmeyi, sevgi ve saygıyı bana öğreten ve hayatımda bana yol göstererek bu günlere gelmemi sağlayan değerli hocam ve ağabeyim Yrd. Doç. Dr. Ekim Taşkıran'a sonsuz teşekkür ederim.

Hayatım boyunca bana kattıkları her şey için ve olduğum kişi olmamı sağladıkları için başta annem, babam ve ağabeyim olmak üzere tüm aileme ve dostlarıma, sevgi ve anlayışını esirgemeden bana destek olan Şeref Ferikoğlu'na bütün içtenliğimle teşekkür ederim.

ÖZET

Koyunlar, C. *desma* ve *desmb Knockout* Zebra Balığı Modellerinde Desmin İfadesinin İncelenmesi. Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Programı Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 2017. Kas dokusuna özgül temel ara filament proteini olan desmin, miyofibrillerin çekirdek, sarkolemma ve hücre içi organellerle bağlantılarını sağlayan geniş bir ağ yapısı oluşturarak, kas kasılması ve gevşemesi sırasında güç aktarımını kolaylaştırmaktadır. Desmin geni (*DES*) ile ilişkili hastalıkların altında yatan patofizyolojinin anlaşılması için kullanılan hayvan modellerinde, ortolog genlerin ifade olduğu dokuların analiz edilmesi gerekmektedir. Kas hastalıklarını modellemede birçok avantajı bulunan zebra balığında, *DES* ortoloğu iki homolog gen (*desma* ve *desmb*) bulunmaktadır. Grubumuz tarafından, yabanıl tip AB zebra balıklarında *in sitü* hibridizasyon deneyleri ile gerçekleştirilen ön çalışmalarda, desma ve desmb transkriptlerinin döllenmeden sonra 70. saate kadar benzer iskelet kası yerleşimi gösterdiği; ancak 70. saatten sonra, *desma* ağırlıklı olarak iskelet kasında ifade olurken, *desmb*'nin çoğunlukla düz kasta ifade edildiği gözlenmiştir. Tez çalışmasında, *desma* ve *desmb*'nin mRNA ve protein ifadelerinin, yabanıl tip AB, *desma KO* (-/-) ve *desmb KO* (-/-) zebra balıklarında karşılaştırılarak araştırılması amaçlanmıştır. Kantitatif gerçek zamanlı PZR çalışmasında, yabanıl tip AB balıklara göre, *desma KO* (-/-) balıklarda *desma* mRNA ifadesinin %99 ve *desmb KO* (-/-) balıklarda *desmb* mRNA ifadesinin %98 oranında göreceli olarak azaldığı bulunmuştur. Gerçekleştirilen tüm örnek *in sitü* hibridizasyon ve tüm örnek immünfloresan boyama çalışmalarında, *desmb KO* (-/-) zebra balıklarında *desma*'nın, iskelet kası ve kalp kasının yanında, bağırsakta da ifade olduğu saptanmıştır. Ancak, *desma KO (-/-)* balıklarda, *desmb*'nin 70. saatten itibaren çoğunlukla düz kasta ifade olduğu ve *desma* yokluğunda iskelet kasında ifade olmadığı gözlenmiştir.

Anahtar kelimeler: Desmin, zebra balığı, *desma, desmb, knockout, in sitü* hibridizasyon, immünfloresan boyama.

Destekleyen kurum: TÜBİTAK, Proje 214S174.

ABSTRACT

Koyunlar, C. Examination of Desmin Expression on *desma* and *desmb* Knockout Zebrafish Models. Hacettepe University Institute of Health Sciences, Master of Science Thesis in Medical Biology, Ankara, 2017. Desmin, a basic intermediate filament protein specific to muscle tissue, facilitates the transmission of force during muscle contraction and relaxation by forming a large network structure that allows the myofibrils to connect to the nucleus, sarcolemma and intracellular organelles. In animal models used to understand the underlying pathophysiology of *DES*-related diseases, it is necessary to analyze tissues in which orthologous genes are expressed. In the zebrafish, which has many advantages in modeling muscle diseases, there are two *DES* orthologous gene (*desma* and *desmb*). In our preliminary studies conducted by our group with *in situ* hybridization experiments in wild-type AB zebrafish, it has been shown that the *desma* and *desmb* transcripts have similar skeletal muscle expression pattern until 70th hour after fertilization; but after 70 hours, it was observed that the *desma* was expressed predominantly in skeletal muscle, while *desmb* was expressed highly in the smooth muscle. In the thesis study, it was aimed to investigate mRNA and protein expressions of *desma* and *desmb* in wild type AB, *desma* KO (-/-) and *desmb* KO (-/-) zebrafish embriyos. In the quantitative real-time PCR study, 99% of *desma* mRNA expression in *desma* KO (-/-) fishes and 98% of *desmb* mRNA expression in *desmb* KO (-/-) fishes were found to decrease relative to wild type AB fish. Whole-mount *in situ* hybridization and whole-mount immunofluorescence staining studies have shown that *desma* in *desmb* KO (-/-) zebrafish is also expressed in the gut, additional to skeletal and cardiac muscle. However, it was observed that in the *desma* KO (-/-) fish, the *desmb* was mostly expressed in smooth muscle from the 70th hour after fertilization and that no expression occurs in skeletal muscle in the absence of *desma*.

Keywords: Desmin, zebrafish, *desma*, *desmb*, *in situ* hybridization, immunflorescent staining.

Supporting Institution: TÜBİTAK, Project 214S174.

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI iii
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI iv
ETİK BEYAN v
TEŞEKKÜR vi
ÖZET vii
ABSTRACT viii
İÇİNDEKİLER ix
SİMGELER VE KISALTMALAR xii
ŞEKİLLER xiii
TABLOLAR xvi
1. GİRİŞ 1
1.1. İskelet Kası İşlevi ve Hastalıkları 1
1.2. Desmin ve Desminopatiler 1
1.3. Zebra Balığı ve Desmin 2
1.4. Amaç ve Kapsam 3
2. GENEL BİLGİLER 4
2.1. İskelet Kası Yapısı 4
2.2. Sarkomerik Hücre İskeleti 5
2.2.1. İskelet Kası Ara Filament Proteinleri 6
2.3. Desmin 7
2.3.1. Desminopatiler 9
2.4. Zebra Balığı (*Danio rerio*) 10
2.4.1. Zebra Balığında İskelet Kası Yapısı 11
2.4.2. Zebra Balığında İskelet Kası Hastalıklarının Modellenmesi 12
2.4.3. Zebra Balığında Desmin 13
3. GEREÇ ve YÖNTEM 15
3.1. Zebra Balıkları ve Gereçler 15
3.1.1. Çalışmada İncelenen Zebra Balıkları 15
3.1.2. Zebra Balıklarının Bakımı ve İdamesi 16
3.1.3. DNA İzolasyonu 17

3.1.4. Primer Dizilerinin Tasarlanması 17
3.1.5. Polimeraz Zincir Reaksiyonu 17
3.1.6. DNA Agaroz Jel Elektroforezi 18
3.1.7. DNA Dizi Analizi 18
3.1.8. Zebra Balığı Embriyolarının Fiksasyonu 19
3.1.9. Total RNA İzolasyonu 19
3.1.10. cDNA Sentezi 19
3.1.11. Prob Sentezi 19
3.1.12. Tüm Örnek *İn Sitü* Hibridizasyon ve Dondurulmuş Kesitler 21
3.1.13. Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu 23
3.1.14. Tüm Örnek İmmünfloresan Boyama 23
3.2. Yöntemler 24
3.2.1. Zebra Balıklarının Bakımı ve İdamesi 24
3.2.2. Zebra Balığı Kuyruk Dokusundan DNA İzolasyonu 24
3.2.3 *desma* ve *desmb* İçin Yapılan PZR ve DNA Dizi Analizi Çalışmaları 25
3.2.4. Zebra Balığı Embriyolarının Fiksasyonu 29
3.2.5. Zebra Balığı Embriyolarından Total RNA İzolasyonu 30
3.2.6 cDNA Sentezi 32
3.2.7. *İn Sitü* Hibridizasyon Çalışmaları İçin Prob Sentezi 33
3.2.8 Tüm Örnek *İn Sitü* Hibridizasyon ve Dondurulmuş Kesitler 36
3.2.9. Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu 39
3.2.10. Tüm Örnek İmmünfloresan Boyama 41
4. BULGULAR 43
4.1. DNA Dizi Analizi ile *desma KO* (-/-) ve *desmb KO* (-/-) Zebra Balıklarının Belirlenmesi 43
4.2. *desma* ve *desmb* İfadesinin Kantitatif Gerçek Zamanlı PZR ile Analizi 48
4.3. Zebra Balığı Embriyolarında Tüm Örnek ve Dondurulmuş Kesitlerde *İn Sitü* Hibridizasyon 53
4.4. Zebra Balığı Embriyolarında Tüm Örnek İmmünfloresan Boyama 61
5. TARTIŞMA 65
6. SONUÇ ve ÖNERİLER 75
6.1. Sonuç 75
6.2.Öneriler 76

7. KAYNAKLAR 77

8. EKLER

EK 1: Tez Çalışması ile İlgili Etik Kurul İzni.

EK 2: Vimentin İfadesinin kGZ-PZR Çalışması İle Analizi.

EK 3: Erişkin Zebra Balıklarının Kas Dokusundan Alınan Kesitlerde Gerçekleştirilen Hematoksilen Eozin Boyaması.

9. ÖZGEÇMİŞ

SİMGELER VE KISALTMALAR

BCIP	*5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate*
BSA	*Bovine Serum Albumin*
$CaCl_2.2H_20$	Kalsiyum Klorür Dihidrat
DAPI	*4',6-diamidino-2-phenylindole*
DEPC	*Diethylpyrocarbonate*
DTT	*Dithiothreitol*
EDTA	*Ethylenediaminetetraacetic acid*
KCl	Potasyum Klorür
kDA	Kilo Dalton
kGZ-PZR	Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
KO	*Knockout*
M	Molar
ml	Mililitre
mM	Minimolar
$MgCl_2$	Magnezyum Klorür
$MgCl_2.6H_20$	Magnezyum Klorür Hekzahidrat
NaCl	Sodyum Klorür
NaN_3	Sodyum azit
Na_2EDTA	Disoydum *Ethylenediaminetetraacetic acid*
NaOH	Sodyum Hidroksit
NBT	*Nitro Blue Tetrazolium Chloride*
PBS	*Phosphate Buffered Saline*
PFA	Paraformaldehit
PTU	*N-Pheniylthiourea*
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SSC	*Saline Sodium Citrate*
g	*Gravity*
L	Litre
µl	Mikrolitre
^oC	Derece Santigrad

ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
2.1. İskelet kası yapısının şematik görüntüsü.	6
2.2. Desmin proteininin şematik görüntüsü.	9
2.3. Desmin ara filament proteininin hücre içerisinde oluşturduğu ağ yapısının şematik görüntüsü.	10
2.4. Zebra balığı gövdesinden alınan transversal kesit görüntüsünün şematik gösterimi.	13
2.5. İnsan ve zebra balığı arasında, desmin proteininin aminoasit dizilerinin şematik karşılaştırması.	15
3.1. *KO* balıkları elde etmek için izlenen iş akışı.	17
4.1. Saflaştırılmış *desma* PZR ürünlerinin (209 bç) %3'lük agaroz jel elektroforezi görüntüsü.	45
4.2. Saflaştırılmış *desmb* PZR ürünlerinin (458 bç) %3'lük agaroz jel elektroforezi görüntüsü.	45
4.3. *desma KO*-F2 jenerasyonundaki zebra balıklarında, *desma* ekson 1 bölgesine ait kromatogram görüntüleri.	46
4.4. *desmb KO*-F2 jenerasyonundaki zebra balıklarında, *desmb* ekson 1 bölgesine ait kromatogram görüntüleri.	47
4.5. Yabanıl tip desma protein dizisi ve *desma KO* (-/-) zebra balıklarında p.Arg45Met*50 mutasyonu sonucu oluşan desma protein dizisi.	48
4.6. Yabanıl tip desmb protein dizisi ve *desmb KO* (-/-) zebra balıklarında p.Ser82Trp*86 mutasyonu sonucu oluşan desmb protein dizisi.	48
4.7. Yabanıl tip AB, *desma KO* (-/-) ve *desmb KO* (-/-) zebra balıklarında, *actb1*'in mRNA ifade düzeyinin analizi.	50

4.8. Yabanıl tip AB, *desma KO* (-/-) ve *desmb KO* (-/-) zebra balıklarında, *desma*'nın mRNA ifade düzeyinin analizi. 51

4.9. Yabanıl tip AB, *desma KO* (-/-) ve *desmb KO* (-/-) zebra balıklarında, *desmb*'nin mRNA ifade düzeyinin analizi. 52

4.10. Kantitatif gerçek zamanlı PZR çalışması ile hesaplanan desma transkriptinin göreceli konsantrasyonu. 53

4.11. Kantitatif gerçek zamanlı PZR çalışması ile hesaplanan desmb transkriptinin göreceli konsantrasyonu. 53

4.12. *İn sitü* hibridizasyon çalışmasında kullanılan saflaştırılmış probların %1'lik agaroz jel görüntüsü. 54

4.13. Yabanıl tip AB ve *desmb KO* (-/-) zebra balıklarda 24, 48, 72 ve 96. saatlerde desma *antisense* probu ile yapılan işaretlemelerde boyanan kas grupları gösterilmiştir. 55

4.14. Yabanıl tip AB ve *desmb KO* (-/-) zebra balıklarda 120. saatte desma *antisense* probu ile yapılan işaretlemelerde boyanan kas grupları gösterilmiştir. 56

4.15. Yabanıl tip AB ve *desma KO* (-/-) zebra balıklarda 24, 48, 72 ve 96. saatlerde desmb *antisense* probu ile yapılan işaretlemelerde boyanan kas grupları gösterilmiştir. 57

4.16. Yabanıl tip AB ve *desma KO* (-/-) zebra balıklarda 120. saatte desmb *antisense* probu ile yapılan işaretlemeler. 58

4.17. *desma KO* (-/-) balıklarda desma *antisense* ve *desmb KO* (-/-) balıklarda desmb *antisense* probu ile yapılan işaretlemeler. 58

4.18. desma *sense* ve desmb *sense* probları ile 24, 48, 72, 96 ve 120. saatlerde yapılan işaretlemeler (negatif kontroller). 59

4.19. Tüm örnek *in sitü* hibridizasyon çalışması sonrasında, 96 ve 120. saatlerde elde edilen dondurulmuş kesit görüntüleri. 60

4.20. Döllenmeden sonra 96. saatte, yabanıl tip AB, *desma KO* (-/-) ve *desmb KO* (-/-) zebra balıklarının desmin antikoru ve DAPI çekirdek boyası ile tüm örnek immünfloresan boyama görüntüleri. 62

4.21. Desmin antikoru kullanılarak döllenmeden sonra 96. saatte gerçekleştirilen tüm örnek immünfloresan boyamayı takiben lazer taramalı konfokal mikroskop ile çekilmiş kesit görüntüleri. 63

4.22. Tüm örnek immünfloresan boyama deneyi sonucunda bağırsak ve somitlerde gözlenen boyanma. 64

TABLOLAR

Tablo **Sayfa**

3.1. *desma* 1. ekson ve *desmb* 1. ekson için tasarlanan *forward* ve *reverse* primer dizileri. 26

3.2. Desma ve desmb mRNAlarına özgül probların (*antisense* ve *sense*) sentezinde kullanılan primer dizileri. 34

3.3. *desma*, *desmb* ve *actb1* genleri için tasarlanan *forward* ve *reverse* primer dizileri. 41

4.1. Kuyruk dokusundan izole edilen DNA'ların nanospektrofotometrik ölçüm değerleri. 44

4.2. Saflaştırılmış *desma* PZR ve *desmb* PZR ürünlerinin nanospektrofotometrik ölçüm değerleri. 45

4.3. RNA izolasyonu sonrasında, örneklerin nanospektrofotometrik ölçüm değerleri. 49

1. GİRİŞ

1.1 İskelet Kası İşlevi ve Hastalıkları

Kas dokusu, tüm omurgalı canlıların yaşamlarını sürdürebilmesi için gerekli temel doku tiplerinden biridir. Düz kas, kalp kası ve iskelet kası olmak üzere üç temel kas dokusu tipinin vücutta özelleşmiş görevleri bulunmaktadır. Düz kas, kan damarları ve bağırsak gibi yapıların ve organların kasılmasını sağlar. Kalp kası, kalbin kasılması ve kan pompalanması işlevlerinden sorumludur (1). Vücuttaki en dinamik ve esnek doku tiplerinden biri olan iskelet kasının görevi ise kimyasal enerjiyi mekanik enerjiye çevirerek vücudun duruş ve hareketini sağlamaktır. İskelet kası vücutta aminoasit ve karbohidrat gibi temel yapı taşları için depo görevi üstlenmektedir. Bunun yanında, bazal enerji metabolizmasına katkıda bulunarak homeostasi için gerekli ısıyı sağlanmaktadır. Ayrıca, hareket sırasında kullanılan oksijen ve yakıtın sağlanmasında rol oynamaktadır (2).

İskelet kası hastalıkları, nöronların ve mitokondri, sarkoplazmik retikulum, çekirdek gibi hücre içi elemanların yapısında meydana gelen bozukluklarla ortaya çıkan, heterojen bir hastalık grubudur (3, 4). Hastalar, çoğunlukla günlük hayatlarını sürdürmekte zorluk yaşamakta ya da erken yaşta ölmektedir. İskelet kası hastalıkları genellikle kas yapısındaki temel kasılabilir proteinleri, hücre iskeleti proteinlerini ve kasılmayı düzenleyen proteinleri sentezleyen genlerde meydana gelen mutasyonlar sonucu oluşan, yetersiz sayıda veya bozuk yapıdaki proteinlerle ilişkilendirilmektedir. İskelet kası hastalıklarının prevalansı ve insidansı, hastalığın tipine ve coğrafi bölgeye göre çeşitlilik göstermektedir; dünya genelinde insidansı 63/1.000.000, prevalansı %14 olarak bilinmektedir (5). Günümüzde çoğu iskelet kası hastalığı için uygun tedavi yöntemi bulunmamaktadır.

1.2 Desmin ve Desminopatiler

Desmin, kas dokularına özgül tip III sınıfı ara filament proteinidir ve tüm kas tiplerinde (iskelet kası, düz kas ve kalp kası) ifade olmaktadır (6). Embriyonik gelişim sırasında meydana gelen kas farklılaşmasının erken dönem belirteçlerinden biridir (7). Olgun iskelet kası hücresinde, en yoğun olarak da Z-disklerinde

bulunarak, miyofibril yapıları arasındaki bağlantıyı sağlamaktadır. Z-disklerini, çekirdek membranına, mitokondriye, sarkoplazmik retikuluma, T-tübüllere ve sarkolemmaya bağlayarak üç boyutlu bir ağ yapısı oluşturmaktadır (8-10). Diğer ara filament proteinleriyle birlikte oluşturduğu bu ağ yapısı, kas hücresinin kasılması ve gevşemesi sırasında hücresel bütünlüğün korunmasını sağlayarak güç aktarımını kolaylaştırmaktadır (11, 12). İnsan desmin proteini, 2q35‘de yerleşim gösteren ve tek kopya olarak bulunan desmin geni (*DES*) tarafından kodlanmaktadır.

DES’de ya da desmin proteininin post transkripsiyonel modifikasyonunda görevli proteinleri sentezleyen genlerde meydana gelen mutasyonlar, heterofilament ağın bozulması ve hücre içi agregat oluşumu ile gözlenen miyopatilere ve kardiyomiyopatilere neden olmaktadır. Bu hastalıklar desmin ilişkili miyopatiler, kardiyomiyopatiler ya da desminopatiler olarak isimlendirilmektedir (13). Desminopatiler, genetik olarak heterojenite gösteren ve geniş spektrumlu klinik bulguları olan miyofibriler miyopatilerin bir alt grubudur (14). Bu hastalıkların prevalansı ve insidansı kesin olarak bilinmemekle birlikte, 5/10.000’den daha az etkilenmiş birey oranı ile nadir hastalıklar grubunda incelenmektedir (15).

1.3 Zebra Balığı ve Desmin

Zebra balığı (*Danio rerio*), son yıllarda embriyonik gelişim sürecinin ve çeşitli hastalıkların çalışılmasında sıklıkla tercih edilen hayvan model sistemlerinden biri olan, tropikal bir balık türüdür. Zebra balığı kas yapısı memeli kasına, gen ifade profili ve histolojik yapı bakımından yüksek benzerlik göstermektedir. Bunun yanında, döllenmeden 24 saat sonra motor davranışların başlaması ve vücudunda en büyük alanı iskelet kasının kaplaması, zebra balığında kas hastalıklarının modellenmesini avantajlı kılmaktadır (16). Bugüne kadar, birçok kas distrofisi zebra balığında modellenmiştir (17). Memeli modellere kıyasla insana daha az benzerlik gösterdiği bilinse de, bazı kas hastalıklarının altında yatan patolojinin araştırılmasında fare modellerinden daha etkili olmuştur (18, 19). Zebra balığında kas oluşum süreci (miyogenez) detaylı olarak çalışılmıştır (20). Genetik ve embriyonik uygulamalarının kolay olması sayesinde, kas hastalıklarında ortaya çıkan patolojik durumların altında yatan protein-protein ilişkilerinin ve hücresel işlevlerinin araştırılması için de uygun bir modeldir (21).

Zebra balığında gen duplikasyonları sıklıkla görülmektedir. İki kopya olarak bulunan genlerin bazılarının, birbirleriyle ve insandaki ortoloğu ile benzer işleve sahip olduğu bulunmuştur. Bazı homolog genlerin ise, farklı dokularda ya da gelişimin farklı zamanlarında ifade olarak birbirinden ve insandaki ortoloğundan farklı işlevler üstlendiği bilinmektedir. İnsanda tek kopya olarak bulunan *DES*, zebra balığında farklı kromozomlardan ifade olan *desma* ve *desmb* olmak üzere iki kopya halinde bulunmaktadır. Zebra balığında, desma ve desmb transkriptlerine özgül olarak morfolino ile gerçekleştirilen *knockdown* çalışmalarında kalp ve iskelet kasında patolojik bulgular ortaya çıkmasına rağmen, bu iki genin işlevini birbirinden ayırt etmek için yeterli bilgi elde edilememiştir (22).

Yüksek lisans tez çalışmasının hipotezi, araştırma grubumuz tarafından *King's College* (*Randall Institute*, *Muscle Signalling Section*), Londra'da yabanıl tip AB zebra balıklarıyla gerçekleştirilen ön çalışmalara dayanmaktadır. Tüm örnek (*whole-mount*) *in sitü* hibridizasyon ve immünfloresan boyama deneyleri ile gerçekleştirilen bu ön çalışmalarda, *desma* ve *desmb*'nin döllenme sonrası 70. saate kadar iskelet kası ifadesi gösterdiği bulunmuştur; ancak 70. saatten sonra, *desma*'nın ağırlıklı olarak iskelet kasında, *desmb*'nin ise çoğunlukla düz kasta ifade olduğu gösterilmiştir (P. Dinçer, yayınlanmamış veri). Desmin proteini ile ilişkili hastalıkların zebra balığında modellenebilmesi için, bu iki genin ifade olduğu dokuların detaylı olarak bilinmesi ve birbirlerinin yedeği olarak çalışıp çalışmadıklarının araştırılması gerekmektedir.

1.4 Amaç ve Kapsam

Gerçekleştirilen yüksek lisans tez çalışmasının amacı; zebra balığında bulunan, insan *DES* ortoloğu olan, birbirleriyle yüksek homoloji gösteren *desma* ve *desmb*'nin, mRNA ve protein ifadelerini inceleyerek farklarının belirlenmesidir. Bu amaçla, bu iki genin ifadesi yabanıl tip AB, *desma KO* (*knockout*) (-/-) ve *desmb KO* (-/-) zebra balıklarında incelenerek karşılaştırılmıştır.

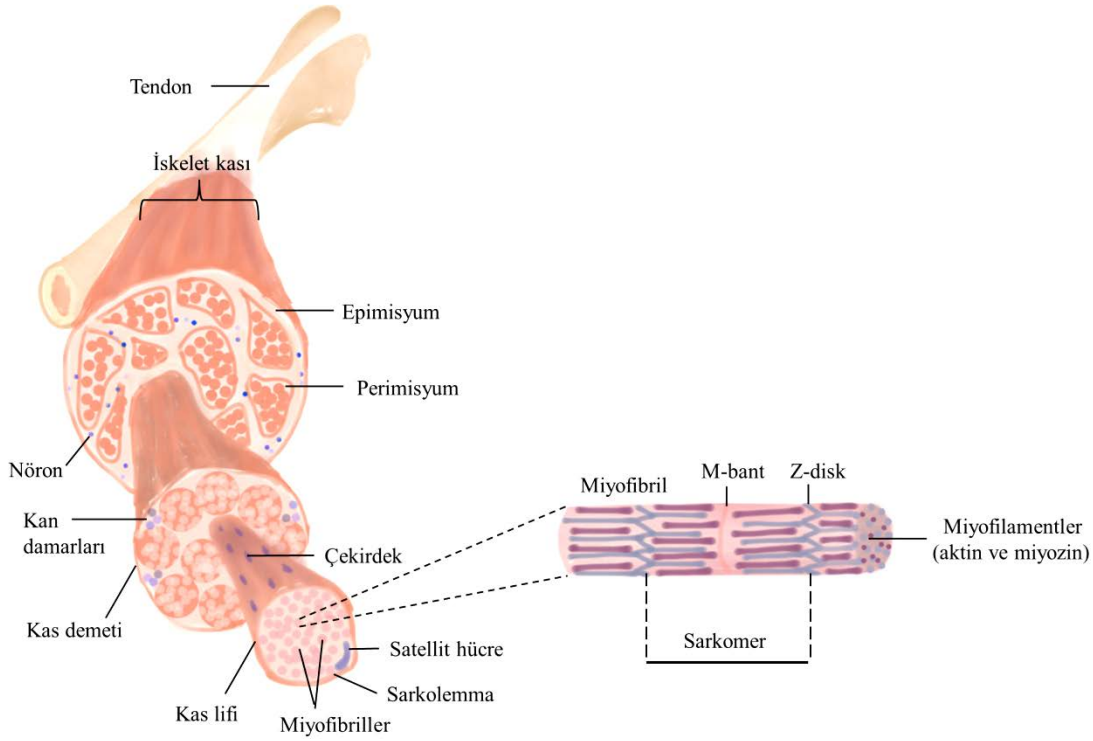
2. GENEL BİLGİLER

2.1 İskelet Kası Yapısı

İskelet kası, post-mitotik kas fibrillerinin (miyofibril, kas hücresi) ve bağ dokunun organizasyonları ile oluşmaktadır. Miyofibriller çok çekirdekli yapıda olup her çekirdek kendi çevresindeki nükleer bölgenin protein sentezinden sorumludur (23). Her miyofibril, ortalama 100 μm çapında ve 1 cm uzunluğundadır. Miyofibriller, perimisyum olarak adlandırılan bağ doku ile bir araya gelerek miyofibril gruplarını oluşturmaktadır. Miyofibril grupları ise, epimisyum olarak isimlendirilen bağ doku ile organize olarak iskelet kası dokusunu oluşturmaktadır. İskelet kası dokusu, nöromüsküler bağlantılarla sinir dokusuna ve miyotendinöz bağlantılarla tendonlara bağlanmaktadır (Şekil 2.1.) (24).

Her kas lifi binlerce miyofibrilden ve her miyofibril milyarlarca miyofilamentten meydana gelmektedir. Miyofilamentler, kasın temel kasılabilir birimi olan ve sarkomer olarak isimlendirilen karakteristik bir organizasyona sahiptir (Şekil 2.1.). İskelet kası yapısında, aktin ve miyozin miyofilamentleri dışında, hücre iskeletini oluşturan ve kasılmaya yardımcı olan yapısal proteinler ve kasılmayı düzenleyici proteinler de bulunmaktadır (25).

İskelet kasında hareketin oluşumu için miyofilamentlerde gerçekleşen güç üretimi mekanizması, 1954 yılında, ‘kayan filament teorisi’ ile açıklanmıştır (26, 27). Kas dokusunun motor nöronlarla aktivasyonu sonucunda, aktin-miyozin köprülerinin birbirine yaklaşması ve sarkomer boyunun kısalması ile oluşan güç, tüm kas lifi boyunca yayılarak miyotendinöz bağlantılara, tendonlara ve son olarak eklemlere iletilerek hareketin oluşmasını sağlamaktadır. Bu güç aktarımı, aktin filamentleri üzerinde bulunan troponin proteinine bağlı hücre içi kalsiyum molekülleri ile düzenlenmektedir (28).



Şekil 2.1. İskelet kası yapısının şematik görüntüsü. Çok çekirdekli miyofibriller aktin ve miyozin miyofilamentlerinin karakteristik dizilişleri ile oluşur. Miyofibriller, perimisyum olarak adlandırılan bağ doku ile bir arada bulunarak miyofibril gruplarını oluşturur. Miyofibril grupları ise epimisyum olarak isimlendirilen bağ doku ile birlikte iskelet kası dokusunu oluşturur (Mescher'dan uyarlanmıştır (2013) (29)).

İskelet kasında miyofilamentlerin yerleşimini düzenleyen, kasılma işlevinin gerçekleşmesine yardımcı olan ve kasılma sırasında üretilen gücün aktarımını kolaylaştıran dinamik bir yapı bulunmaktadır. Kasın mimarisini oluşturan ve 'sarkomerik hücre iskeleti' olarak adlandırılan bu yapı, mekanik kuvvetin ve hücre içi sinyallerin iletiminin gerçekleşmesi için önemlidir (30).

2.2 Sarkomerik Hücre İskeleti

İskelet kasının temel kasılabilir birimi olan sarkomer yapısında aktin ve miyozin miyofilamentleriye birlikte bulunan, kasılma ve gevşeme sırasında güç üretimini kontrol eden ve güç aktarımını kolaylaştıran diğer proteinlerin oluşturduğu yapı, sarkomerik hücre iskeleti yapısı olarak adlandırılmaktadır. Bu yapıda bulunan proteinlerin oluşturduğu hücresel ağın; kas fibrillerinin dinamik şeklini oluşturmak, organellerin hücre içinde doğru pozisyonlarda yerleşimini sağlamak ve sinyal

iletimini gerçekleştirmek gibi birçok işlevi bulunmaktadır. Sarkomerik hücre iskeletini oluşturan temel elemanlar, iskelet kasında Z-disk ve M-bant bölgelerinde birbirleriyle güçlü bağlantılar oluşturmakta olup üç grupta sınıflandırılmaktadır: mikrofilamentler (aktin polimerleri), mikrotübüller (tübülin polimerleri) ve ara filament proteinleri. İskelet kası yapısında bulunan ara filament proteinleri, kasılabilir elemanları bir arada tutarak; çekirdek, sarkolemma ve hücre içi organellerle olan bağlantılarının kurulmasını sağlamaktadır (31).

2.2.1 İskelet Kası Ara Filament Proteinleri

Hücre iskeleti yapısında bulunan ara filament proteinleri ailesi, çok sayıda gen tarafından kodlanan ve günümüzde 94 farklı hastalık fenotipiyle ilişkilendirilmiş olan 73 tanımlanmış proteinden oluşmaktadır (32). Ara filament proteinleri; birincil yapıları, oluşturduğu protein birliktelikleri ve ifade oldukları doku tipine göre altı alt sınıfta incelenmektedir. Tip I ve tip II sınıfı içerisinde, çoğunlukla epitel doku hücrelerinde ifade olan ve özgül heteropolimer yapısı oluşumu ile karakterize edilmiş asidik ve bazik keratin proteinleri bulunmaktadır. Tip III sınıfında, homopolimer yapısı oluşturan, desmin, sinkoilin, vimentin, periferin ve *glial fibrillary acidic protein* (GFAP) proteinleri yer almaktadır. Tip IV sınıfı, çoğunlukla sinir dokusu ve sinir hücrelerinde ifade olan nörofilament (NF) alt üniteleri (nörofilament-*light* (NF-L), nörofilament-*medium* (NF-M), nörofilament-*heavy* (NF-H)) ve α-interneksin, nestin, sinemin proteinlerden oluşmaktadır. Çekirdeğe özgül yerleşim gösteren Tip V sınıfı, evrimsel gelişim sürecinde bilinen en eski ara filament proteinleri olan ve oldukça korunmuş yapıda bulunan lamin proteinlerinden (lamin A, B1, B2, C1 ve C2) oluşmaktadır. Tip VI sınıfında ise göz yapısında ifade edilen fakinin ve filensin proteinleri yer almaktadır (33).

İskelet kası hücre iskeleti yapısında, kas dokusuna özgül ifade gösteren desmin başta olmak üzere, çoğunlukla tip III sınıfı ara filament proteinleri bulunmaktadır (34). Sinemin, diğer bir tip III sınıfı ara filament proteini, desmin ile benzer yerleşim göstermekte ve birlikte polimer oluşturmaktadır. Desmin, sinemin ve son yıllarda keşfedilen sinkoilin proteinleri, α-aktinince zengin Z-disklerin çevresinde yerleşim göstermektedir. Beyin kök hücrelerinde ifade olan nestin proteininin de, tip III sınıfı ara filament proteinleri ile birlikte yerleşim gösterdiği

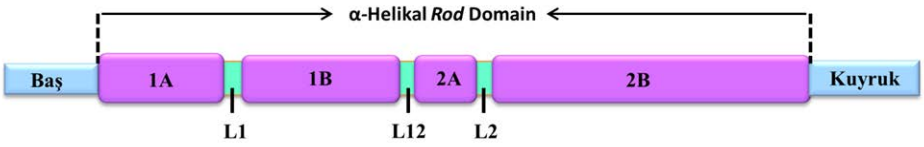
bilinmektedir. Ancak nestin ifadesi kas gelişiminin erken evrelerinde yüksek olmasına rağmen, kas farklılaşması tamamlandığında yalnızca nöromüsküler ve miyotendinöz bağlantı bölgelerinde devam etmektedir. İskelet kasında ayrıca keratin protein ailesi üyeleri de ifade olmaktadır. Kas oluşumunun erken evrelerinde keratin 8 (K8) ve keratin 18 (K18) ifadesi olmasına rağmen, farklılaşma süresince K18 ifadesi tamamen sıfırlanmaktadır ve yerini keratin 19 (K19) almaktadır. Ancak, olgun kas hücrelerinde, K8 ve K19 ifadesi oldukça düşük düzeydedir. Vimentin ise, miyoblastlarda ifadesi en yüksek olan ara filament proteinidir. Farklılaşan kas hücresinde desmin ifadesi başladığında, desmin-vimentin heterodimerleri oluşmaktadır. Desmin ifadesi artışı ile vimentin ifadesi gittikçe azalmaktadır ve olgun iskelet kasında vimentin ifadesi ölçülemeyecek seviyelere düşmektedir (35). *Des KO* (-/-) fare modellerinde, iskelet kası dokusunda vimentin proteininin desmin yokluğunda ifadesinin artmadığı gösterilmiştir (36).

Desmin proteini ifadesi, kalp kası ve iskelet kasında, bilinen en erken farklılaşma belirteçlerinden biridir (7). Diğer kasa özgül proteinlerin aksine desmin, satellit hücrelerde de (kasa özgül kök hücreler) düşük düzeyde ifade olmaktadır (37). Embriyonik gelişimde desmin, birçok kasa özgül yapısal proteinin ve *myogenic differentiation*-1 (myoD), *myogenic factor*-4 (myogenin), *myogenic regulatory factor*-4 (MRF4) gibi transkripsiyon faktörlerinin ifadesine öncülük etmektedir (38). Bu durum, desmin proteininin kas oluşum süreci ve farklılaşmasındaki rolünü önemli kılmaktadır.

2.3 Desmin

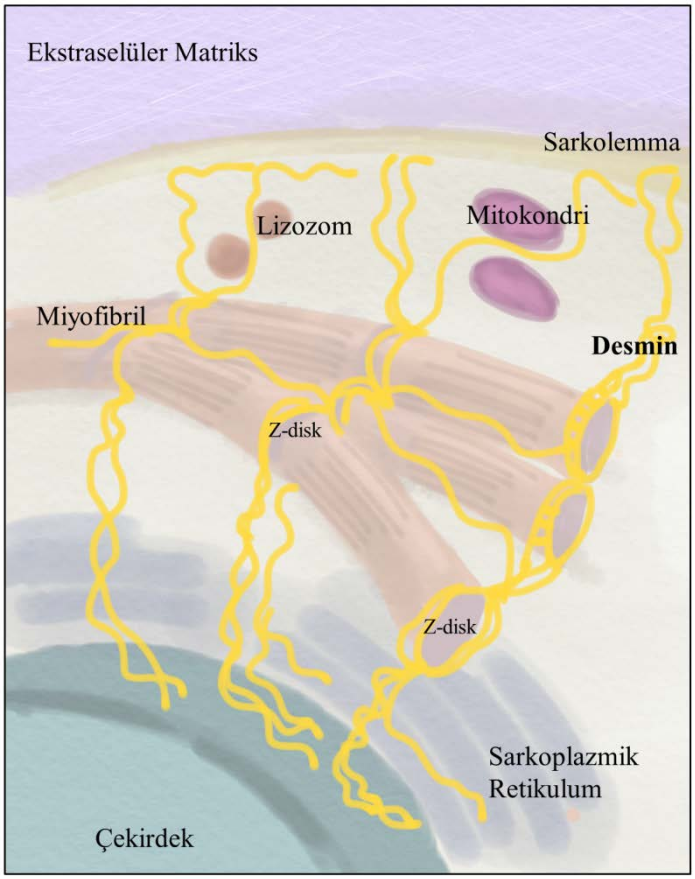
Desmin, 470 aminoasitten oluşan, 53,5 kDa büyüklüğünde, tip III sınıfı ara filament proteinidir ve 2q35'de yerleşim gösteren *DES* tarafından kodlanmaktadır (39). Desmin, kas dokusuna özgül ifade göstermektedir. Kas dokusunda en çok bulunan ara filament proteini olup tüm kas tiplerinde (iskelet kası, kalp kası, düz kas) ifade olmaktadır (11). Diğer ara filament proteinlerine benzer ikincil yapısında, helikal olmayan baş ve kuyruk domainleri, merkezinde ise α-helikal *rod* domain bulunmaktadır. *Rod* domain, 10 nm çapında filament yapısı oluşturur. Merkezi *rod* domainin iki uç segmenti olan 1A (amino-terminal) ve 2B (karboksi-terminal), tüm

ara filament proteinleri arasında evrimsel olarak en çok korunmuş olan bölgelerdir (Şekil 2.2.) (40).



Şekil 2.2. Desmin proteininin şematik görüntüsü. Proteinin iki ucunda helikal olmayan baş ve kuyruk domainleri, merkezinde ise 4 segmentten oluşan α-helikal *rod* domain bulunmaktadır. Merkezi *rod* domainin 4 ana segmenti (1A, 1B, 2A ve 2B), *linker* bölgeler ile (L1, L12, L2) birbirine bağlanmaktadır (Tang'dan uyarlanmıştır (2008) (41)).

Olgun iskelet kası hücrelerinde desmin, tüm miyofibril boyunca ifade olarak, üç boyutlu bir ağ yapısı oluşturmaktadır. En yoğun olarak Z-disklerin çevresinde bulunarak, miyofibrillerin birbirleriyle bağlantılarını sağlamaktadır. Z-disklerinin ise, çekirdek, mitokondri, lizozom, sarkoplazmik retikulum, T-tüpler ve sarkolemma ile bağlantılarını oluşturmaktadır (Şekil 2.3.) (8-10). Desmin bu yapılar dışında, olgun iskelet kasında nöromüsküler ve miyotendinöz bağlantı bölgelerinde, kalp kasında ise interkale disklerde ifade olmaktadır (42). Desmin, kas hücresinin kasılması ve gevşemesi sırasında oluşturduğu bu ağ yapısı sayesinde, hücresel bütünlüğün korunmasını sağlayarak güç aktarımını kolaylaştırmaktadır (11, 12). Desmin, hücre içi mekanokimyasal sinyal trafiğinin ve homeostasinin düzenlenmesi, kas farklılaşması ve rejenerasyonu, organellerin hücre içinde doğru pozisyonlarda yerleşim gösterebilmeleri için oldukça önemli bir proteindir (43). İnsanda desmin proteini ile ilişkili olarak ortaya çıkan miyopati ve kardiyomiyopatiler, desminopatiler üst başlığı altında gruplandırılmaktadır (13).



Şekil 2.3. Desmin ara filament proteininin (sarı) hücre içerisinde oluşturduğu ağ yapısının şematik görüntüsü. Desmin en yoğun olarak miyofibriller üzerindeki Z-disklerinde bulunur ve bu yapıların hem birbirleriyle hem de çekirdek, sarkolemma, sarkoplazmik retikulum, mitokondri ve lizozom gibi hücre içi elemanlarla bağlantılarını oluşturur (Capetanaki'den uyarlanmıştır (2002) (44)).

2.3.1 Desminopatiler

DES'de meydana gelen mutasyonlar ya da desmin proteininin post transkripsiyonel modifikasyonlarında görevli olan enzimleri sentezleyen genlerde meydana gelen mutasyonlar, hücre içi desmin protein ağının bozulması ve agregat oluşumu ile gözlemlenen miyopatilere ve kardiyomiyopatilere neden olmaktadır. Bu hastalıklar, desmin ilişkili miyopatiler ya da desminopatiler olarak isimlendirilmektedir (13). Desminopatiler, 5/10.000'den daha az etkilenmiş birey oranı ile nadir hastalıklar grubunda incelenmektedir (15).

Hastalığın başlangıç yaşı ve süreci, mutasyonun protein üzerinde oluşturduğu değişikliğe ve kalıtım tipine göre çeşitlilik göstermektedir. *DES* mutasyonları,

mutasyonun oluştuğu bölgeye göre; yanlızca iskelet kası, yalnızca kalp kası ya da her iki kas dokusunda da kas dejenerasyonuna neden olabilmektedir. İskelet kası tutulumunda, kol ve bacak kaslarında başlayan kas güçsüzlüğü genellikle gövde, boyun ve yüz kaslarına yayılmaktadır; hastaların %74'ünde aritminin ve kronik kalp yetmezliğinin geliştiği kalp kası tutulumu bulunmaktadır (45). Günümüze kadar tespit edilen yaklaşık 70 mutasyon, desminopatilerle ilişkilendirilmiştir (14). *DES* mutasyonları, bu hastalıklar dışında, *limb girdle* kas distrofisi ve *scapuloperoneal* distal miyopati ile de ilişkilendirilmiştir (46, 47).

DES ile ilişkili hastalıkların patogenezinin aydınlatılması ve uygun tedavi yöntemlerinin geliştirilebilmesi için kullanılan hayvan modellerinde, ortolog genlerin detaylı olarak incelenmiş olması gerekmektedir. Bu tez çalışmasında ise, zebra balığında bulunan *DES* ortoloğu genlerin (*desma* ve *desmb*) ifadeleri araştırılmıştır.

2.4 Zebra Balığı (*Danio rerio*)

Zebra balığı, son yıllarda biyolojik ve tıbbi araştırmalarda sıklıkla tercih edilen bir model organizmadır. Döllenmeden sonra yaklaşık 24 saat içerisinde temel organların oluşumunun tamamlanması, embriyoların vücut dışında döllenmesi ve gelişmesi, transparan embriyolara sahip olması, aynı anda çok sayıda embriyo üretme kapasitesi (100-200 balık/hafta), bakım ve uygulamalarının kolay olması bu modelin kullanımını avantajlı kılmaktadır (48).

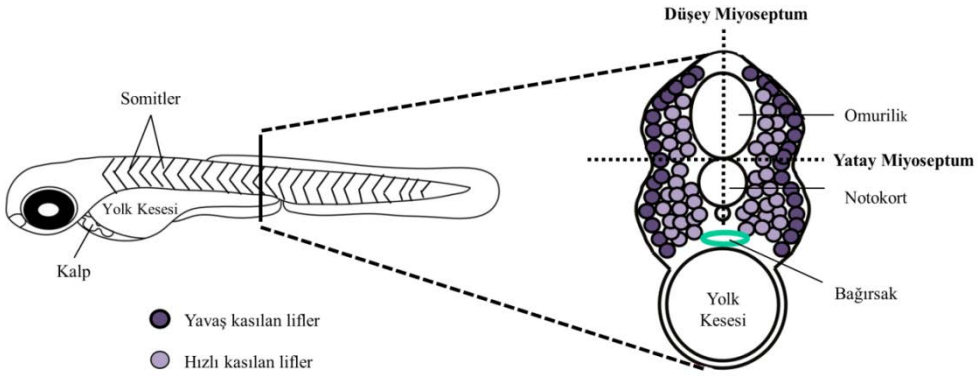
Zebra balığı genomu, 25 haploit kromozom, 26.206 protein kodlayan genden oluşmaktadır ve 1,6 GB büyüklüğündedir (49). İnsanda hastalık yapan tanımlanmış genlerin %70'inin ortoloğu zebra balığında bulunmaktadır (50). Hücresel yapı ve işlev olarak memeli organizmalara yüksek benzerlik göstermektedir (16). Mutajenik ajanlar ve genom düzenleme araçları kullanılarak oluşturulan mutasyonlar sonucunda, günümüzde 4000'in üzerinde transgenik ve mutant zebra balığı hattı bulunmaktadır (48). Sistematik sınıflandırmada ait olduğu Teleostei alt sınıfında bulunan diğer balık türleri gibi, zebra balığında da hastalık modellemede dezavantaj yaratan genom duplikasyonlarının gözlenmektedir (51). Ancak birden fazla sayıda kopyaya sahip bu genlerin ifadesi araştırılarak bu sorunun önüne geçilebilmektedir.

Memelilerde bulunan meme dokusu, akciğer, prostat ve deriye özgül bazı elemanların bulunmaması sebebiyle, bu yapılar ile ilişkili hastalıkları modellemede kullanılamamaktadır; ancak kas hastalıkları, immünolojik hastalıklar, enfeksiyon hastalıkları, metabolik hastalıklar gibi birçok farklı hastalığın araştırılması için tercih edilen bir modeldir. Bunun yanında, toksisite, ilaç taramaları ve davranışsal anomali çalışmaları gibi pek çok farklı araştırma için de uygun bir model organizmadır (52).

2.4.1 Zebra Balığında İskelet Kası Yapısı

Zebra balığının gövde ve kuyruk bölgesinin büyük çoğunluğu iskelet kasından oluşmaktadır. Gövdede hızlı ve yavaş kasılabilir özellikteki kas lifleri farklı bölgelerde yerleşim göstermektedir. Yavaş kasılan lifler daha az sayıdadır ve deri yüzeyine yakın yerleşim gösterirler; hızlı kasılan lifler daha çok sayıdadır ve somitlerin iç kısımlarında bulunmaktadır (53). Embriyonik gelişimde, gastrulasyon aşamasından hemen sonra, paraksiyel mezodermin arka kısmından kasa özgül transkripsiyon faktörlerini ifade eden somitler gelişmeye başlamaktadır. Döllenmeden 16 saat sonra, yavaş kasılan liflerin oluşumunun başlaması ile kas hücreleri ön-arka eksen boyunca farklılaşmaya başlar. Yavaş kasılan liflerin somitlerde yan bölgelerin çeperine göç etmesi tamamlandığında, hızlı kasılan lifler farklılaşmaya başlamaktadır. Döllenmeden sonra 24. saate gelindiğinde somitler, dorsoventral eksende, yatay miyoseptum ve düşey miyoseptum yapılarıyla birbirlerinden ayrılarak karakteristik şeklini almaktadır (Şekil 2.4.). Miyoseptum ve notokort yapıları somitlerin tutunma bölgeleri olarak davranarak güç aktarımına yardımcı olmaktadır (54). Döllenmeden sonra, yaklaşık 18. saatte motor hareketlerin başladığı ve 48. saatte kas farklılaşmasının tamamlandığı gözlenmektedir (55).

Memeli kas gelişimi ve farklılaşması için gerekli proteinleri kodlayan genler, zebra balığında da korunmuştur (17). Memelilerde gözlenen kas tamiri ve rejenerasyonu mekanizmaları zebra balığında da bulunmaktadır. Zebra balığında, insan iskelet kası tamirinde rol oynayan ve *Pax-7* ifadesi bulunan kasa özgül kök hücrelere (satellit hücreler) benzer yapıda hücreler gözlenmiştir; ancak bu hücrelerin zebra balığı kas rejenerasyonundaki rolü henüz detaylı olarak bilinmemektedir (56).



Şekil 2.4. Zebra balığı gövdesinden alınan transversal kesit görüntüsünün şematik gösterimi. Gövdede, yavaş kasılan lifler somitlerin dış kısmında yerleşim gösterirken hızlı kasılan lifler iç kısımlarda bulunmaktadır. Somitler, dorsoventral eksende yatay ve düşey miyoseptum yapılarıyla birbirinden ayrılmaktadır (Lin'den uyarlanmıştır (2012) (17)).

2.4.2 Zebra Balığında İskelet Kası Hastalıklarının Modellenmesi

1990 yılında, mutajenik ajanların kullanımıyla oluşturulmuş mutant zebra balıklarında yapılan genetik taramalarda, *fub-1* mutasyonu taşıyan ve kas fibrillerinin organizasyonunda bozukluk tespit edilen ilk zebra balığı iskelet kası hastalık modeli tanımlanmıştır (57). Ardından Tuebingen, Almanya'da, mutant zebra balıklarında gerçekleştirilen büyük ölçekli genetik taramalarda, dystrophin sentezleyen gende mutasyon taşıyan Duchenne kas distrofisi (DMD) modeli *sapje* mutantı tanımlanmıştır (21). Zebra balığı *sapje* mutantları, yüksek rejenerasyon kapasitesi gösteren fare DMD modellerine (*mdx* fare) göre, insana daha benzer bir fenotip oluşturarak hastalık patofizyolojisinin anlaşılmasında daha etkili olmuştur (18). Benzer şekilde, dystroglycan *KO* (-/-) farelerin anne karnında ölmeleri sebebiyle, bu proteinin kas gelişimdeki rolünün araştırılmasında, vücut dışında döllenen ve gelişen zebra balıkları daha etkili olmuştur (58).

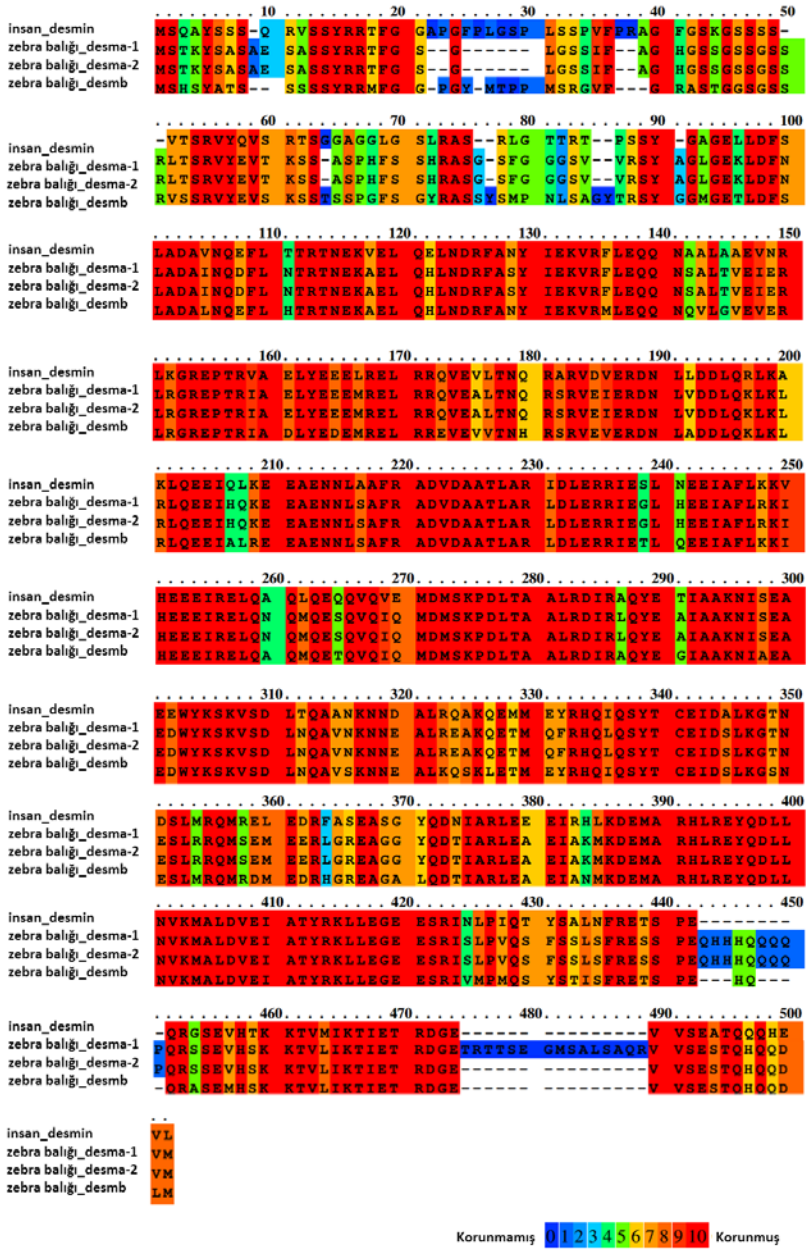
Zebra balığında mutant hatların oluşturulması dışında, ilgili gen ürününün kısa süreli olarak baskılanması ve ardından oluşan fenotipin incelenmesi mümkündür; ancak bu uygulamaların patolojik durumu yansıtma yüzdesi gen üzerinde yapılan değişikliklere göre daha düşüktür. Zebra balığında, insan *DES* ortoloğu olan *desma* ve *desmb* genlerinin araştırılmasına yönelik yapılan morfolino ile *knockdown* çalışmalarında, kalp kası ve iskelet kasında patolojik bulgular elde

edilmiştir; ancak bu çalışma iki genin özgül ifadelerinin ayırt edilebilmesi için yeterli değildir (22).

2.4.3 Zebra Balığında Desmin

Zebra balığında, insan *DES* ortoloğu olan ve birbiriyle yüksek homoloji gösteren iki gen (*desma* ve *desmb*) bulunmaktadır. 9. kromozomda yerleşim gösteren *desma* geninin ürünü olan desma proteininin iki izoformu (desma-1 ve desma-2) bulunmaktadır; desma-1 izoformu, 488 aminoasitten oluşan 55,6 KDa büyüklüğünde bir proteindir, desma-2 izoformu ise 473 aminoasitten oluşan 54,1 KDa büyüklüğünde bir proteindir. 6. kromozomda yerleşim gösteren *desmb* ise 473 aminoasitten oluşan, 54,2 KDa büyüklüğünde desmb proteinini kodlamaktadır. İnsan desmin proteini dizisiyle, zebra balığı desma-1 protein izoformu %80, desma-2 protein izoformu %82 ve desmb proteini %83 benzerlik göstermektedir (Şekil 2.5.). Embriyonik gelişimin erken dönemlerinde (döllenmeden sonra 48. saate kadar), *desmb* ifadesi *desma* ifadesinden yaklaşık 2500 kat daha düşüktür Bunun yanında, desma protein ifadesi döllenmeden sonra 11. saatten itibaren gözlenirken, desmb proteininin döllenmeden sonra 96. saate kadar düşük düzeyde ifade olduğu bilinmektedir (22, 59).

Bu iki genin işlevini araştırmaya yönelik literatürde yer alan, morfolino kullanılarak gerçekleştirilmiş *knockdown* çalışmaları, genlerin hangi dokularda ifade olduğuna ilişkin yeterli düzeyde bilgi vermemektedir (60). Desmin proteini ile ilişkili hastalıkların zebra balığında modellenebilmesi için, bu iki genin ifade olduğu dokuların detaylı olarak bilinmesi gerekmektedir. Araştırma grubumuz tarafından tüm örnek *in sitü* hibridizasyon ve immünfloresan boyama deneyleri ile gerçekleştirilen ön çalışmalarda, yabanıl tip AB zebra balıklarında *desma* ve *desmb* ifadesi incelenmiştir. Bu iki genin, döllenmeden sonra 70. saate kadar, birbirine benzer şekilde iskelet kasında ifade olduğu bulunmuştur; ancak 70. saatten sonra *desma* ifadesi ağırlıklı olarak iskelet kasında devam ederken, *desmb*'nin çoğunlukla düz kasta ifade olduğu gözlemlenmiştir (P. Dinçer, yayınlanmamış veri). Gerçekleştirilen yüksek lisans tez çalışmasında ise *desma* ve *desmb* gen ürünlerinin (mRNA ve protein) dokulardaki ifadesi, hem yabanıl tip AB hem de *desma KO* (-/-) ve *desmb KO* (-/-) zebra balıklarında incelenerek karşılaştırılmıştır.



Şekil 2.5. İnsan ve zebra balığı arasında, desmin proteininin aminoasit dizilerinin şematik karşılaştırması. Korunmuş bölgeler kırmızı ile gösterilmiştir (*Praline* veri tabanı kullanılarak oluşturulmuştur).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1 Zebra Balıkları ve Gereçler

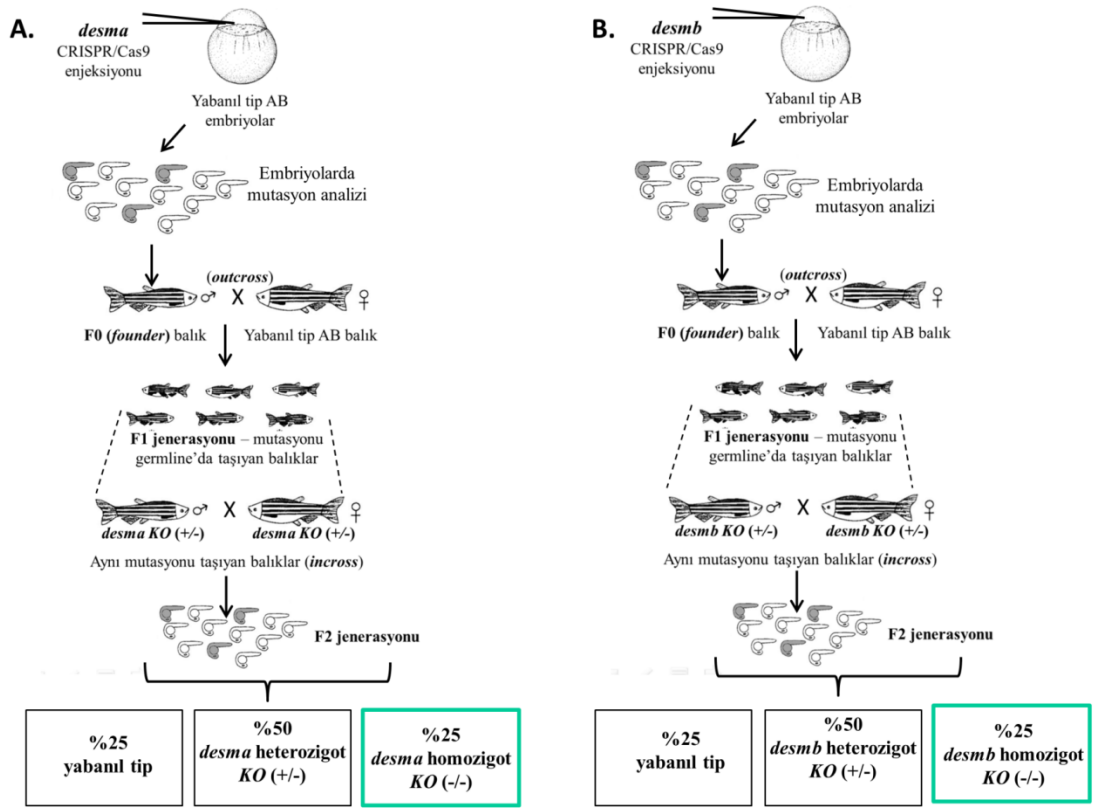
3.1.1 Çalışmada İncelenen Zebra Balıkları

Zebra balıkları, Hacettepe Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma ve Uygulama Merkezi Zebra Balığı Araştırma Laboratuvarı'nda, T.C Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı tarafından belirlenen hayvan refahı yönetmeliğine uygun olarak yetiştirilmiştir.

Tüm deneyler, Hacettepe Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun onayı alınarak (18.02.2014 tarihli 2014/01, Karar no: 2014/07-08) gerçekleştirilmiştir (Bkz., EK 1).

Gerçekleştirilen tez çalışması kapsamında, yabanıl tip AB, *desma KO* (-/-) ve *desmb KO* (-/-) olmak üzere toplam üç zebra balığı grubu kullanılmıştır. Çalışmada, AB, C32, HK, TU, SJA gibi farklı yabanıl tip zebra balığı hatları arasından, *desma* ve *desmb*'de mutasyon oluşturulan bölgede polimorfizm taşımadığı bilinen yabanıl tip AB hattı kullanılmıştır. CRISPR/Cas9 enjeksiyonu ile yabanıl tip AB balıklarda, ayrı ayrı *desma* ve *desmb*'nin birinci eksonları hedeflenerek, rastgele insersiyon ve delesyon mutasyonları meydana getirilmiştir. Oluşan mutasyonlar, okuma çerçevesinin bozulmasına ve mRNA dizisi üzerinde erken dur kodonu oluşmasına neden olarak protein sentezini engellemektedir. Hedeflenen bölgelere özgül olarak tasarlanmış gRNA (*guide* RNA) – Cas9 kompleksinin enjeksiyonunu takiben, heterozigot erken dur kodonu taşıyan F0 (*founder*) balıklar tanımlanmıştır; ardından bu balıklar yabanıl tip AB balıklarla çaprazlanarak mutasyonu eşey hücrelerinde taşıyan F1 jenerasyonuna ait balıklar elde edilmiştir. Hem *desma KO* hem de *desmb KO* balıklara ait F1 jenerasyonunda, aynı mutasyonu heterozigot olarak taşıyan *KO* (+/-) dişi ve erkek balıklar çaprazlanarak F2 jenerasyonu oluşturulmuştur. Elde edilen F2 jenerasyonlarında, yabanıl tip (%25), heterozigot *KO* (+/-) (%50) ve homozigot *KO* (-/-) (%25) balıklar bulunmaktadır.

Tez çalışmasında ilk olarak, DNA dizi analizi ile *desma KO* (-/-) ve *desmb KO* (-/-) balıklar, belirlenmiştir (Şekil 3.1.).



Şekil 3.1. *KO* balıkları elde etmek için izlenen iş akışı. A. *desma KO* (-/-) balıkların eldesi; B. *desmb KO* (-/-) balıkların eldesi. Tez çalışmasında, *desma KO*-F2 ve *desmb KO*-F2 jenerasyonlarında bulunan balıklar DNA dizi analizine alınarak belirlenen homozigot *KO* (-/-) (%25 oranında, yeşil ile çerçevelenmiş) zebra balıkları kullanılmıştır.

3.1.2 Zebra Balıklarının Bakımı ve İdamesi

Embriyo solüsyonu (60X stok):

- NaCl (Merck): 5 mM
- KCl (Carlo Erba): 0,17 mM
- $CaCl_2.2H_2O$ (Sigma): 0,33 mM
- $MgCl_2.6H_2O$ (Merck): 0,33 mM

dH_2O ile l000 ml'ye tamamlanmış ve +4°C'de saklanmıştır.

1X Embriyo solüsyonu, dH_2O ile sulandırılarak hazırlanmış ve oda sıcaklığında saklanmıştır.

Metilen mavisi, %0,01 (Sigma)

Kullanılan yemler:

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

3.1.3 DNA İzolasyonu

Tricaine, %0,003-0,03 (Sigma)

NaOH, 50 mM (Merck)

Tris-HCl, 40 mM, pH 8.0 (Sigma)

GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems)

3.1.4 Primer Dizilerinin Tasarlanması

PZR, kGZ-PZR ve in sitü hibridizasyon çalışmalarında kullanılan *Forward* ve *Reverse* primer dizileri, *PerlPrimer* (versiyon 1.1.21) ve *NCBI-Primer BLAST* programları ile tasarlanmıştır.

3.1.5 Polimeraz Zincir Reaksiyonu

10X Taq Tamponu, $(NH_4)2SO_4$ içeren, $MgCl_2$ içermeyen, (Fermentas)

Taq DNA polimeraz, 5U/µl (Fermentas)

Primer *Forward* ve *Reverse*, 10 mM

dNTP karışımı, 10 mM (Fermentas)

$MgCl_2$, 25 mM (Fermentas)

GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems)

PZR ürünleri *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* Kiti (Promega) kullanılarak saflaştırılmıştır.

3.1.6 DNA Agaroz Jel Elektroforezi

50X Tris-asetat-EDTA (TAE) tamponu (pH 8.0):

- Tris baz, 2 M (Sigma): 40 mM
- Glasiyal asetik asit (Merck): 20 mM
- Na_2EDTA, 0,5 M (Carlo Erba): 1 mM

  dH_20 ile 1 L'ye tamamlanarak hazırlanmış ve +4°C'de saklanmıştır.

  1X TAE tamponu dH_2O ile sulandırılarak hazırlanmış ve oda sıcaklığında saklanmıştır.

Yükleme tamponu (6X):

- Gliserol (Sigma): 5,5 ml
- 1X TAE tamponu: 4,5 ml
- *Orange G* boya (Merck): 0,01 gr

Agaroz (Prona)

Etidyum bromür (Sigma): 10 mg/ml dH_20

100 baz çifti DNA moleküler ağırlık belirteci (Fermentas)

50 baz çifti DNA moleküler ağırlık belirteci (Fermentas)

3.1.7 DNA Dizi Analizi

BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems)

Primer *Forward* ya da *Reverse*, 3,2 mM

Sodyum asetat, 3 M, pH 5 (Carlo Erba)

Etanol, %100 ve %70 (Carlo Erba)

Formamid (Applied Biosystems)

GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems)

3130 *Genetic Analyzer* (Applied Biosystems)

3.1.8 Zebra Balığı Embriyolarının Fiksasyonu

N-Pheniylthiourea (PTU, Sigma), 1X Embriyo solüsyonu içerisinde %0,003 oranında hazırlanmıştır.

Paraformaldehit (PFA, Sigma)

10X *Phosphate Buffered Saline* (10X PBS, Santa Cruz), 1X PBS dH_20 ile sulandırılarak hazırlanmıştır.

Metanol, %100 (J.T. Baker)

3.1.9 Total RNA İzolasyonu

RNase Zap (Ambion)

TRItidy G (AppliChem)

Diethylpyrocarbonate, %0,1 (DEPC, AppliChem)

Kloroform (Carlo Erba)

İzopropanol (AppliChem)

3.1.10 cDNA Sentezi

QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen)

RNase Zap (Ambion)

DEPC, %0,1 (AppliChem)

3.1.11 Prob Sentezi

RNase Zap (Ambion)

DEPC, %0,1 (AppliChem)

Kalıp DNA hazırlanması:

- Q5 Polimeraz, 2000 U/ml (New England BioLabs)
- 5X Q5 Polimeraz Tamponu (New England BioLabs)
- dNTP karışımı, 10 mM (Fermentas)
- Primer *Forward* ve *Reverse*, 10 mM

İn Vitro Transkripsiyon:

- Kalıp DNA, 200 ng (*sense* ya da *antisense*)
- *DIG RNA Labeling Mix* (Roche)
- 5X Transkripsiyon Tamponu (Thermo Scientific)
- *RiboLock RI* (Thermo Scientific)
- T3 RNA Polimeraz 18,4 U/µl (Promega)
- T7 RNA Polimeraz 20 U/µl (Thermo Scientific)
- DTT, 0,1 M (1,4-*Dithiothreitol*, Promega)
- *DNAse I*, 1 U/µl (Thermo Scientific)
- EDTA, 50 mM (*Ethylenediaminetetraacetic acid*, Thermo Scientific)

İn vitro transkripsiyon ile sentezlenen *digoxigenin* işaretli problar, *Illustra ProbeQuant G-50 Micro Columns Kit* (GE Healthcare) kullanılarak saflaştırılmıştır.

Formaldehit RNA yükleme boyası (Fermentas)

1000 baz çifti DNA moleküler ağırlık belirteci (Bioline)

3.1.12 Tüm Örnek *İn Sitü* Hibridizasyon ve Dondurulmuş Kesitler

RNase Zap (Ambion)

DEPC, %0,1 (AppliChem)

10X PBS (Santa Cruz), 1X PBS nükleazsız dH_20 ile sulandırılarak hazırlanmıştır.

Metanol, %100 (J.T. Baker)

Proteinaz K, 20 mg/ml (AppliChem)

Glisin, 1 M (Sigma)

PFA (Paraformaldehit, Sigma)

20X SSC (*Saline sodium citrate*, AppliChem)

Anti-Digoxigenin-AP, Fab fragments (Roche)

Sense ya da *Antisense* Prob

Gliserol, %99 (Sigma)

EDTA, 20 mM (Sigma)

Nitro blue tetrazolium chloride/*5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate Stock Solution* (*NBT/BCIP Stock Solution*, Roche)

Prehibridizasyon Çözeltisi (pH 6.0):

- Formamid (Promega): 25 ml
- 20X SSC (AppliChem): 12,5 ml
- Sitrik asit, 1 M (Riedel-de Haën): 460 µl
- Tween20, %20 (Amresco): 250 µl

Nükleaz içermeyen ultra saf dH_2O ile 50 ml'ye tamamlanmış ve -20 °C'de saklanmıştır.

Hibridizasyon Çözeltisi:

- *Ribonucleic acid from baker's yeast S. cerevisiae*, 50 mg/ml (Sigma): 10 µl
- Heparin sodyum tuzu, 100 mg/ml (AppliChem): 0,5 µl

Her 1 ml prehibridizasyon çözeltisi için, yukarıda belirtilen miktarlarda hazırlanmıştır.

Maleik Asit Tamponu (pH 7.5):

- Maleik asit (AppliChem): 0,1 M
- NaCl (Merck): 0,15 M

Nükleaz içermeyen ultra saf dH_2O içerisinde hazırlanmıştır. NaOH (Carlo Erba) ile pH 7.5'e ayarlanmış ve oda sıcaklığında saklanmıştır.

Bloklama Çözeltisi:

- Maleik asit tamponu içerisine, %2 oranında *Blocking Reagent* (Roche) ilave edilerek hazırlanmıştır ve -20 °C'de saklanmıştır.

Renklendirme Çözeltisi:

- Tris-HCl, 1 M, pH 9.5 (Sigma): 5 ml
- NaCl, 5 M (Merck): 1 ml
- $MgCl_2$, 0,5 M (Sigma): 5 ml
- Tween20, %20 (Amresco): 250 µl

Nükleaz içermeyen ultra saf dH_2O ile 50 ml'ye tamamlanmıştır.

Çalkalamalı hibridizasyon fırını (Amersham Life Science)

Tissue-Tek OCT Compound (Ted Pella)

Disposable Base Molds 7x7x5 mm (Fisherbrand)

Kriyostat Leica CM1900

3.1.13 Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu

SensiFAST SYBR No-ROX Kit (Bioline)

Primer *Forward* ve *Reverse*, 10 mM

Rotor-Gene 6000 (Corbett Life Science)

3.1.14 Tüm Örnek İmmünfloresan Boyama

10X PBS, (Santa Cruz), 1X PBS dH_20 ile sulandırılarak hazırlanmıştır.

Triton X-100 (Sigma)

Proteinaz K, 20 mg/ml stok (AppliChem)

PFA (Paraformaldehit), %2 (Sigma)

BSA (*Bovine Serum Albumin*), 0,1 g/ml (Sigma)

NaN_3 -Sodyum azit (Sigma)

Primer antikor: *rabbit* poliklonal anti-Desmin (Sigma, D8281)

Sekonder antikor: *Alexa Fluor* 488 *goat anti-rabbit IgG* (Molecular Probes)

DAPI (4', 6-diaminodino-2-fenilindol), 1mg/ml stok

Prolong® Gold antifade reagent (Molecular Probes)

35 mm petri, lazer taramalı konfokal mikroskopta görüntüleme için uygun (MatTek)

Leica DMIL floresan mikroskop

Zeiss LSM Pascal lazer taramalı konfokal mikroskop

3.2. Yöntemler

3.2.1 Zebra Balıklarının Bakımı ve İdamesi

Çalışmada kullanılan tüm zebra balıklarının bakımı ve idamesi hayvan refahı standartlarına uygun olarak gerçekleştirilmiştir. Döllenmenin hemen ardından toplanan embriyolar, 1 L'sinde 250 µl %0,01 metilen mavisi içeren 1X embriyo solüsyonu içerisinde petri kaplarına alınarak, 28 °C'ye ayarlanmış etüvde, 5 gün boyunca dışarıdan ek besin ilavesi yapılmadan büyütülmüştür. Gelişimin 6. gününde etüvden çıkarılan embriyolar, 1 aylık jüvenil döneme geçene kadar, 25-27 °C laboratuvar ortamında bulunan, sistem suyu içeren ancak sisteme bağlı olmayan akvaryumlarda, toz artemia ile beslenmiştir. Jüvenil dönemini tamamlayan zebra balıkları ise, sisteme bağlı akvaryumlara alınarak, sabah ve akşam granül yem, öğlen ise 24 saate bir kurulumu tekrarlanan taze, canlı artemia ile olmak üzere, günde toplam 3 kez beslenmiştir.

3.2.2 Zebra Balığı Kuyruk Dokusundan DNA İzolasyonu

Tez çalışmasında kullanılan, *desma KO* (-/-) ve *desmb KO* (-/-) balıkların belirlenmesi amacıyla, *desma KO*-F2 ve *desmb KO*-F2 jenerasyonlarına ait balıklardan, aşağıdaki protokol izlenerek DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir.

- DNA izolasyonu gerçekleştirilecek olan zebra balıkları, ayrı ayrı akvaryumlara alınarak numaralandırılmıştır.
- Numaralandırılan balıklar, %0,003-%0,03 oranında *Tricaine* çözeltisi içeren başka bir akvaryuma tek tek aktarılarak anestezi altına alınmıştır.
- Uyuşturulan balıkların kuyruk dokusundan, makas ve pens yardımıyla, küçük bir parça alınmıştır ve 0,5 ml'lik tüpe koyularak buza yerleştirilmiştir. İşlemi tamamlanan her balık, *Tricaine* çözeltisi içermeyen ve kendi numarasının yazılı olduğu akvaryuma geri aktarılmıştır.
- Kuyruk doku parçasının bulunduğu tüp içerisine, 50 µl NaOH çözeltisi (50 mM) eklenmiştir.

- Örnekler, 9 °C'de 30 dk. inkübe edilmiş ve ardından 4 °C'ye soğutulmuştur.
- Soğutulan örnekler üzerine, 5 µl Tris-HCl çözeltisi (40 mM, pH 8) eklenmiştir.

3.2.3 *desma* ve *desmb* İçin Yapılan PZR ve DNA Dizi Analizi Çalışmaları

Kuyruk dokusundan DNA izolasyonu gerçekleştirilen, *desma KO*-F2 jenerasyonu balıklarına ait örneklerde *desma* 1. ekson bölgesi ve *desmb KO*-F2 jenerasyonu balıklarına ait örneklerde *desmb* 1. ekson bölgesi, aşağıda belirtilen reaksiyon koşullarında, PZR ile çoğaltılmıştır; ardından DNA dizi analizine alınmıştır. PZR ve DNA dizi analizi çalışmalarında kullanılan primer dizileri, *PerlPrimer* (versiyon 1.1.21) ve *NCBI-Primer BLAST* programları kullanılarak tasarlanmıştır (Tablo 3.1.).

Tablo 3.1. *desma* 1. ekson ve *desmb* 1. ekson için tasarlanan *forward* ve *reverse* primer dizileri.

Gen/Ekson	Primer *Forward*	Primer *Reverse*	Ürün (bç)
desma ekson 1	5'-GTACGCGTGTTGAGGAAGTC-3'	5'-CACGGTTCCTCAGGTTCCTC-3'	209
desmb ekson 1	5'-ATGCCACCTCATCCTCTTCC-3'	5'-CTCATACAGGTCAGCGATGC-3'	458

<u>*desma* (ekson 1) reaksiyon karışımı:</u>

10x Taq Tamponu:	3 µl
$MgCl_2$ (25 mM):	2 µl
dNTP karışımı (10 mM):	0,6 µl
Primer *Forward* (10 mM) :	1,5 µl
Primer *Reverse* (10 mM) :	1,5 µl
DNA:	6 µl
Taq Polimeraz (5U/µl):	0,2 µl
dH_2O:	15,2 µl
Toplam:	30 µl

desma (ekson 1) reaksiyon koşulları:

95 °C - 5 dk.

95 °C - 30 sn.
59 °C - 30 sn. } x 35
72 °C - 30 sn.

72 °C - 4 dk.

+4 °C - ∞

desmb (ekson 1) reaksiyon karışımı:

10x Taq Tamponu:	3 µl
$MgCl_2$ (25 mM):	2 µl
dNTP karışımı (10 mM):	1 µl
Primer *Forward* (10 mM) :	1,5 µl
Primer *Reverse* (10 mM) :	1,5 µl
DNA:	4 µl
Taq Polimeraz (5U/µl):	0,25 µl
dH_2O:	16,75 µl
Toplam:	30 µl

desmb (ekson 1) reaksiyon koşulları:

95 °C - 5 dk.

95 °C - 30 sn.
61 °C - 30 sn. } x 35
72 °C - 30 sn.

72 °C - 4 dk.

+4 °C - ∞

PZR ürünlerinin saflaştırılması:

PZR ürünleri aşağıda belirtilen protokol izlenerek, *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega) kiti ile saflaştırılmıştır.

- PZR ürünlerinin üzerine, eşit miktarda (30 µl) *Membrane Binding* çözeltisi eklenmiştir. Her bir örneğin tamamı, toplama tüpü içerisine yerleştirilmiş *SV Mini* kolona aktarılıp, oda sıcaklığında 1 dk. bekletilmiştir.

- Örnekler 16.000 g'de 1 dk. çöktürülerek, PZR ürününün kolon membranına bağlanması sağlanmıştır. Toplama tüpünde biriken sıvı atılmıştır.

- Her örnek, 700 µl *Membrane Wash* çözeltisi eklendikten sonra, 16.000 g'de 1 dk. çöktürülmüştür. Toplama tüpünde biriken sıvı atılmıştır.

- Her örnek, 500 µl *Membrane Wash* çözeltisi eklendikten sonra, 16.000 g'de 5 dk. çöktürülmüştür. Toplama tüpünde biriken sıvı atılmıştır.

- Etanol içeren *Membrane Wash* çözeltisinin tamamen uzaklaştırılması amacıyla örnekler, 16.000 g'de 1 dk. daha çöktürülmüştür.

- Her bir kolon, toplama tüpü içerisinden alınıp, 1,5 ml'lik tüpe yerleştirilmiştir. Kolonlara 50 µl dH_2O eklendikten sonra, oda sıcaklığında 1 dk. bekletilmiştir ve ardından 16.000 g'de 1 dk. çöktürülmüştür.

- Her kolondan 1.5 ml'lik tüpe süzülen saflaştırılmış PZR ürününün konsantrasyon ve saflık değeri, NanoDrop ND-1000 cihazında, nanospektrofotometrik ölçümler ile belirlenmiştir.

DNA dizi analizi reaksiyonu karışımı:

3.1 *BigDye Terminator*:	2 µl
5X Reaksiyon Tamponu:	4 µl
Primer *Forward* ya da *Reverse* (3,2mM):	1 µl
Saflaştırılmış PZR ürünü (40ng/µl):	1 µl
dH_2O:	12 µl
Toplam:	20 µl

DNA dizi analizi reaksiyon koşulları:

94 °C - 5 dk.

94 °C - 15 sn.
50 °C - 15 sn. x 25
60 °C - 4 dk.

60 °C - 1 dk.

+4 °C - ∞

DNA dizi analizi reaksiyon ürünlerinin saflaştırılması:

- DNA dizi analizi reaksiyon ürünleri üzerine, 2 µl sodyum asetat (3 M, pH 5) eklenmiştir.
- Her bir örneğin tamamı, 1,5 ml'lik tüpe aktarıldıktan sonra, üzerine 60 µl %100 etanol eklenmiştir ve -20 °C'de bir gece boyunca bekletilmiştir.
- Örnekler, 16.000 g'de 30 dk. çöktürülmüştür. Oluşan pelete dokunmadan üst faz atılmıştır.
- Örnekler, %70 etanol eklendikten sonra, 16.000 g'de 30 dk. çöktürülmüştür. Pelete dokunmadan üst faz atılmıştır ve bir sonraki basamağa geçmeden önce peletin tamamen kuruması beklenmiştir.
- Örnekler, 20 µl Formamid eklendikten sonra, 94 °C'de 10 dk. denatüre edilmiştir ve denatürasyon bitiminde 4 °C' ye soğutulmuştur.
- Soğutulan örnekler, 3130 *Genetic Analyzer* (Applied Biosystems) cihazına yüklenerek DNA dizi analizi gerçekleştirilmiştir.
- Sonuçlar, *Chromas Lite* programı (versiyon 2.4.1) ile incelenmiştir.

3.2.4. Zebra Balığı Embriyolarının Fiksasyonu

Çalışmada kullanılan, yabanıl tip AB, *desma KO* (-/-) ve *desmb KO* (-/-) zebra balığı embriyolarını elde etmek amacıyla, her grup için erişkin dişi balıklar kendi grubundaki erişkin erkek balıklarla çaprazlanmıştır. Gerçekleştirilen çaprazlamalarla, 3 farklı genotipe sahip zebra balığı embriyoları elde edilmiştir: Yabanıl tip AB x Yabanıl tip AB: %100 yabanıl tip AB embriyolar; *desma KO* (-/-) x *desma KO* (-/-): %100 *desma KO* (-/-) embriyolar; *desmb KO* (-/-) x *desmb KO* (-/-): %100 *desmb KO* (-/-) embriyolar.

Embriyoların transparanlığını korumak amacıyla, gelişimin 22. saatinden itibaren, 1X embriyo solüsyonu içerisine %0,003 oranında hazırlanmış pigmentasyonu önleyici PTU ajanı ilave edilmiştir.

Fiksasyon protokolü uygulanacak olan embriyoların koryon zarından ayrılmış olması gerekmektedir. Embriyolar, döllenmeden sonra yaklaşık 3. günde koryon zarından çıkmaktadır. Bu nedenle, protokol uygulanmadan önce, 24 ve 48 saatlik embriyoların koryon zarları, embriyolara zarar vermeyecek şekilde, mikroskop altında enjeksiyon iğneleri yardımıyla uzaklaştırılmıştır.

Her gruba ait embriyolar, döllenmenin ardından toplanarak, gelişimin 24, 48, 72, 96 ve 120. saatlerinde gerçekleştirilen *in sitü* hibridizasyon ve 96. saatte gerçekleştirilen immünfloresan boyama deneylerinde kullanılmak üzere, aşağıda belirtilen protokol izlenerek fikse edilmiştir.

- İstenilen gelişim safhasındaki embriyolar, her birinde yaklaşık 30 embriyo olacak şekilde, 1,5 ml'lik tüplere aktarılmıştır. Embriyo solüsyonu uzaklaştırıldıktan sonra, her tüpe, %4 oranında PFA içeren 1X PBS çözeltisi eklenmiştir ve -20 °C'de 1 gece boyunca bekletilmiştir.

- PFA içeren çözelti uzaklaştırıldıktan sonra, 1X PBS ile 2 kez 5 dk. yıkama yapılmıştır. 1X PBS uzaklaştırılmıştır.

- Yarı yarıya hazırlanmış 1X PBS ve saf metanol karışımı ile 5 dk. yıkama yapılmıştır. Karışım uzaklaştırılmıştır.

- Saf metanol ile 5 dk. yıkama yapılmıştır.

- Yıkamanın ardından, tüp içerisinde bulunan saf metanol tazelenmiştir. Fiksasyonu tamamlanan embriyolar, deneylerde kullanılana kadar –20 °C'de saklanmıştır.

3.2.5. Zebra Balığı Embriyolarından Total RNA İzolasyonu

Zebra balığı embriyolarından total RNA izolasyonu gerçekleştirmek amacıyla, yabanıl tip AB grubundan dişi ve erkek balıklar, *desma KO* (-/-) grubundan dişi ve erkek balıklar, *desmb KO* (-/-) grubundan dişi ve erkek balıklar çaprazlanmıştır. Çaprazlamalar sonucunda, yabanıl tip AB, *desma KO* (-/-) (%100) ve *desmb KO* (-/-) (%100) embriyolar elde edilmiştir. Her grupta elde edilen embriyolardan,

döllenmeden sonraki 96. saatte, aşağıdaki protokol uygulanarak RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir.

- Yaklaşık 20 embriyo 1,5 ml'lik nükleazsız tüpe alınmıştır ve ardından, tüp içerisindeki tüm sıvı çekilmiştir.
- Eppendorf tüplere 250 µl *TRItidy G* eklendikten sonra, *RNAse Zap* ile temizlenmiş bir pens yardımıyla yaklaşık 20 kez mekanik kuvvet uygulanarak, sıvı içerisindeki embriyolar homojen hale getirilmiştir.
- 750 µl daha *TRItidy G* ilave edilerek total miktar 1 ml'ye çıkarılmıştır ve örnekler oda sıcaklığında 5 dk. bekletilmiştir.
- Tüplere 200 µl kloroform eklendikten sonra, 15 sn. elde çalkalanmıştır ve 2 dk. oda sıcaklığında bekletilmiştir.
- Örnekler, +4°C'de 12.000g'de 15 dk. çöktürülmüştür ve çöktürme işlemi sonucunda şeffaf bir üst faz oluşmuştur. RNA'nın da bulunduğu şeffaf faz, alttaki fazı çekmemeye dikkat ederek, yeni bir nükleazsız 1.5 ml'lik tüpe aktarılmıştır.
- Örneklerin üzerine 500 µl izopropanol eklendikten sonra, oda sıcaklığında 10 dk. bekletilerek RNA'nın presipite olması sağlanmıştır. Ardından, +4 °C'de 12.000g'de 10 dk. çöktürülmüştür
- Tüp tabanında oluşan RNA peletine dokunmadan tüm sıvı çekilmiştir ve pelet üzerine 1 ml %75 etanol eklenmiştir.
- Örnekler, +4 °C'de 7.500g'de 5 dk. çöktürülmüştür. Tüp tabanında yeniden oluşan RNA peletine dokunmadan tüm sıvı çekildikten sonra, peletin kuruması sağlanmıştır.
- Kuruyan pelet üzerine 30 µl nükleazsız su eklenmiştir ve 55 °C'ye ayarlanmış sıcak blok üzerinde 10 dk. denatüre edilmiştir.

- RNA izolasyonu tamamlandıktan sonra, NanoDrop ND-1000 cihazında nanospektrofotometrik ölçümler gerçekleştirilmiştir.

3.2.6 cDNA Sentezi

Yabanıl tip AB, *desma KO* (-/-) ve *desmb KO* (-/-) embriyolara ait RNAlardan cDNA sentezi, *QuantiTect Reverse Transcription Kit* (Qiagen) kullanılarak ve aşağıdaki protokol izlenerek gerçekleştirilmiştir. cDNA sentezi çalışmasında kullanılan tüm malzemeler, *RNase Zap* ve %0,1 oranında hazırlanan DEPC ile ribonükleazlardan arındırılmıştır.

Genomik DNA *Wipeout* reaksiyonu:

7X gDNA *Wipeout* Tamponu:	2 µl
Kalıp RNA:	x µl (500 ng/µl olacak şekilde)
Nükleazsız dH_2O:	(12-x) µl
Toplam:	14 µl

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

Her bir örnek üzerine, aşağıda belirtilen koşullarda hazırlanmış *Reverse* transkripsiyon karışımından 6 µl eklenmiştir (toplam miktar 20 µl) ve örnekler *Gene Amplification PCR System* 9700 (ABI) cihazında inkübe edilmiştir.

Reverse transkripsiyon karışımı:

Quantiscript RT:	1 µl
5X Quantiscript RT Tampon:	4 µl
RT Primer Karışımı:	1 µl
Toplam:	6 µl

Reaksiyon koşulları:

42 °C - 30 dk.

95 °C - 5 dk.

+4 °C - ∞

Sentezlenen cDNA'lar, dH□O ile 1:4 oranında sulandırılarak kullanılmıştır.

3.2.7. *İn Sitü* Hibridizasyon Çalışmaları İçin Prob Sentezi

İn sitü hibridizasyon çalışmalarında kullanılmak üzere, desma ve desmb mRNA dizilerini özgül olan *digoxigenin* işaretli problar, aşağıdaki protokol izlenerek sentezlenmiştir. Kalıp DNA hazırlanması aşamasında, yabanıl tip AB zebra balığı cDNA'sı kullanılmıştır. Hem *desma* hem de *desmb* ifadesi için iki çeşit prob sentezlenmiştir; mRNA dizisine komplementer olan *antisense* prob ve mRNA ile aynı diziye sahip *sense* prob (negatif kontrol). *Antisense* prob sentezi için kullanılan primer dizileri T3 promotörü, *sense* prob sentezi için kullanılan primer dizileri ise T7 promotörü içermektedir (Tablo 3.2.).

Tablo 3.2. Desma ve desmb mRNAlarına özgül probların (*antisense* ve *sense*) sentezinde kullanılan primer dizileri. *Antisense* prob primerleri T3 promotörü (kırmızı), *sense* prob primerleri ise T7 promotörü (yeşil) içermektedir. Tabloda belirtilen primer dizileri kullanılarak sentezlenen problar; 1248 bç (*desma sense* ve *antisense*), ve 1033 bç (*desmb sense* ve *antisense*) uzunluğundadır.

desma antisense-forward	5'-TACATCGAGAAGGTGCGCTT-3'
desma antisense-reverse	5'-GGATCCATTAACCCTCACTAAAGGGAATTGTCTCCATGCGTCATCCA-3'
desma sense-forward	5'-TAATACGACTCACTATAGGGAGATACATCGAGAAGGTGCGCTT-3'
desma sense-reverse	5'-TTGTCTCCATGCGTCATCCA-3'
desmb antisense-forward	5'-AATGACCGCTTCGCCAACTA-3'
desmb antisense-reverse	5'-GGATCCATTAACCCTCACTAAAGGGAACCTCTCCATCACGTGTCTCG-3'
desmb sense-forward	5'-TAATACGACTCACTATAGGGAGAAATGACCGCTTCGCCAACTA-3'
desmb sense-reverse	5'-CCTCTCCATCACGTGTCTCG-3'

Kalıp DNA hazırlanması:

Q5 Polimeraz (2000 U/ml)	0,5 µl
5X Q5 Polimeraz Tamponu	10 µl
dNTP karışımı (10 mM)	1 µl
Primer *Forward* (10 mM)	2,5 µl
Primer *Reverse* (10 mM)	2,5 µl
cDNA (yabanıl tip AB)	1 µl
dH_2O	32,5 µl
Toplam:	50 µl

Reaksiyon koşulları:

98 °C - 35 sn.

98 °C - 15 sn.
67 °C - 20 sn.
72 °C - 1 dk. 30 sn.
} x 35

72 °C - 1 dk.

+4 °C - ∞

İn vitro transkripsiyon:

İn vitro transkripsiyon aşamasında kullanılan malzemeler, *RNase Zap* ve %0,1 oranında hazırlanan DEPC ile ribonükleazlardan arındırılmıştır. Reaksiyon karışımı hazırlanırken kullanılan malzemeler, aşağıda belirtilen sıra izlenerek oda sıcaklığında bir araya getirilmiştir.

Kalıp DNA, 200 ng (*sense* ya da *antisense*)	x µl
Nükleazsız dH_2O	11-x µl
DIG RNA Labeling Mix	2 µl
5X Transkripsiyon Tamponu	4 µl
RiboLock RI	0,5 µl
T3 RNA Polimeraz (T3 ya da T7)	2 µl
DTT (0,1 M)	1 µl
Toplam:	20,5 µl

- Örnekler 37 °C'de 2 saat inkübe edilmiştir.
- İnkübasyon tamamlandığında örneklerden (37 °C'den çıkarmadan) 1 µl alınarak %1'lik agaroz jelde probların özgüllüğü kontrol edilmiştir.
- Örneklerin üzerine, 1 µl *DNAse I* eklenmiş ve 37 °C'de 15 dk. inkübe edilmiştir.
- Her bir örneğe 10 µl 50 mM EDTA eklenerek reaksiyon durdurulmuştur.

İn vitro transkripsiyon ile sentezlenen *digoxigenin* işaretli problar, *Illustra ProbeQuant G-50 Micro Columns Kit* (GE Healthcare) kullanılarak aşağıdaki protokol izlenerek saflaştırılmıştır.

- Sentezlenen RNA probunun miktarı, *Probe Buffer type 1* ile 50 µl'ye tamamlanmıştır.
- Kolon içerisindeki akışkan madde, vorteks yardımıyla, tekrar süspansiyon hale getirilmiştir.
- Kolon, üst kapağı hafifçe gevşetildikten sonra, toplama tüpü üzerine yerleştirilmiş ve 735 g'de 1 dk. çöktürülerek içerisindeki akışkan maddenin katılaşması sağlanmıştır.
- Her kolon toplama tüpünden alınıp, nükleazdan arındırılmış yeni 1,5 ml'lik bir tüp üzerine aktarılmıştır.

- Örnekler, kolonların içerisindeki katı maddenin tam ortasına gelecek şekilde yüklenmiştir ve 735 g'de 2 dk. çöktürülmüştür.
- Problar, 1,5 ml'lik tüpte biriken sıvı içerisinde bulunmaktadır. Son hacim nükleazsız dH_2O ile 100 µl'ye tamamlandıktan sonra, 10 µl'lik alikotlar halinde -80 °C'de saklanmıştır.

3.2.8 Tüm Örnek *İn Sitü* Hibridizasyon ve Dondurulmuş Kesitler

Dokularda mRNA yerleşimini gözlemlemek amacıyla gerçekleştirilen *in sitü* hibridizasyon çalışmasında, döllenmeden sonra 24, 48, 72, 96 ve 120. saatlerde fikse edilmiş yabanıl tip AB, *desma KO* (-/-) ve *desmb KO* (-/-) zebra balığı embriyoları kullanılmıştır. Belirtilen üç grupta da, hem desma *sense* ve *antisense* hem de desmb *sense* ve *antisense* probları kullanılarak, aşağıdaki protokol uygulanmıştır. Problar ile yapılan işaretlemelerle, desma ve desmb transkriptlerinin dokuya özgül yerleşiminin gösterilmesi amaçlanmıştır.

1. Gün:

- Fikse edilmiş embriyoların bulunduğu 1,5 ml'lik tüplerden saf metanol çekildikten sonra, yarı yarıya hazırlanmış saf metanol ve PBTw (%0,01 oranında Tween-20 içeren 1X PBS çözeltisi) karışımı ile 5 dk. yıkama yapılmıştır.

- 2 kez 5 dk. PBTw ile yıkama yapılmıştır.

- Gelişimin 24. saatinden daha büyük olan embriyolar, PBTw içerisinde hazırlanmış 20 µg/µl Proteinaz K çözeltisi ile oda sıcaklığında, 1 saat permeabilize edilmiştir. (Gelişimin 24. saatinde fikse edilen embriyolar için, bu ve bir sonraki basamak atlanmıştır.)

- Permeabilizasyon reaksiyonunu durdurmak için, PBTw içerisinde 2:100 oranında sulandırılmış 0,1 M glisin çözeltisi ile 2 kez 5 dk. yıkama yapılmıştır.

- Embriyolar, %4 oranında PFA içeren 1X PBS çözeltisi içerisinde, oda sıcaklığında 20 dk. yeniden fikse edilmiştir.

- 2 kez 5 dk. PBTw ile yıkama yapılmıştır.

- Yarı yarıya hazırlanmış prehibridizasyon çözeltisi ve PBTw karışımı ile 5 dk. yıkama yapılmıştır.

- Embriyolar, prehibridizasyon çözeltisi içerisine 5 µl/ml heparin (100 mM) ve 10 µl/ml *yeast* tRNA (50 mM) eklenerek hazırlanmış hibridizasyon çözeltisi ile 65 °C' ye ısıtılmış hibridizasyon fırınında, 1 saat boyunca inkübe edilmiştir.

- *Digoxigenin* işaretli Prob (*sense* ya da *antisense*), hibridizasyon çözeltisi içerisinde 1:100 oranında sulandırılarak hazırlanmıştır. Embriyolar, prob içeren hibridizasyon çözeltisi içerisinde, 65 °C' ye ayarlanmış çalkalamalı hibridizasyon fırınında gece boyunca bırakılmıştır ve probun dokulardaki özgül mRNA'lar ile hibridizasyonu sağlanmıştır.

<u>2. Gün:</u>

- Prehibridizasyon çözeltisi ile 65 °C' de 10 dk. yıkama yapılmıştır.
- Yarı yarıya hazırlanmış prehibridizasyon çözeltisi ve 2X SSC karışımı ile 65 °C' de 10 dk. yıkama yapılmıştır (Bu aşamada kullanılan 2X ve 0,2X SSC karışımları, PBTw ile sulandırılarak hazırlanmıştır).
- 2X SSC ile 65 °C' de 10 dk. yıkama yapılmıştır.
- 0,2X SSC ile 65 °C' de, 4 kez 15 dk. yıkama yapılmıştır.
- Yarı yarıya hazırlanmış 0,2X SSC ve MATw (Maleik asit tamponu içerisinde %0,01 oranında hazırlanmış Tween-20) karışımı ile oda sıcaklığında 5 dk. yıkama yapılıştır.
- 5 dk. MATw ile yıkama yapılmıştır.
- Bloklama çözeltisi, oda sıcaklığında 1 saat boyunca embriyolara uygulanmıştır.

- Antikor (*Anti-Digoxigenin-AP*) bloklama çözeltisi içerisine 1:5000 oranında hazırlanmıştır ve oda sıcaklığında 5 dk. ardından, +4 °C' de gece boyunca embriyolara uygulanmıştır.

3. Gün:

- Antikor içeren bloklama çözeltisi içerisindeki embriyolar, +4 °C'den çıkarılıp, oda sıcaklığında 1 saat daha inkübe edilmiştir.
- 6 kez 15 dk. MATw ile yıkama yapılmıştır.
- 2 kez 10 dk. renklendirme çözeltisi ile yıkama yapılmıştır.
- NBT/BCIP karışımı, renklendirme çözeltisi içerisine %2 oranında ilave edilmiş ve oda sıcaklığında, ışık görmeyecek şekilde embriyolara uygulanmıştır. Bu aşama, embriyolarda istenilen koyulukta renk oluşuncaya kadar devam etmiştir. Renk oluşumu, her 15-30 dakikada mikroskop altında kontrol edilmiştir. (Bu reaksiyonu yavaşlatmak ya da hızlandırmak için sıcaklık, +4 °C ile 37 °C arasında değiştirilebilmektedir).
- Renk oluşumu istenilen koyuluğa eriştiğinde reaksiyonunu durdurmak için, içerisinde 20 mM EDTA çözülerek hazırlanmış PBTw ile 4 kez 5 dk. yıkama yapılmıştır.
- Özgül olmayan arka plan boyanmalarının giderilmesi amacıyla, 5 dk. yarı yarıya hazırlanmış saf metanol ve PBTw karışımıyla, ardından 5 dk. saf metanol ile yıkama yapılmıştır. Embriyolar tekrar, yarı yarıya hazırlanmış saf metanol ve PBTw karışımı içerisine alınarak, +4 °C'de gece boyunca yıkanmıştır.

4. Gün:

- Embriyolar saf gliserol içerisine alınmıştır ve görüntüleme işlemi gerçekleştirilinceye kadar, +4 °C'de, ışık görmeyecek şekilde saklanmıştır.
- Görüntüleme işlemi sırasında embriyolar, mikroskop altında uygun pozisyonlarını ayarlamayı kolaylaştıran, %5 oranında PBTw içeren

gliserol çözeltisi içerisine alınmıştır. Sonuçlar, *Leica* M205-C markalı mikroskop kullanılarak görüntülenmiştir.

Döllenmeden sonra 96. ve 120. saatte tüm örnek *in sitü* hibridizasyon deneyine alınan embriyolar aşağıdaki protokol izlenerek sıvı azotta dondurulmuş ve ardından transversal kesitler alınmıştır. Alınan dondurulmuş kesitlerde, dokularda gerçekleşen özgül boyanmaların yerleşimleri daha detaylı olarak incelenmiştir.

- Gliserol içerisinde bulunan embriyolar, oda sıcaklığında 2 kez PBTw ile yıkanmıştır.
- Her bir embriyo ayrı bir *mold* ortasına yerleştirilmiş ve ortamdaki tüm sıvı çekilmiştir.
- Üzeri tamamen *Tissue-Tek OCT Compound* dolgu maddesi ile kaplandıktan sonra, embriyonun pozisyonu mikroskop altında ayarlanarak not edilmiştir.
- *Mold* içerisinde dolgu maddesi ile kaplanan embriyolar, sıvı azotta dondurulmuştur.
- Dondurulmuş embriyolardan, *Leica* CM1900 kriyostat cihazında transversal kesitler alınarak ışık mikroskobu altında inceleme yapılmıştır.

3.2.9. Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Döllenmeden sonra 96. saatte izole edilen yabanıl tip AB, *desma KO* (-/-) ve *desmb KO* (-/-) zebra balıklarının cDNA'ları kullanılarak *actb1*, *desma* ve *desmb* amplifikasyon reaksiyonları aşağıda belirtilen koşullarda, *Corbett Life Sciences Rotor-Gene* 6000 cihazında gerçekleştirilmiştir. Çalışmada kullanılan primer dizileri, *PerlPrimer* (versiyon 1.1.21) ve *NCBI-Primer BLAST* programları kullanılarak tasarlanmıştır (Tablo 3.3.).

Tablo 3.3. *desma*, *desmb* ve *actb1* genleri için tasarlanan *forward* ve *reverse* primer dizileri.

Gen	Primer *Forward*	Primer *Reverse*	Ürün (bç)
desma	5'-GCTGCCAAGAATATCAGCGA -3'	5'-TGCCTCCTCAGAGACTCATT-3'	190
desmb	5'-ATGCAAGAGACCCAAGTCCA-3'	5'-TCTTGCTCACAGCCTGGTTA-3'	169
actb1	5'-TCTTCCAGCCTTCCTTCCTG-3'	5 TGTGTTGGCATACAGGTCCT 3	109

actb1, desma, desmb kGZ-PZR koşulları:

SensiFAST SYBR No-ROX: 5 µl

Primer *Forward* (10 mM) : 0,4 µl

Primer *Reverse* (10 mM): 0,4 µl

dH_2O: 2,2 µl

cDNA: 2 µl

Toplam: 10 µl

actb1 reaksiyon koşulları:

Denatürasyon: 94 °C 2dk.

Amplifikasyon: 94 °C 15 sn.

59 °C 60 sn.

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

desma reaksiyon koşulları:

Denatürasyon: 95 °C 5 dk.

Amplifikasyon: 95 °C 30 sn.

56 °C 45 sn.

72 °C 30 sn.

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

desmb reaksiyon koşulları:

Denatürasyon:	95 °C 2dk.
Amplifikasyon:	95 °C 30 sn.
	61 °C 30 sn.
	72 °C 15 sn.
Erime:	72 °C'den 95 °C'ye, her aşamada 1 °C artarak.

Elde edilen veriler, *Rotor-Gene 6000 Series Software* 1.7 yazılımı ile analiz edilmiştir. Belirtilen yazılım kullanılarak, standart dilüsyon örnekleri ile standart eğri oluşturulmuş ve ΔΔCt yöntemi ile göreceli kantitasyon hesabı yapılmıştır. Ayrıca amplifikasyonun özgüllüğü, erime eğrileri çizilerek ve amplifikasyon ürünlerinin 1X TAE ile hazırlanmış %3'lük agaroz jel elektroforezinde yürütülmesiyle doğrulanmıştır. Yabanıl tip AB, *desma KO* (-/-) ve *desmb KO* (-/-) zebra balığı örneklerinde, *desma* ve *desmb* transkriptlerinin göreceli ifadesi, *actb1* ifadesine göre normalize edilerek hesaplanmıştır.

3.2.10. Tüm Örnek İmmünfloresan Boyama

Yabanıl tip AB, *desma KO* (-/-) ve *desmb KO* (-/-) zebra balığı embriyolarında desma ve desmb proteinlerinin yerleşimi, her iki proteini de tanıyan *rabbit* poliklonal anti-Desmin (Sigma, D8281) antikoru kullanılarak ve aşağıda belirtilen protokol izlenerek, tüm örnek immünfloresan boyama yöntemiyle incelenmiştir. İmmünfloresan boyama deneylerinde kullanılan embriyolar, döllenmeden sonra 96. saatte fikse edilmiştir. DAPI çekirdek boyası, görüntülemeler sırasında embriyoların genel hatlarını belirlemek amacıyla kullanılmıştır.

- Fikse edilmiş embriyoların bulunduğu 1,5 ml'lik tüplerden saf metanol çekildikten sonra, 2 kez 5 dk. PBTx çözeltisi (1X PBS içerisinde hazırlanmış %0,01 Triton X-100) ile yıkama yapılmıştır.

- Embriyolar, 20 µg/µl konsantrasyonda Proteinaz K içeren PBTx çözeltisi içerisinde, oda sıcaklığında 2 saat boyunca permeabilize edilmiştir.
- %2 PFA içeren 1X PBS çözeltisi içerisinde oda sıcaklığında 20 dk. yeniden fiksasyon yapılmıştır.
- 2 kez 5 dk. PBTx çözeltisi ile yıkama yapılmıştır.
- Embriyolara, PBTx içerisine %5 oranında hazırlanmış 0,1 gr/ml BSA‘dan oluşan bloklama çözeltisi, oda sıcaklığında 2 saat uygulanmıştır.
- Primer antikor, antikor çözeltisi (%2 BSA içeren PBTx-sodyum azit) içerisinde 1:20 oranında sulandırılmış ve +4 °C’de 2 gece boyunca uygulanmıştır.
- 4 kez 15 dk. PBTx ile yıkama yapılmıştır.
- Sekonder antikor (*Alexa Fluor* 488 *goat* anti-*rabbit* IgG), antikor çözeltisi içerisinde 1:1000 oranında hazırlanmıştır. Sekonder antikorun eklendiği antikor çözeltisine 1:1000 oranında seyreltilmiş DAPI çekirdek boyası da eklenerek +4 °C’de 2 gece boyunca, ışık görmeyecek şekilde uygulanmıştır.
- 4 kez 15 dk. PBTx ile ışık görmeyecek şekilde yıkama yapılmıştır.
- Embriyolar 35 mm’lik petrilere alınıp, üzerleri *Prolong® Gold antifade reagent* ile kaplandıktan sonra, lamel kapatılarak +4 °C’de ışık görmeyecek şekilde saklanmıştır.
- Sonuçlar, *Leica* DMIL floresan mikroskobunda görüntülenmiştir. Ardından, *Zeiss LSM Pascal* lazer taramalı konfokal mikroskobunda, tüm örnekten kademeli olarak alınan kesit görüntüleriyle, boyanan doku ve organlar incelenmiştir.

4. BULGULAR

4.1 DNA Dizi Analizi ile *desma KO* (-/-) ve *desmb KO* (-/-) Zebra Balıklarının Belirlenmesi

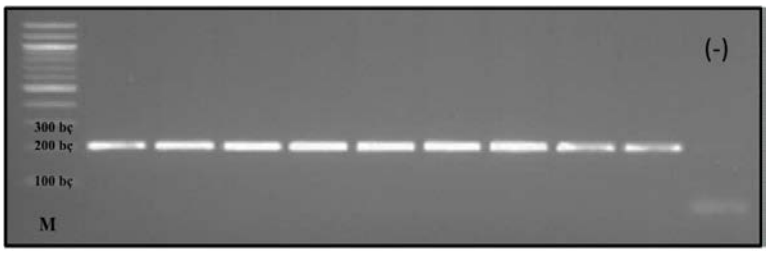
Tez çalışmasında *desma KO* **(-/-)** ve *desmb KO* **(-/-)** zebra balıklarının genotiplerinin belirlenmesi için, bu iki gene ait *KO*-F2 jenerasyonundaki erişkin balıkların kuyruk dokularından DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. İzole edilen DNA'ların konsantrasyon ve saflığı nanospektrofotometrik ölçümlerle belirlenmiştir (Tablo 4.1.). Ardından, *desma KO*-F2 jenerasyonuna ait balıklar için *desma* 1. ekson bölgesi, *desmb KO*-F2 jenerasyonuna ait balıklar için ise *desmb* 1. ekson bölgesi PZR ile çoğaltılmıştır. PZR ürünleri saflaştırıldıktan sonra, örneklerin konsantrasyonu ve saflığı nanospektrofotometrik ölçümlerle belirlenmiştir (Tablo 4.2.). Ayrıca amplifikasyon ürünlerinin özgüllüğü, %3'lük agaroz jel elektroforezi ile doğrulanmıştır (Şekil 4.1. ve Şekil 4.2.).

Tablo 4.1. Kuyruk dokusundan izole edilen DNA'ların nanospektrofotometrik ölçüm değerleri.

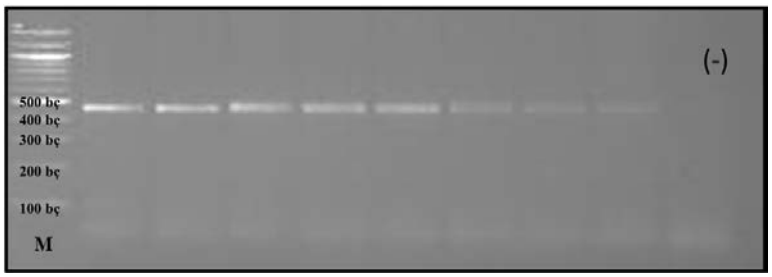
Zebra Balığı Numarası	Konsantrasyon Değeri (ng/µl)	260/280 Absorbans Değeri (OD)
desma-F2-1	258,8	1,75
desma-F2-2	158,6	1,70
desma-F2-3	179	1,87
desma-F2-4	323,6	1,83
desma-F2-5	245,5	1,77
desma-F2-6	318	1,80
desma-F2-7	245,4	1,84
desma-F2-8	384,7	1,76
desma-F2-9	226,4	1,72
desmb-F2-1	134	1,80
desmb-F2-2	279	1,87
desmb-F2-3	258,5	1,76
desmb-F2-4	240,9	1,72
desmb-F2-5	234	1,83
desmb-F2-6	287,7	1,69
desmb-F2-7	268	1,80
desmb-F2-8	234,1	1,75

Tablo 4.2. Saflaştırılmış *desma* PZR ve *desmb* PZR ürünlerinin nanospektrofotometrik ölçüm değerleri.

Zebra Balığı Numarası	Konsantrasyon Değeri (ng/µl)	260/280 Absorbans Değeri (OD)	260/230 Absorbans Değeri (OD)
desma-F2-1	42	1,73	1,73
desma-F2-2	50,6	1,70	1,95
desma-F2-3	46,2	1,85	1,77
desma-F2-4	51	1,74	1,89
desma-F2-5	37,6	1,80	1,94
desma-F2-6	44,2	1,80	1,66
desma-F2-7	52,2	1,82	1,75
desma-F2-8	39	1,77	1,88
desma-F2-9	37,6	1,82	2,03
desmb-F2-1	45	1,89	1,80
desmb-F2-2	39,6	1,80	1,72
desmb-F2-3	52,7	1,74	1,70
desmb-F2-4	39	1,74	1,72
desmb-F2-5	42,3	1,79	1,77
desmb-F2-6	23,9	1,80	1,89
desmb-F2-7	36	1,76	1,83
desmb-F2-8	33	1,77	1,91

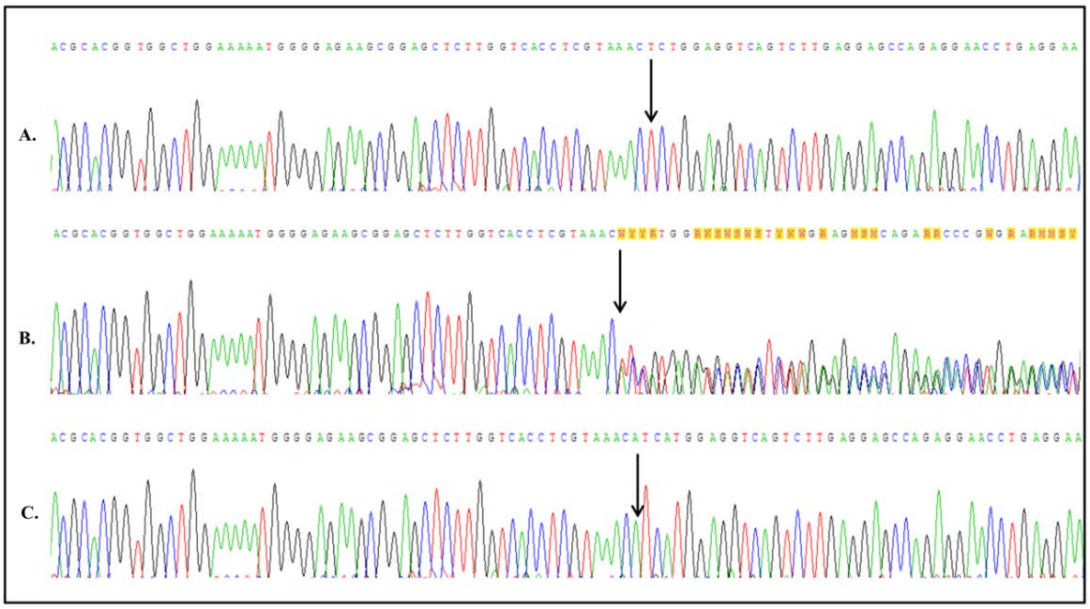


Şekil 4.1. Saflaştırılmış *desma* PZR ürünlerinin (209 bç) %3'lük agaroz jel elektroforezi görüntüsü. Örnekler sırasıyla *desma*-F2 jenerasyonundan 1-9 numaralı balıklara ait sonuçları göstermektedir. M: 100 bç moleküler ağırlık belirteci. (-): Negatif kontrol.



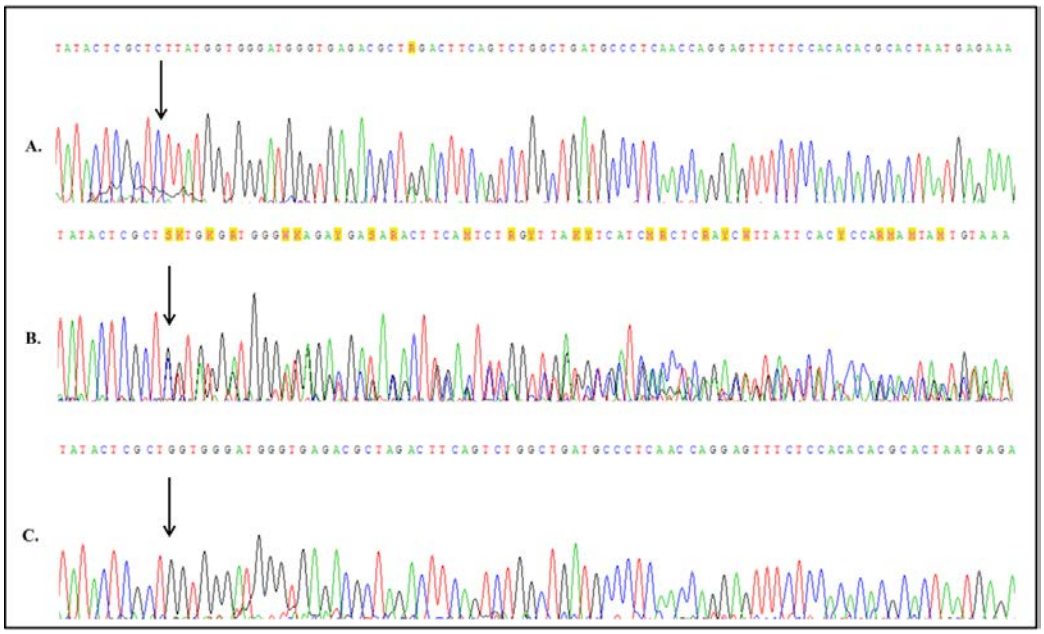
Şekil 4.2. Saflaştırılmış *desmb* PZR ürünlerinin (458 bç) %3'lük agaroz jel elektroforezi görüntüsü. Örnekler sırasıyla *desmb*-F2 jenerasyonundan 1-8 numaralı balıklara ait sonuçları göstermektedir M: 100 bç moleküler ağırlık belirteci. (-): Negatif kontrol.

DNA dizi analizine alınan *desma KO*-F2 jenerasyonuna ait erişkin balıklar içerisinden, yabanıl tip, *desma KO* (+/-) ve *desma KO* (-/-) zebra balıkları belirlenmiştir (Şekil 4.3.).



Şekil 4.3. *desma KO*-F2 jenerasyonundaki zebra balıklarında, *desma* ekson 1 bölgesine ait kromatogram görüntüleri. Siyah ok çerçeve kayması mutasyonunun başlangıç bölgesini göstermektedir. A: yabanıl tip. B: *desma KO* (+/-). C: *desma KO* (-/-).

DNA dizi analizine alınan *desmb KO*-F2 jenerasyonuna ait erişkin balıklar içerisinden, yabanıl tip AB, *desmb KO* (+/-) ve *desmb KO* (-/-) zebra balıkları belirlenmiştir (Şekil 4.4.).



Şekil 4.4. *desmb KO*-F2 jenerasyonundaki zebra balıklarında, *desmb* ekson 1 bölgesine ait kromatogram görüntüleri. Siyah ok çerçeve kayması mutasyonunun başlangıç bölgesini göstermektedir. A: yabanıl tip. B: *desmb KO* (+/-). C: *desmb KO* (-/-).

DNA dizi analizi sonuçlarına göre, *desma KO* **(-/-)** zebra balıkları *desma* 1. ekson bölgesinde, 134. nükleotit pozisyonunda, 2 bç delesyon ve 4 bç insersiyon taşımaktadır. Oluşan mutasyon (c.134_136delGAinsTGAT) okuma çerçevesini bozarak, 50. aminoasit pozisyonunda erken dur kodonu oluşmasına neden olmaktadır (p.Arg45Met*50). *desma KO* (-/-) zebra balıklarında oluşan bu mutasyon sonucunda, desma-1 ve desma-2 protein izoformlarının her ikisinin de sentezi engellenmektedir. Benzer şekilde, *desmb KO* **(-/-)** zebra balıklarında, *desmb* 1. ekson 245. nükleotit pozisyonunda, 5 bç delesyon mutasyonu sonucu (c.245_250delCTTAT) okuma çerçevesinin bozulması ile 86. aminoasit pozisyonunda erken dur kodonu oluşmaktadır (p.Ser82Trp*86). Çerçeve kayması mutasyonları sonucunda oluşan erken dur kodonlarının, desma ve desmb proteinlerinin aminoasit dizisi üzerinde yarattığı değişiklik Şekil 4.5 ve Şekil 4.6. ’da gösterilmiştir.

```
desma        MSTKYSASAESASSYRRTFGSGLGSSIFAGHGSSGSSGSSRLTSRVYEVTKSSASPHFSSHRASGSFGGGSVVRSYAG
p.Arg45Met*50 MSTKYSASAESASSYRRTFGSGLGSSIFAGHGSSGSSGSSRLTSMMFTR*

              LGEKLDFNLADAINQDFLNTRTNEKAELQHLNDRFASYIEKVRFLEQQNSALTVEIERLRGREPTRIAELYEEEMREL

              RRQVEALTNQRSRVEIERDNLVDDLQKLKLRLQEEIHQKEEAENNLSAFRADVDAATLARLDLERRIEGLHEEIAFL

              RKIHEEEIRELQNQMQESQVQIQMDMSKPDLTAALRDIRLQYEAIAAKNISEAEDWYKSKVSDLNQAVNKNNEALR

              EAKQETMQFRHQLQSYTCEIDSLKGTNESLRRQMSEMEERLGREAGGYQDTIARLEAEIAKMKDEMARHLREYQD

              LLNVKMALDVEIATYRKLLEGEESRISLPVQSFSSLSFRESSPEQHHHQQQQPQRSSEVHSKKTVLIKTIETRDGETRT

              TSEGMSALSAQRVVSESTQHQQDVM
```

Şekil 4.5. Yabanıl tip desma protein dizisi (üstte) ve *desma KO* (-/-) zebra balıklarında p.Arg45Met*50 mutasyonu sonucu oluşan desma protein dizisi (altta, yeşil ile çerçevelenmiş). mRNA'nın okuma çerçevesinin kayması sonucu, ilk değişikliğin oluştuğu aminoasit (kırmızı) ve erken dur kodonu pozisyonu (*) gösterilmiştir.

```
desmb        MSHSYATSSSSSYRRMFGGPGYMTPPMSRGVFGRASTGGSGSSRVSSRVYEVSKSSTSSPGFSGYRASSYSMPNLSA
p.Ser82Trp*86 MSHSYATSSSSSYRRMFGGPGYMTPPMSRGVFGRASTGGSGSSRVSSRVYEVSKSSTSSPGFSGYRASSYSMPNLSA

              GYTRSYGGMGETLDFSLADALNQEFLHTRTNEKAELQHLNDRFANYIEKVRMLEQQNQVLGVEVERLRGREPTRI
              GYTRWWDG*

              ADLYEDEMRELRREVEVVTNHRSRVEVERDNLADDLQKLKLRLQEEIALREEAENNLSAFRADVDAATLARLDLE

              RRIETLQEEIAFLKKIHEEEIRELQAQMQETQVQIQMDMSKPDLTAALRDIRAQYEGIAAKNIAEAEDWYKSKVSDL

              NQAVSKNNEALKQSKLETMEYRHQIQSYTCEIDSLKGSNESLMRQMRDMEDRHGREAGALQDTIARLEAEIANMK

              DEMARHLREYQDLLNVKMALDVEIATYRKLLEGEESRIVMPMQSYSTISFRETSPEHQQRASEMHSKKTVLIKTIET

              RDGEVVSESTQHQQDLM
```

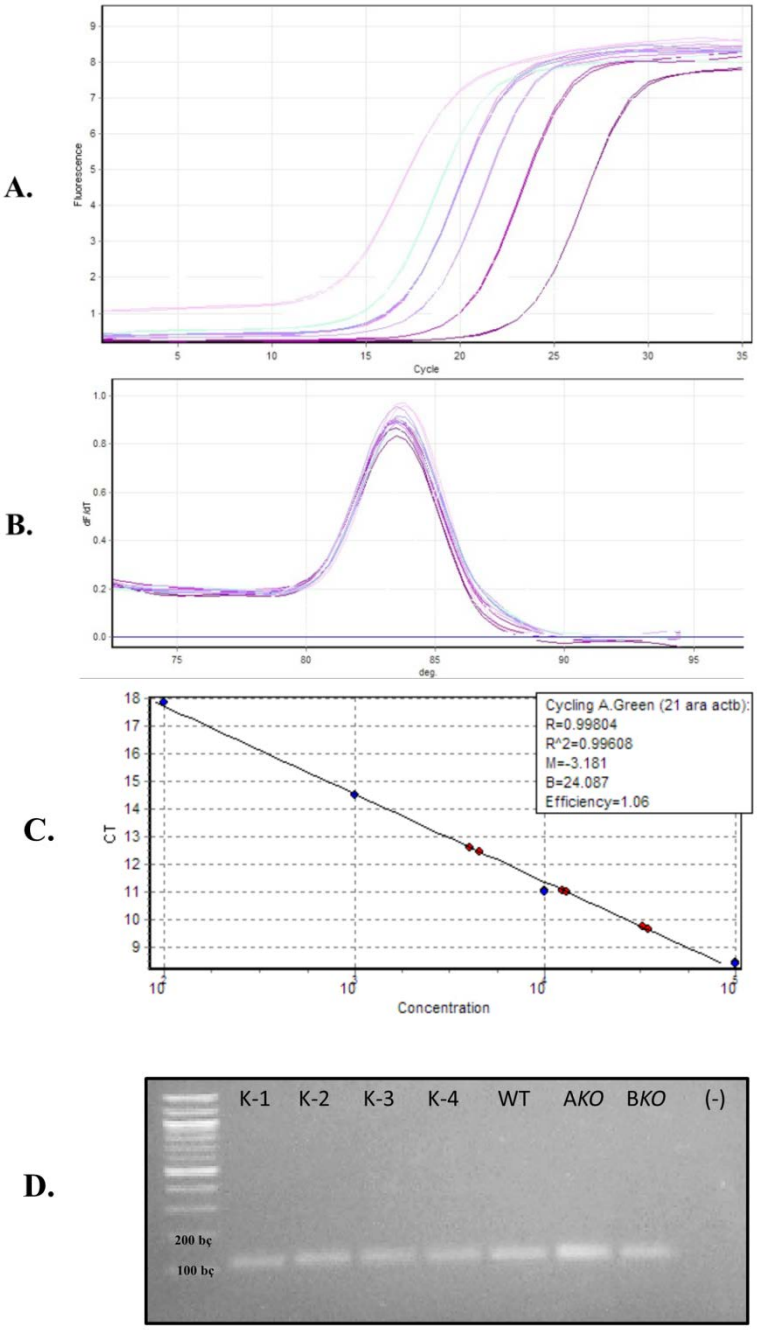
Şekil 4.6. Yabanıl tip desmb protein dizisi (üstte) ve *desmb KO* (-/-) zebra balıklarında p.Ser82Trp*86 mutasyonu sonucu oluşan desmb protein dizisi (altta, yeşil ile çerçevelenmiş). mRNA'nın okuma çerçevesinin kayması sonucu, ilk değişikliğin oluştuğu aminoasit (kırmızı) ve erken dur kodonu pozisyonu (*) gösterilmiştir.

4.2 *desma* ve *desmb* İfadesinin Kantitatif Gerçek Zamanlı PZR ile Analizi

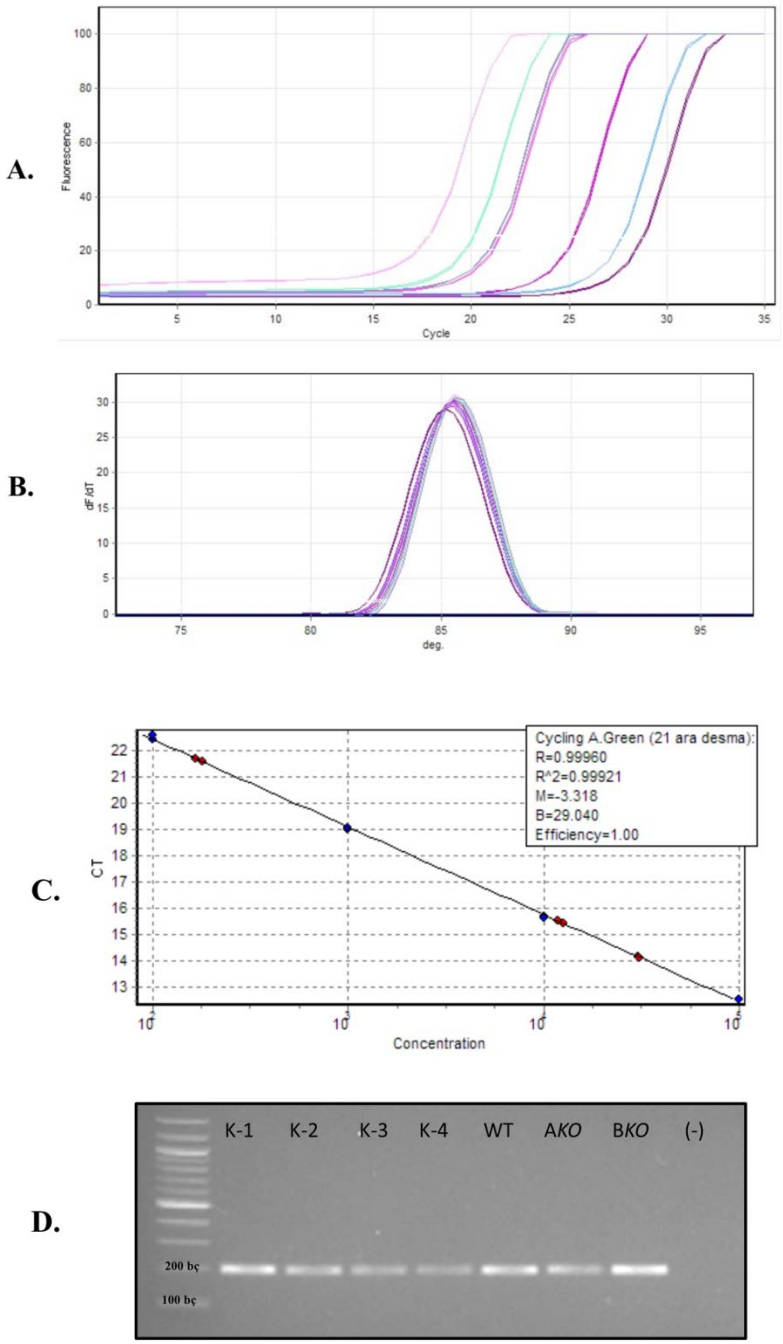
Yabanıl tip AB, *desma KO* **(-/-)** ve *desmb KO* **(-/-)** olmak üzere her üç gruptan da, dişi balıklar kendi gruplarındaki erkek balıklar ile çaprazlanmıştır. Elde edilen embriyolardan, döllenmeden sonra 96. saatte total RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. İzole edilen RNA'ların konsantrasyon ve saflığı nanospektrofotometrik ölçümlerle belirlenmiştir (Tablo 4.3.). Ardından, total RNA'dan cDNA sentezi gerçekleştirilerek *desma* ve *desmb*'nin mRNA ifade düzeyleri kantitatif gerçek zamanlı PZR yöntemi ile tespit edilmiştir (Şekil 4.8. ve Şekil 4.9.). Çalışmada *desma* ve *desmb*'nin göreceli ifadesi, *actb1* ifadesine göre normalize edilmiştir (Şekil 4.7.).

Tablo 4.3. RNA izolasyonu sonrasında, örneklerin nanospektrofotometrik ölçüm değerleri.

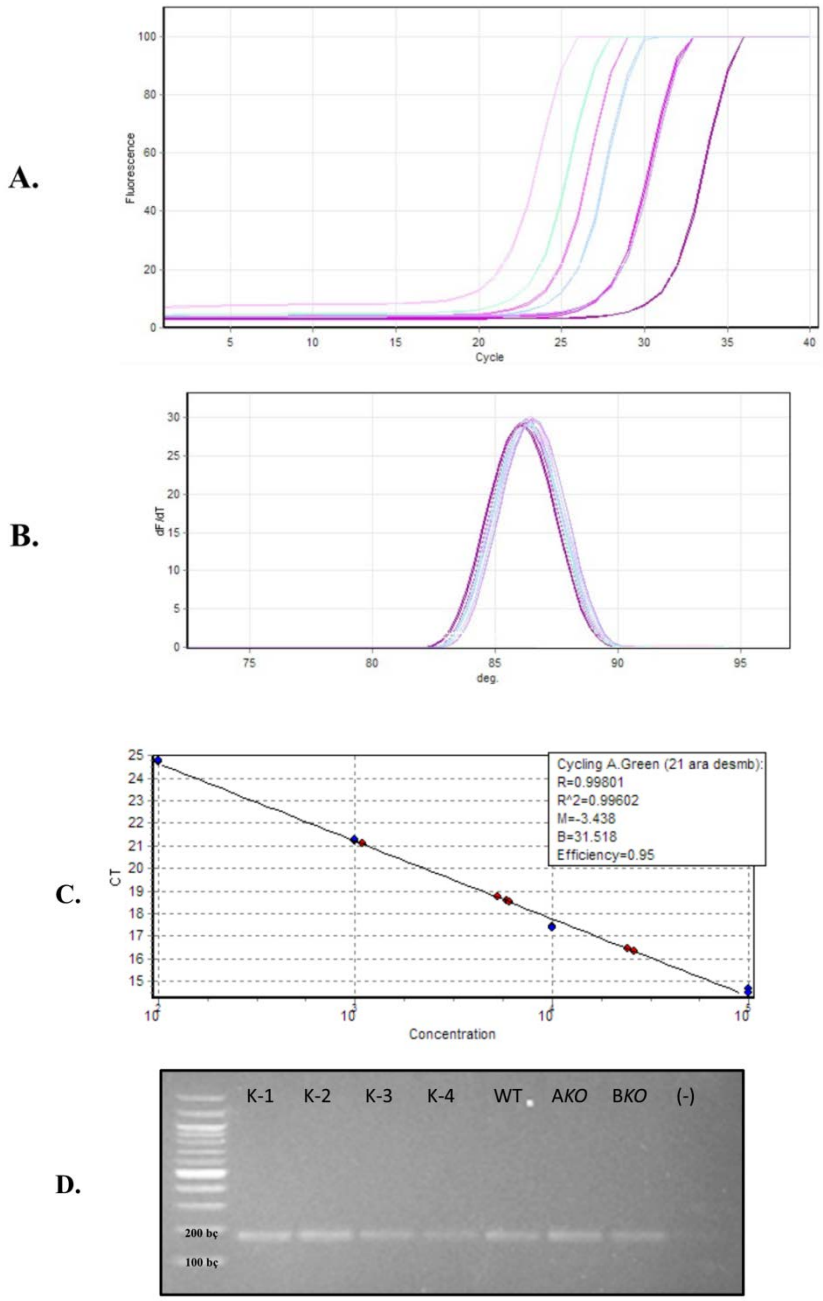
Örnek	Konsantrasyon Değeri (ng/µl)	Absorbans Değeri (OD)	Absorbans Değeri (OD)
Yabanıl tip AB	309	1,95	1,75
desma KO (-/-)	611	1,90	1,79
desmb KO (-/-)	120	1,89	1,75



Şekil 4.7. Yabanıl tip AB, *desma KO* (-/-) ve *desmb KO* (-/-) zebra balıklarında, *actb1*'in mRNA ifade düzeyinin analizi: A) *actb1* amplifikasyon eğrisi. B) *actb1* erime eğrisi. C) *actb1* standart eğri. D) *actb1* transkriptine özgül amplifikasyon ürünü (109 bç) %3'lük agaroz jelde incelenmiştir. K-1: Standart kontrol örneği, K-2: 10^{-1} standart dilüsyon, K-3: 10^{-2} standart dilüsyon, K-4: 10^{-3} standart dilüsyon, WT: Yabanıl tip AB örneği, A*KO*: *desma KO* (-/-) örneği, B*KO*4: *desmb KO* (-/-) örneği, (-): Negatif kontrol, M: 100 bç moleküler ağırlık belirteci.

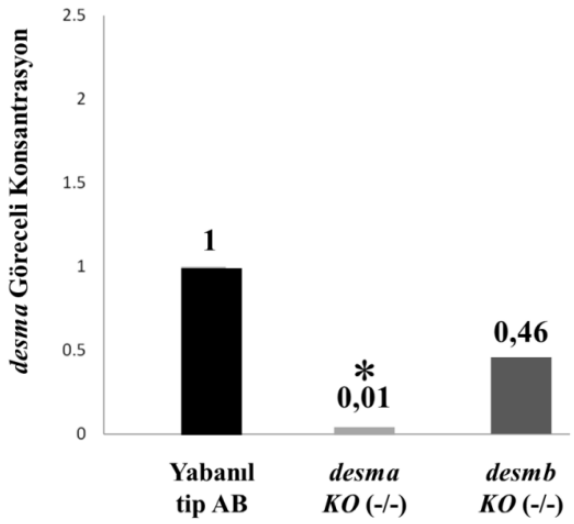


Şekil 4.8. Yabanıl tip AB, *desma KO* (-/-) ve *desmb KO* (-/-) zebra balıklarında, *desma*'nın mRNA ifade düzeyinin analizi: A) *desma* amplifikasyon eğrisi. B) *desma* erime eğrisi. C) *desma* standart eğri. D) *desma* transkriptine özgül amplifikasyon ürünü (190 bç) %3'lük agaroz jelde incelenmiştir. K-1: Standart kontrol örneği, K-2: 10^{-1} standart dilüsyon, K-3: 10^{-2} standart dilüsyon, K-4: 10^{-3} standart dilüsyon, WT: Yabanıl tip AB örneği, A*KO*: *desma KO* (-/-) örneği, B*KO*: *desmb KO* (-/-) örneği, (-): Negatif kontrol, M: 100 bç moleküler ağırlık belirteci.



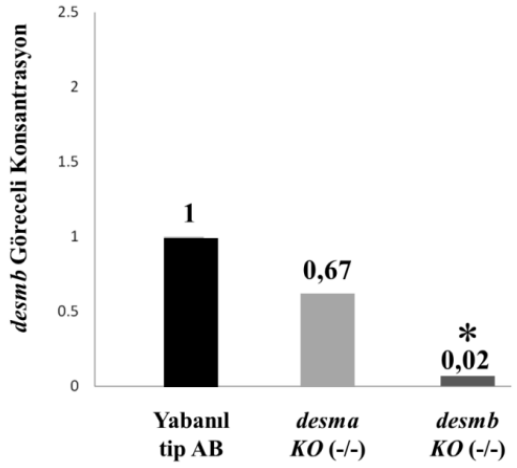
Şekil 4.9. Yabanıl tip AB, *desma KO* (-/-) ve *desmb KO* (-/-) zebra balıklarında, *desmb*'nin mRNA ifade düzeyinin analizi: A) *desmb* amplifikasyon eğrisi. B) *desmb* erime eğrisi. C) *desmb* standart eğri. D) *desmb* transkriptine özgül amplifikasyon ürünü (190 bç) %3'lük agaroz jelde incelenmiştir. K-1: Standart kontrol örneği, K-2: 10^{-1} standart dilüsyon, K-3: 10^{-2} standart dilüsyon, K-4: 10^{-3} standart dilüsyon, WT: Yabanıl tip AB örneği, A*KO*: *desma KO* (-/-) örneği, B*KO*: *desmb KO* (-/-) örneği, (-): Negatif kontrol, M: 100 bç moleküler ağırlık belirteci.

Gerçekleştirilen kantitatif gerçek zamanlı PZR deneyi sonuçlarına göre, döllenmeden sonra 96. saatteki *desma* ifadesinin, yabanıl tip AB zebra balıklarına kıyasla, *desma KO* (-/-) balıklarda %99 oranında azaldığı; *desmb KO* (-/-) balıklarda ise %54 oranında azaldığı bulunmuştur (Şekil 4.10.).



Şekil 4.10. Kantitatif gerçek zamanlı PZR çalışması ile hesaplanan desma transkriptinin göreceli konsantrasyonu. Çalışmadaki her zebra balığı grubu için total RNA, 15-20 embriyodan iki farklı zamanda sentezlenmiş olup (biyolojik tekrar), kGZ-PZR deneyi teknik olarak 3 kez tekrarlanmıştır. Döllenmeden sonra 96. saatteki *desma* ifadesi, yabanıl tip AB balıklara kıyasla *desma KO* (-/-) balıklarda %99 ve *desmb KO* (-/-) balıklarda %54 oranında azaldığı bulunmuştur.

96. saatteki *desmb* ifadesinin, yabanıl tip AB zebra balıklarına kıyasla, *desma KO* (-/-) balıklarda %33 oranında azaldığı; *desmb KO* (-/-) balıklarda ise %98 oranında azaldığı bulunmuştur (Şekil 4.11.).

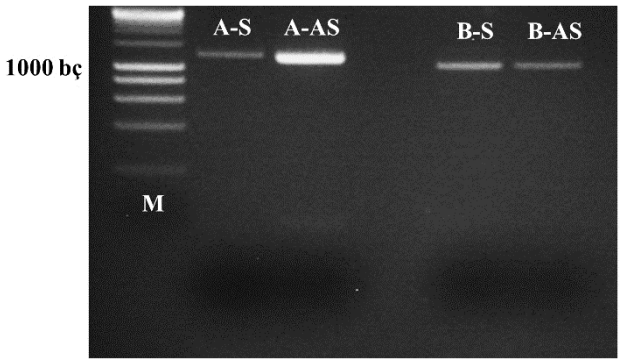


Şekil 4.11. Kantitatif gerçek zamanlı PZR çalışması ile hesaplanan desmb transkriptinin göreceli konsantrasyonu. Çalışmadaki her zebra balığı grubu için total RNA, 15-20 embriyodan iki farklı zamanda sentezlenmiş olup (biyolojik tekrar), kGZ-PZR deneyi teknik olarak 3 kez tekrarlanmıştır. Döllenmeden sonra 96. saatteki *desmb* ifadesinin, yabanıl tip AB balıklara kıyasla *desma KO* (-/-) balıklarda %33 ve *desmb KO* (-/-) balıklarda %98 oranında azaldığı bulunmuştur.

4.3 Zebra Balığı Embriyolarında Tüm Örnek ve Dondurulmuş Kesitlerde *İn Sitü* Hibridizasyon

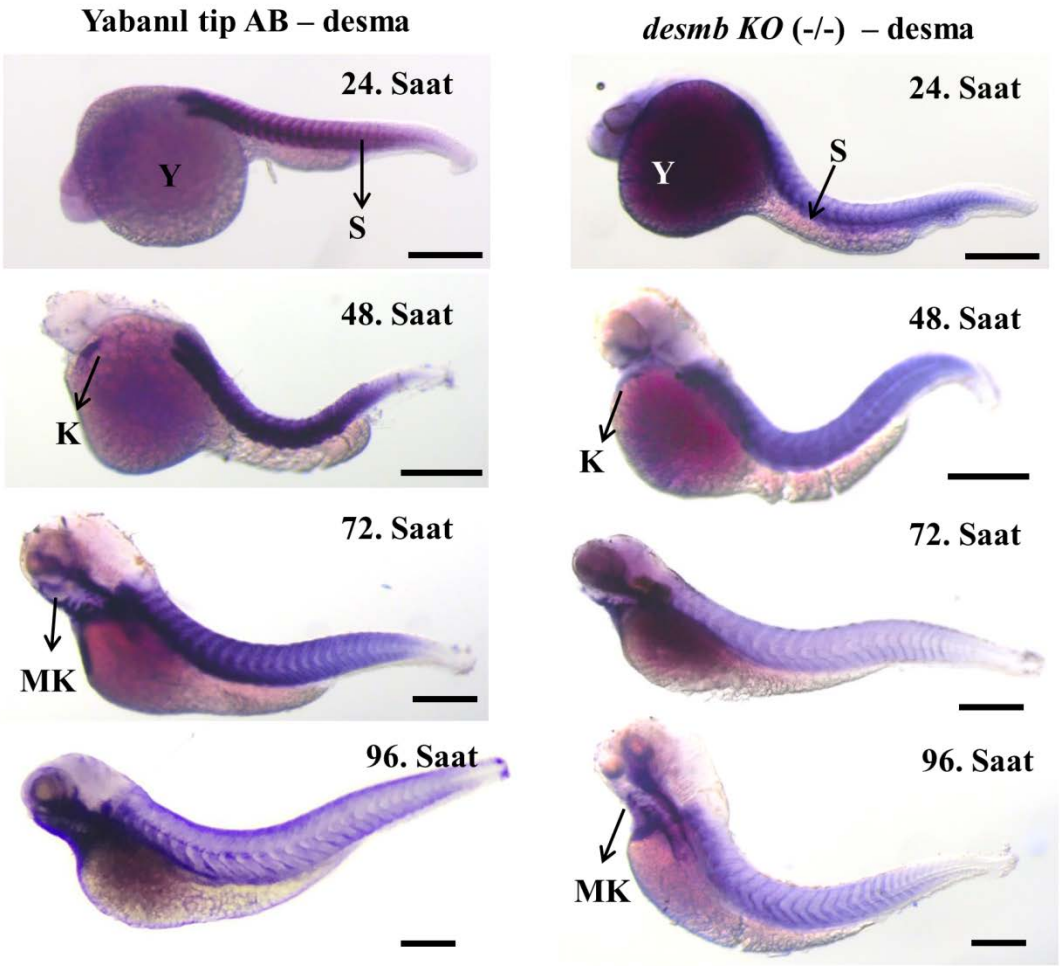
Döllenmeden sonra 24, 48, 72, 96 ve 120. saatlerde fikse edilen yabanıl tip AB, *desma KO* (-/-) ve *desmb KO* (-/-) zebra balığı embriyolarında, desma ve desmb transkriptlerinin yerleşimi, sentezlenmiş *digoxigenin* işaretli özgül problar kullanılarak tüm örnek *in sitü* hibridizasyon çalışması ile tespit edilmiştir.

Çalışmada kullanılan *antisense* problar, ilgilenilen mRNA dizisinin komplementeri olup dokularda özgül ifadeyi tespit etmek amacıyla kullanılmıştır. Negatif kontrol olarak kullanılan *sense* problar, mRNA ile aynı diziye sahip olduğu için mRNA'ya bağlanamamaktadır. Yabanıl tip AB cDNA'sı kullanılarak sentezlenen ve *digoxigenin* ile işaretlendikten sonra saflaştırılan probların özgüllüğü, %1'lik jelde doğrulanmıştır (Şekil 4.12.).

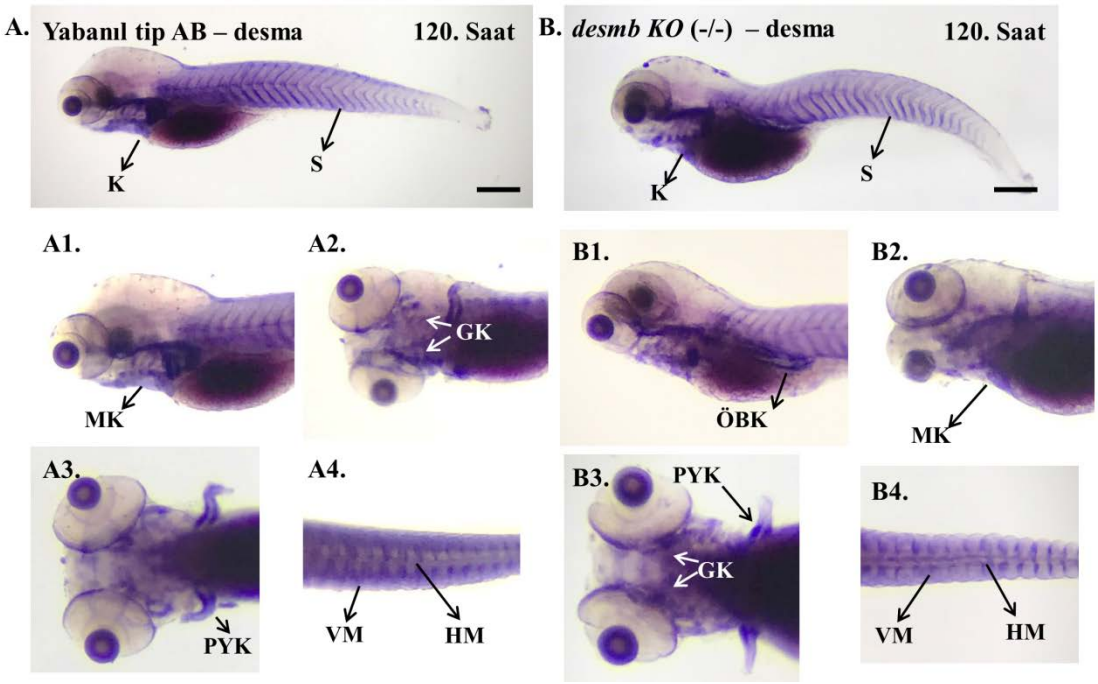


Şekil 4.12. *İn sitü* hibridizasyon çalışmasında kullanılan saflaştırılmış probların %1'lik agaroz jel görüntüsü. A-S: desma *sense* prob, A-AS: desma *antisense* prob, B-S: desmb *sense* prob, B-AS: desmb *antisense* prob, M: 1kb moleküler ağırlık belirteci.

Gerçekleştirilen tüm örnek *in sitü* hibridizasyon çalışmasında, 24, 48, 72, 96 ve 120 saatlerdeki yabanıl tip AB ve *desmb KO* (-/-) balıklarda, *desma*'nın somitlerde ifade olduğu tespit edilmiştir. Her iki grupta da 48. saat ve daha ileriki saatlerde, kalp kasında da boyanma gözlenmiştir. Bunun dışında *desma*'nın 72. saat ve daha ileri saatlerde, her iki grupta da, göz kasları ve mandibular kaslarda da ifade olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.12). *desma* ifadesi bulunan kas grupları 120. saatte işaretleme yapılan embriyolarda daha detaylı olarak incelenmiştir (Şekil 4.13). Döllenmeden sonra 120. saatte *desmb KO* (-/-) balıklarda, *desma*'nın yabanıl tip AB'den farklı olarak ön bağırsakta ifade olduğu gözlenmiştir.

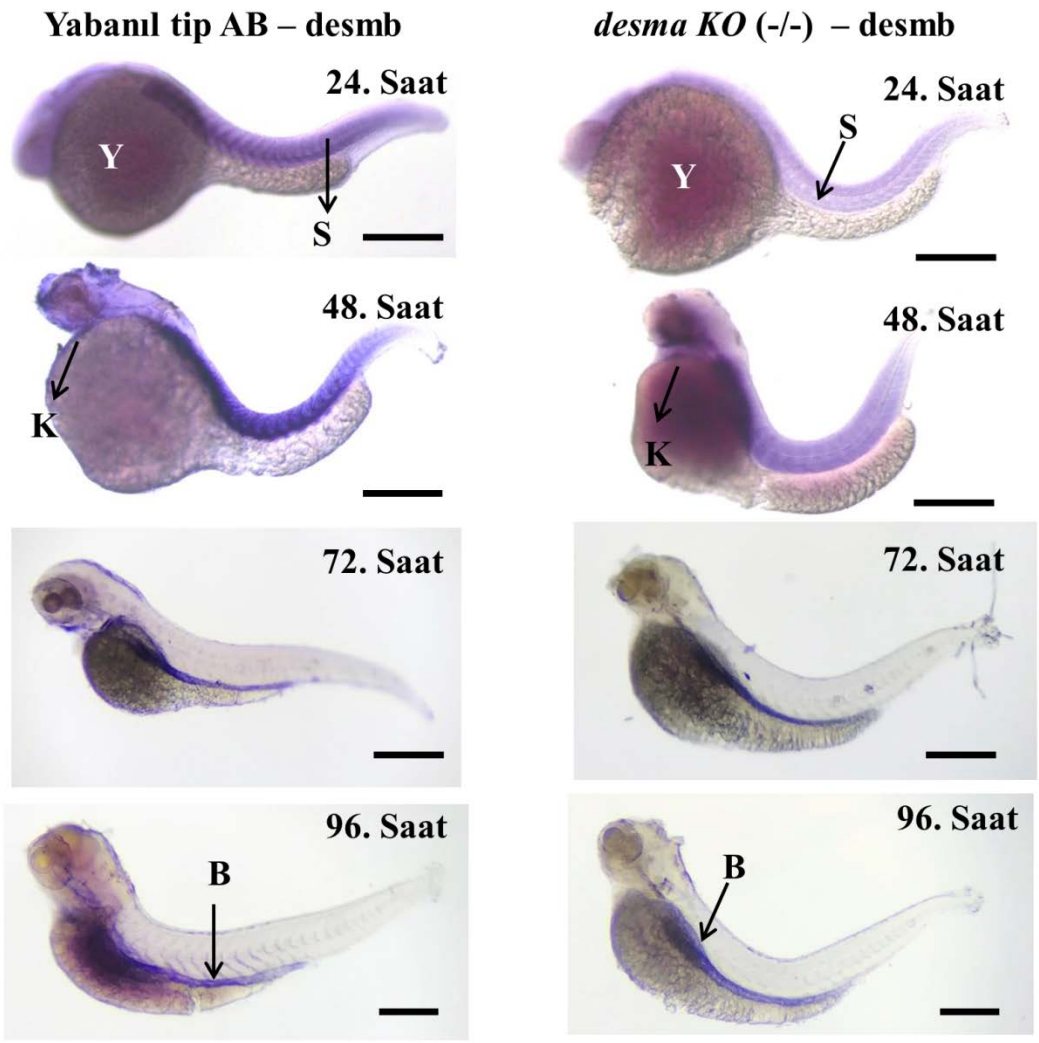


Şekil 4.13. Yabanıl tip AB ve *desmb KO* (-/-) zebra balıklarda 24, 48, 72 ve 96. saatlerde desma *antisense* probu ile yapılan işaretlemelerde boyanan kas grupları gösterilmiştir. S: Somitler, Y: Yolk kesesi K: Kalp kası, MK: Mandibular kaslar. Ölçek: 250 µm.

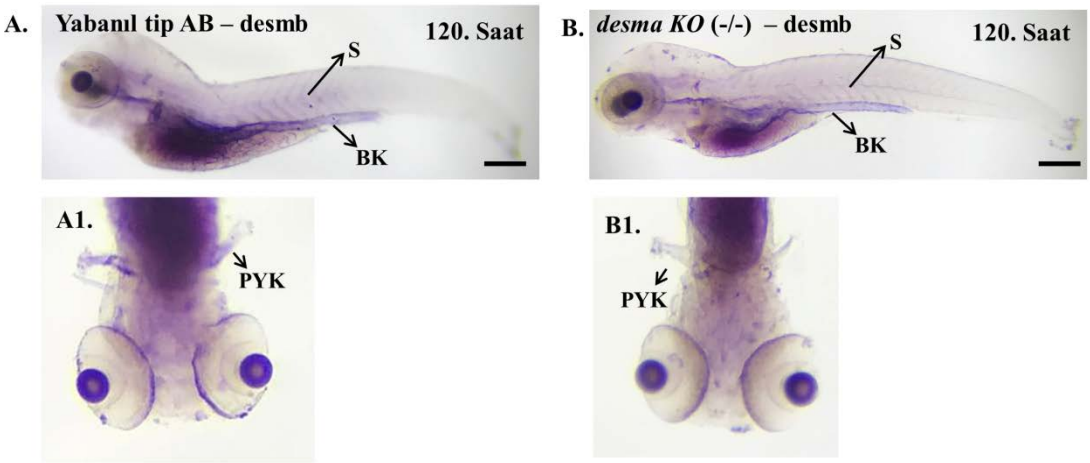


Şekil 4.14. Yabanıl tip AB ve *desmb KO* (-/-) zebra balıklarda 120. saatte desma *antisense* probu ile yapılan işaretlemelerde boyanan kas grupları gösterilmiştir. *desmb KO* (-/-) balıklarda, yabanıl tip AB'den farklı olarak ön bağırsakta da boyanma tespit edilmiştir. A-A4: Yabanıl tip AB, B-B4: *desmb KO* (-/-), S: Somitler, K: Kalp kası, MK: Mandibular kaslar, GK: Göz kasları, HM: Yatay miyoseptum, VM: Düşey miyoseptum, ÖBK: Ön bağırsak. Ölçek: 250 µm.

Yabanıl tip AB ve *desma KO* (-/-) balıklarda *desmb*'nin, 24 ve 48. saatlerde somitlerde ifade olduğu bulunmuştur; ancak *desma KO* (-/-) balıklarda belirtilen saatlerde somitlerden düşük sinyal alınmıştır. Ayrıca her iki grupta da, 48. saatte kalp kasında da *desmb* ifadesi olduğu gözlemiştir. 72, 96 ve 120 saatlerde ise bu balıklarda *desmb*'nin bağırsakta ifade olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.14). 120. saatte yapılan işaretlemelerle *desmb*'nin ifadesi daha detaylı olarak incelenmiştir (Şekil 4.15). Yabanıl tip AB balıklarda *desmb*, hem bağırsakta hem de pektoral yüzgeç kasında ifade olurken; *desma KO* (-/-) balıklarda pektoral yüzgeç kasında ifade görülmemiştir.

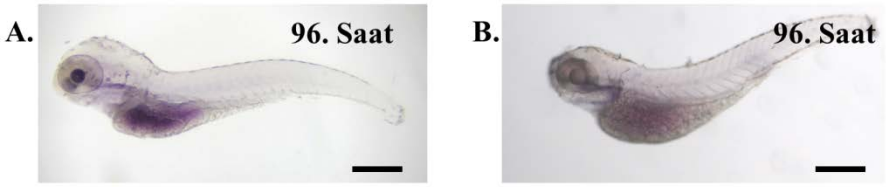


Şekil 4.15. Yabanıl tip AB ve *desma KO* (-/-) zebra balıklarda 24, 48, 72 ve 96. saatlerde desmb *antisense* probu ile yapılan işaretlemelerde boyanan kas grupları gösterilmiştir. *desma KO* (-/-) balıklarda 24 ve 48. saatlerde somitlerde *desmb* ifadesi yabanıl tip AB balıklara göre düşüktür. S: Somitler, Y: Yolk kesesi K: Kalp kası, B: Bağırsak kası. Ölçek: 250 µm.



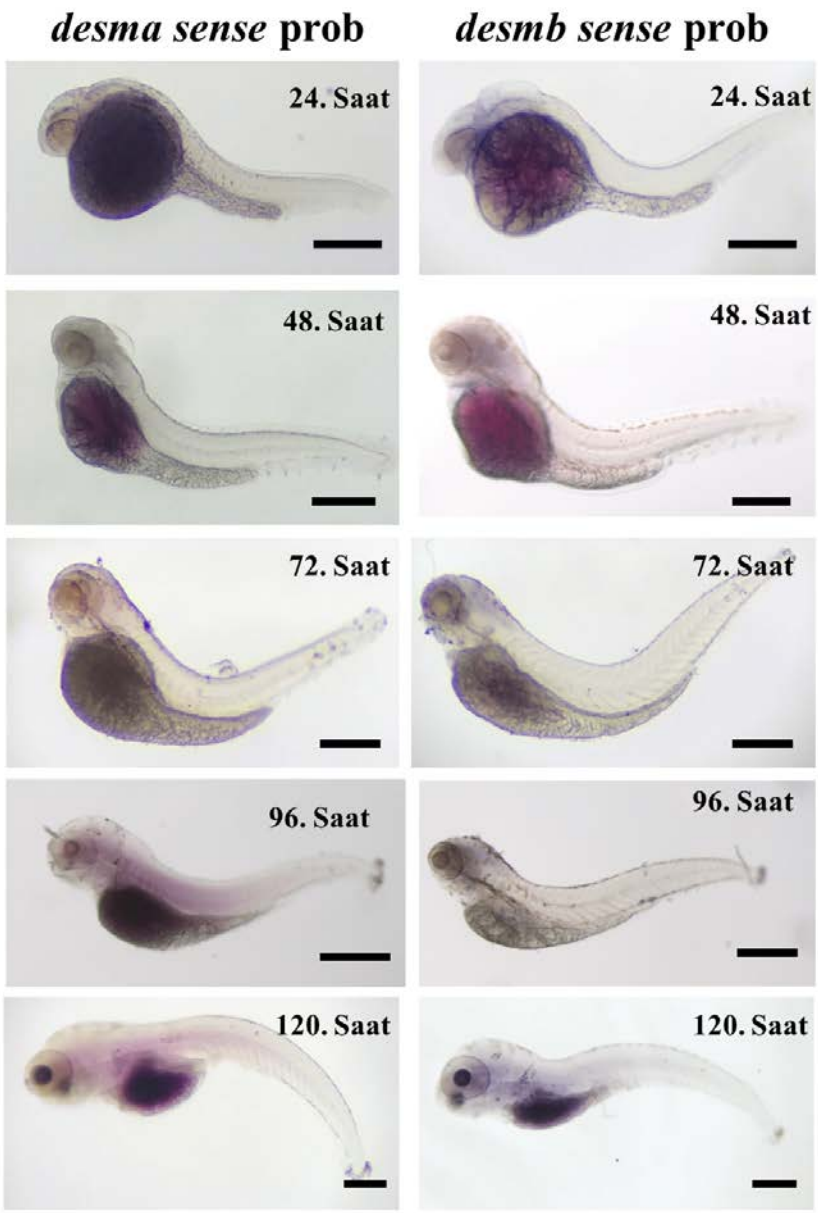
Şekil 4.16. Yabanıl tip AB ve *desma KO* (-/-) zebra balıklarda 120. saatte desmb *antisense* probu ile yapılan işaretlemelerde boyanan kas grupları gösterilmiştir. *desma KO* (-/-) balıklarda, yabanıl tip AB balıklardan farklı olarak pektoral yüzgeç kasında boyanma olmadığı tespit edilmiştir. A-A1: Yabanıl tip AB, B-B1: *desma KO* (-/-), S: Somitler, BK: Bağırsak, PYK: Pektoral yüzgeç kasları. Ölçek: 250 µm.

Döllenmeden sonra 96 saatte, *desma KO* (-/-) balıklarda desma *antisense* probuyla ve *desmb KO* (-/-) balıklarda desmb *antisense* probuyla yapılan işaretlemelerde, *KO* balıklarda mRNA ifadesinin azaldığı tespit edilmiştir (Şekil 4.18).



Şekil 4.17. *desma KO* (-/-) balıklarda desma *antisense* ve *desmb KO* (-/-) balıklarda desmb *antisense* probu ile yapılan işaretlemeler. *KO* balıklarda mRNA ifadesi azalmıştır. A: *desma KO* (-/-), B: *desmb KO* (-/-).Ölçek: 250 µm.

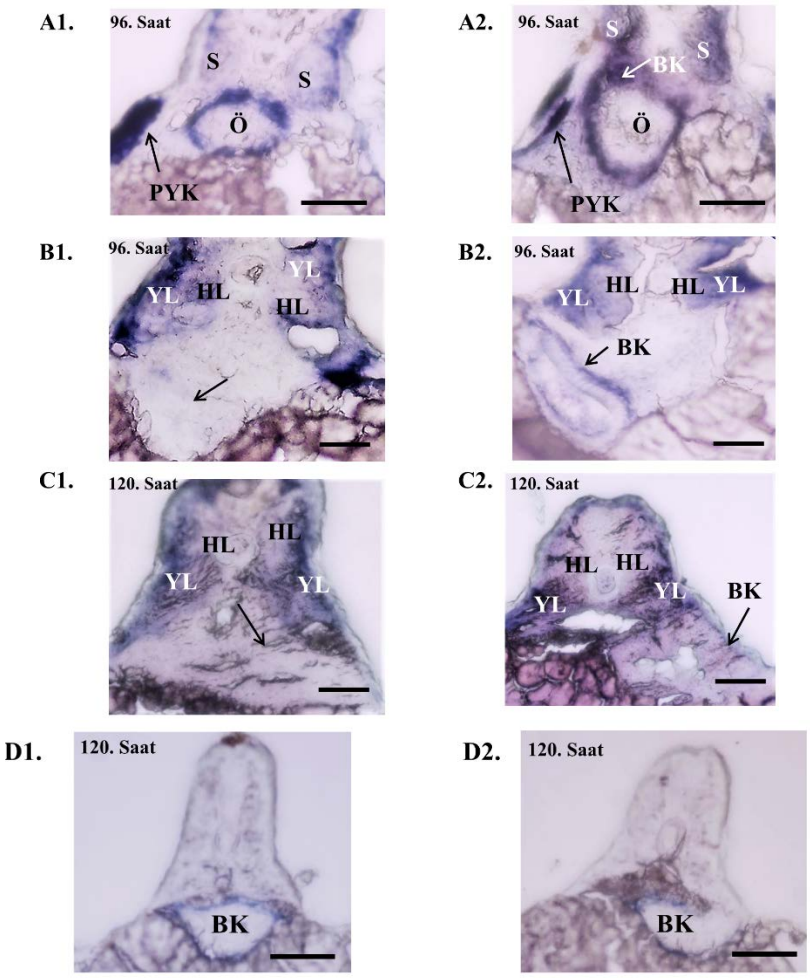
İn sitü hibridizasyon çalışmasında negatif kontrol olarak, mRNA dizisiyle aynı diziye sahip *sense* probları kullanılmıştır. Gerçekleştirilen tüm *in sitü* hibridizasyon deney kurulumlarında, *antisense* ile işaretleme yapılacak embriyolarda eş zamanlı olarak *sense* probuyla da işaretleme yapılmıştır. *Sense* probuyla yapılan işaretlemelerde çoğunlukla yolk kesesi ve kısmen de diğer vücut bölgelerinde, düşük seviyede özgül olmayan arka plan boyanmaları gözlemlenmiştir (Şekil 4.17).



Şekil 4.18. desma *sense* ve desmb *sense* probları ile 24, 48, 72, 96 ve 120. saatlerde yapılan işaretlemeler (negatif kontroller). Her iki *sense* probla yapılan işaretlemelerde de, yolk kesesinde ve gövdede özgül olmayan arka plan boyanmaları gözlenmiştir. Ölçek: 250 μm.

Tüm örnek *in sitü* hibridizasyon çalışmasını takiben 96 ve 120. saatlerde sıvı azotta dondurulmuş embriyolardan *Leica* CM1900 kriyostat cihazında transversal kesitler alınmış ve daha detaylı inceleme gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.16). Alınan dondurulmuş kesitlerde, yabanıl tip AB ve *desmb KO* (-/-) zebra balıklarında, *desma*'nın somitlerde bulunan hızlı ve yavaş kasılan liflerde, pektoral yüzgeç kaslarında ve özefagusta ifade olduğu bulunmuştur. Yabanıl tip AB balıklarda

desma'nın bağırsakta ifadesi bulunmamasına rağmen, *desmb KO* (-/-) balıklarda ön bağırsakta ifade gözlenmiştir; ancak orta bağırsakta daha düşük sinyal alınmıştır. Alınan dondurulmuş kesitlerde yabanıl tip AB ve *desma KO* (-/-) zebra balıklarında *desmb*'nin bağırsaktaki ifadesi gösterilmiştir.



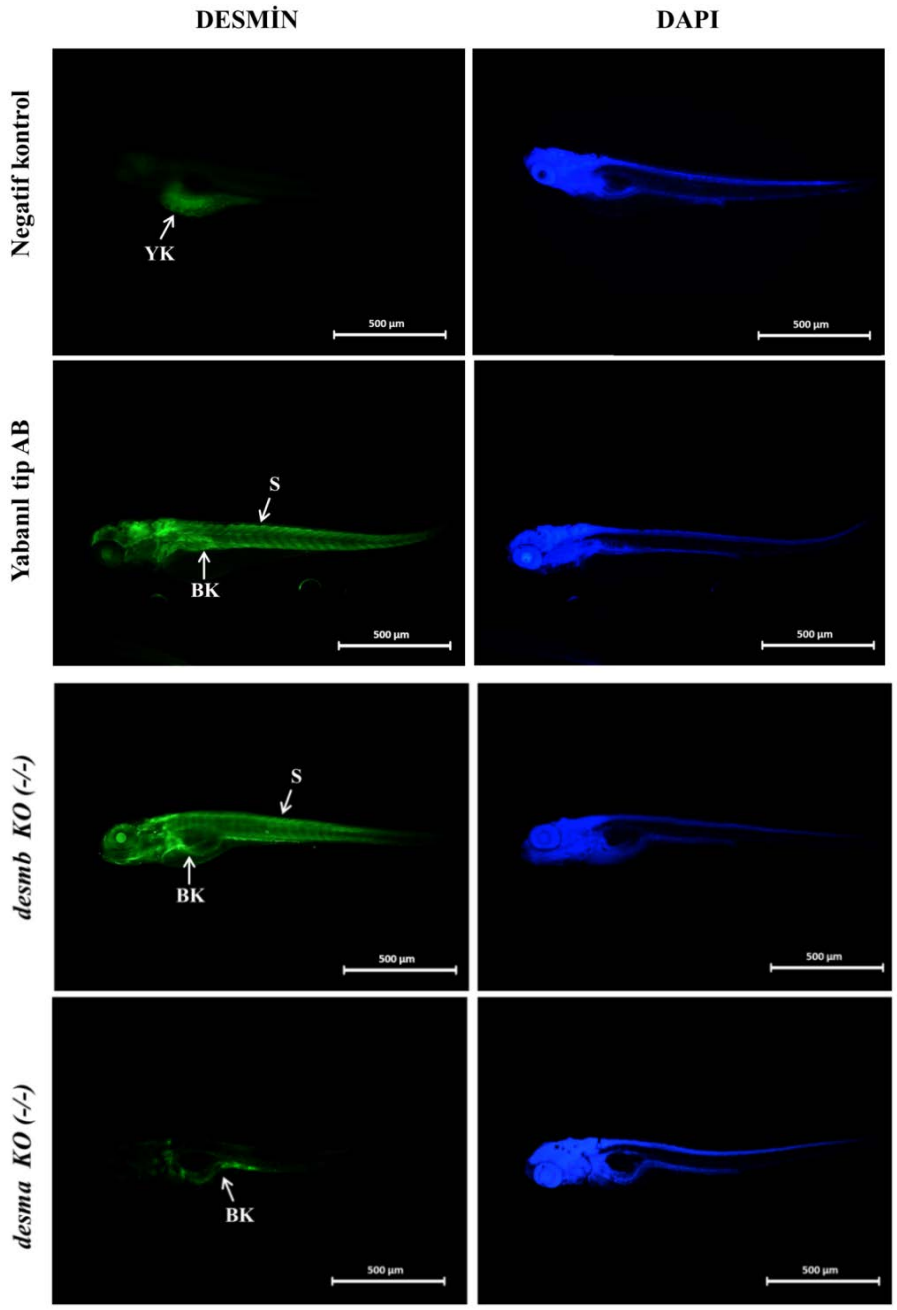
Şekil 4.19. Tüm örnek *in sitü* hibridizasyon çalışması sonrasında, 96 ve 120. saatlerde elde edilen dondurulmuş kesit görüntüleri. A1,B1,C1: Yabanıl tip AB'de desma *antisense* probuyla yapılan işaretlemeler, D1: Yabanıl tip AB'de desmb *antisense* probu ile yapılan işaretleme, A2,B2,C2: *desmb KO* (-/-) balıklarda *desmb* antisense probu ile yapılan işaretlemeler, D2: *desma KO* (-/-) balıkta *desmb* antisense probu ile yapılan işaretleme. Yabanıl tip AB balıklarda *desma*'nın bağırsakta ifadesi bulunmamaktadır. *desmb KO* (-/-) balıklarda ön bağırsakta *desma* ifadesi tespit edilmiştir; ancak bağırsağın ileri kısımlarında düşük sinyal alınmıştır. Yabanıl tip AB ve *desma KO* (-/-) zebra balıklarında *desmb*'nin bağırsakta ifade olduğu gözükmektedir. S: Somitler, PYK: Pektoral yüzgeç kası, Ö: Özefagus, BK: Bağırsak, HL: Hızlı kasılan lifler, YL: Yavaş kasılan lifler. Ölçek: 100 µm.

4.4 Zebra Balığı Embriyolarında Tüm Örnek İmmünfloresan Boyama

Döllenmeden sonra 96. saatte fikse edilen yabanıl tip AB, *desma KO* (-/-) ve *desmb KO* (-/-) zebra balığı embriyolarında, desma ve desmb proteinlerinin yerleşimi, her iki proteini de tanıyan anti-Desmin (Sigma, D8281) antikoru kullanılarak tüm örnek immünfloresan boyama tekniği ile tespit edilmiştir.

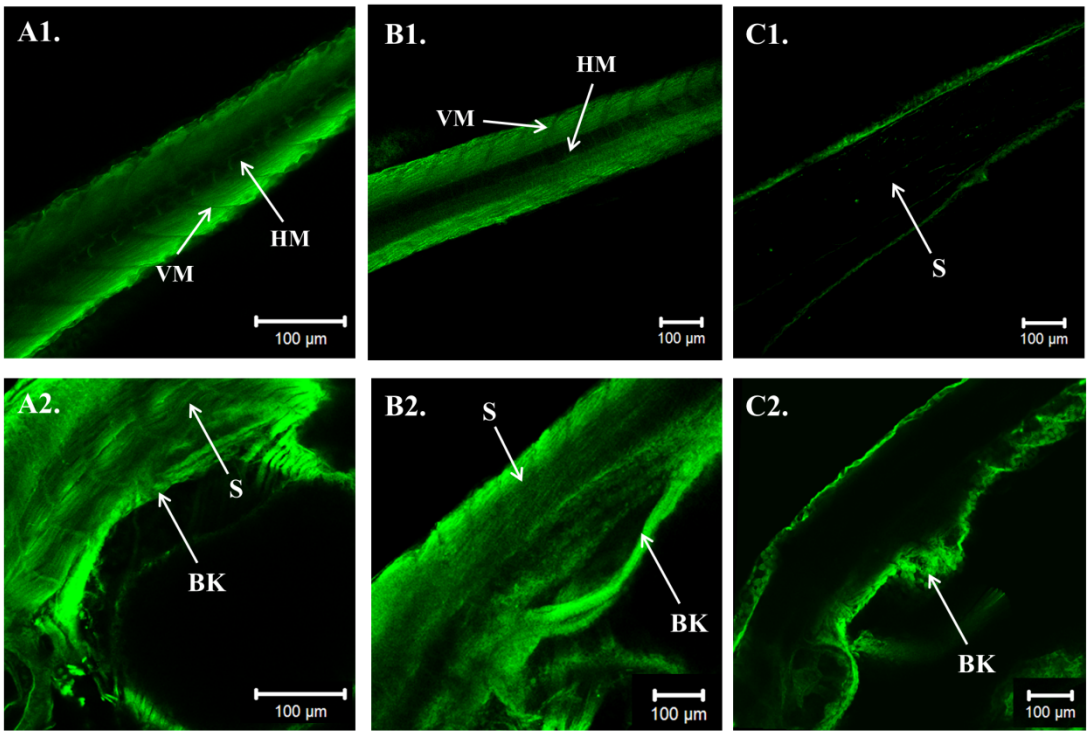
İmmünfloresan boyama çalışmasında uygulanan DAPI çekirdek boyası, yalnızca embriyonun sınırını belirlemek amacıyla kullanılmıştır. Boyanmanın özgül olduğunu göstermek için negatif kontrol olarak çalışmaya dahil edilen bazı embriyolar, primer antikor ile muamele edilmemiştir.

Yapılan çalışmada, yabanıl tip AB ve *desmb KO* (-/-) balıklarda, hem iskelet kasında (somitlerde) hem de bağırsakta boyanma tespit edilirken, *desma KO* (-/-) balıklarda yalnızca bağırsakta boyanma gözlenmiştir. Negatif kontrol olarak kullanılan embriyolarda ise, yalnızca yolk kesesinde özgül olmayan boyanma tespit edilmiştir.

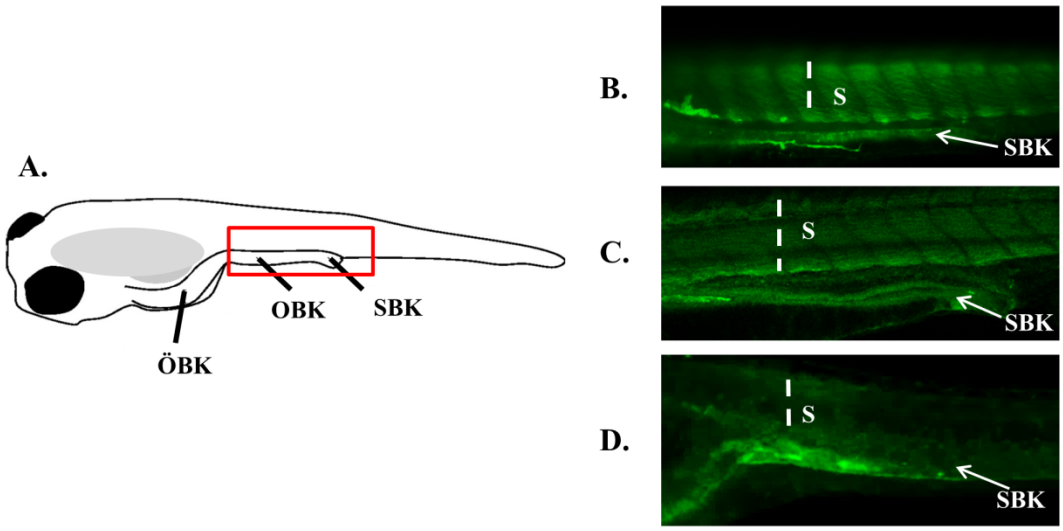


Şekil 4.20. Döllenmeden sonra 96. saatte, yabanıl tip AB, *desma KO* (-/-) ve *desmb KO* (-/-) zebra balıklarının desmin antikoru ve DAPI çekirdek boyası ile tüm örnek immünfloresan boyama görüntüleri. Yabanıl tip AB ve *desmb KO* (-/-) balıklarda, hem somitlerde hem de bağırsakta boyanma tespit edilmiş; *desma KO* (-/-) balıklarda ise yalnızca bağırsakta boyanma gözlenmiştir. Negatif kontrollerde yalnızca yolk kesesinde özgül olmayan boyanma tespit edilmiştir. YK: Yolk kesesi, S: Somitler, BK: Bağırsak.

Tüm örnek immünfloresan boyama deneyini takiben *Zeiss DML Pascal* lazer taramalı konfokal mikroskobu ile kademeli olarak alınan kesit görüntüleri incelenmiştir. Konfokal mikroskobundaki görüntülemelerde, yabanıl tip AB ve *desmb KO* (-/-) balıklarda somitlerde ve bağırsakta; *desma KO* (-/-) balıklarda ise yalnızca bağırsakta boyanma olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.20). Tüm örnek immünfloresan boyama deneyi sonuçlarına göre, yabanıl tip AB, *desma KO* (-/-) ve *desmb KO* (-/-) balıklarda bağırsaktaki boyanmanın son bağırsak bölgesine kadar olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.21.).



Şekil 4.21. Desmin antikoru kullanılarak döllenmeden sonra 96. saatte gerçekleştirilen tüm örnek immünfloresan boyamayı takiben lazer taramalı konfokal mikroskop ile çekilmiş kesit görüntüleri. Yabanıl tip AB ve *desmb KO* (-/-) balıklarda somitlerde ve bağırsakta; *desma KO* (-/-) balıklarda ise yalnızca bağırsakta boyanma tespit edilmiştir. A1-A2: Yabanıl tip AB, B1-B2: *desmb KO* (-/-), C1-C2: *desma KO* (-/-), HM: Yatay miyoseptum, VM: Düşey miyoseptum S: Somitler, BK: Bağırsak.



Şekil 4.22. Tüm örnek immünfloresan boyama deneyi sonucunda bağırsak ve somitlerde gözlenen boyanma. Yabanıl tip AB ve *desmb KO* (-/-) balıklarda bağırsak ve somitlerde; *desma KO* (-/-) balıklarda ise yalnızca bağırsakta boyanma gözlenmiştir. Bağırsaktaki boyanmanın, her üç grup için de son bağırsak bölgesine kadar olduğu tespit edilmiştir. A: Zebra balığı bağırsak yapısının şematik gösterimi (Holmberg'den uyarlanmıştır (2006) (61)). B: Yabanıl tip AB, B*: desmb KO* (-/-), C: *desma KO* (-/-), S: Somitler, ÖBK: Ön bağırsak, OBK: Orta bağırsak, SBK: Son bağırsak.

5. TARTIŞMA

Bu tez çalışmasında, zebra balığında bulunan ve insan *DES* ortoloğu olan *desma* ve *desmb*'nin mRNA ve protein ifadeleri, kGZ-PZR, tüm örnek *in sitü* hibridizasyon, tüm örnek immünfloresan boyama ve bu deneylerin sonucunda elde edilen dondurulmuş kesit görüntüleri ile yabanıl tip AB, *desma KO* (-/-) ve *desmb KO* (-/-) zebra balıkları arasında karşılaştırılarak gösterilmiştir.

Çalışmada kullanılan erişkin *KO* (-/-) zebra balıkları 1,5 yaşında olup, sağlıklı gelişim göstermektedir. Her iki *desmin KO* (-/-) grupta da erişkin balıklar çiftleşebilmekte ve embriyo verebilmektedir; ancak *desma KO* (-/-) balıkların, *desmb KO* (-/-) ve yabanıl tip AB balıklara göre daha nadir çiftleştiği ve oluşan embriyo sayısının diğer gruplara göre oldukça düşük olduğu gözlenmiştir. Bu durum, *desma KO* (-/-) balıklara ilişkin deneyler için gerekli olan embriyo sayısına ulaşmayı zorlaştırmıştır.

DNA dizi analizi ile homozigot olarak çerçeve kayması mutasyonu taşıdığı ve mRNA dizisi üzerinde erken dur kodonu oluştuğu belirlenen erişkin zebra balıklarından elde edilen embriyolarda, mRNA yıkımının gerçekleştiğini göstermek amacıyla, döllenmeden sonra 96. saatte total RNA izolasyonu gerçekleştirilmiş ve ardından kantitatif gerçek zamanlı PZR çalışması yapılmıştır. Gerçekleştirilen kGZ-PZR deneyi, mRNA miktarındaki göreceli konsantrasyon değişimi ile ilgili bilgi vermektedir. Bu çalışmanın sonucunda, yabanıl tip AB balıklara göre, *desma KO* (-/-) balıklarda *desma* mRNA ifadesinin %99 ve *desmb KO* (-/-) balıklarda *desmb* mRNA ifadesinin %98 oranında göreceli olarak azaldığının bulunması, bu genlerin *KO (-/-)* olduğunu ve ürün sentezlemediğini doğrulamıştır (Bkz., Şekil 4.10 ve Şekil 4.11).

Tez çalışmasında gerçekleştirilen tüm örnek *in sitü* hibridizasyon yöntemi, dokularda özgül mRNA yerleşimlerini göstermektedir. Bu deney sisteminde, sentezlenmiş *digoxigenin* işaretli problar, gece boyunca embriyolara uygulanarak, dokularda bulunan özgül mRNA'lara bağlanmaktadır. Ardından, alkalin fosfataz taşıyan ve probların üzerindeki *digoxigenin* işaretlerini tanıyan anti-*digoxigenin* antikorlarının bu problara bağlanması sağlanmaktadır. Son aşamada ise *NBT*/*BCIP* karışımı ortama verildiğinde, antikor üzerinde bulunan alkalin fosfataz, *BCIP (5-*

bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate) üzerinde bulunan fosfat gruplarını ayırmaktadır. Oluşan ürün *NBT* (*Nitro Blue Tetrazolium*) ile birlikte, problara bağlanmış mRNA'ların ifade olduğu dokularda mor renk oluşmasını sağlamaktadır.

Tüm örnek *in sitü* hibridizasyon çalışmasına başlamadan önceki kritik basamak, deneyde kullanılan probların sentezlenmesi aşamasıdır. Bu tez çalışmasında, desma ve desmb transkriptlerinin zebra balığı embriyolarında hangi dokularda yerleşim gösterdiğini tespit etmek amacıyla, yabanıl tip AB zebra balığı cDNA'sı kalıp olarak kullanılarak desma *sense*, desma *antisense*, desmb *sense* ve desmb *antisense* olmak üzere dört farklı prob sentezlenmiştir. Prob sentezinin ilk aşamasında, yabanıl tip AB cDNA'sından, desma ve desmb bölgeleri çift zincir olarak çoğaltılmaktadır. Bu aşamada, her iki gen için de, mRNA ürününün dizisi *sense*, mRNA ürününe komplementer olan dizi ise *antisense* probun dizisini belirlemektedir. İstenilen dizinin, bir sonraki aşamada (*in vitro* transkripsiyon) RNA probu olarak çoğaltılabilmesi için, desma ve desmb kalıp cDNA'larının sentezlendiği bu aşamada, *sense* prob için T7 promotör bölgesi içeren primer dizisi, *antisense* prob için ise T3 promotör bölgesi içeren primer dizisi kullanılmaktadır. Böylece oluşturulan kalıp cDNA'lardan, *in vitro* transkripsiyon aşamasında T7 polimeraz kullanıldığında *sense*, T3 polimeraz kullanıldığında ise *antisense* prob sentezlenebilmektedir. *Antisense* problar, mRNA'ya bağlanarak dokularda ilgili transkriptin yerleşimlerini gösterirken; *sense* problar, mRNA'ya bağlanamamakta ve negatif kontrol olarak kullanılarak arka planda özgül bir boyanma gerçekleşmediğini göstermektedir.

Tüm örnek *in sitü* hibridizasyon yönteminde embriyolara uygulanan *sense*, *antisense* probların ve anti-digoxigenin antikorunun, dokulara nüfuz edebilmesi için, deneyin birinci günü Proteinaz K uygulaması ile embriyolar permeabilize edilmektedir. Gerçekleştirilen permeabilizasyon aşamasında kullanılan Proteinaz K miktarı ve permeabilizasyon süresi çok önemlidir. Döllenmeden sonra 24. saatte fikse edilen embriyolarda dokular daha gevşek yapıda olup, probların ve antikorun girişine izin vermektedir. Bu nedenle, bu saatteki embriyolar için ayrıca permeabilizasyon işlemine gerek duyulmamıştır. Bunun yanında, fazla miktarda ya da uzun süreli Proteinaz K uygulanması, embriyoların deney sırasında kullanılan

tüpler içerisinde birbirlerine yapışmasına veya parçalanmasına neden olmaktadır. Döllenmeden sonra 24. saatten daha büyük embriyolara, oda sıcaklığında, 1 saat boyunca 20 µg/µl konsantrasyonda Proteinaz K uygulanması ile en iyi sonucun elde edildiği bulunmuştur. Permeabilizasyondan sonra, gece boyunca problarla hibridizasyon aşamasında, hibridizasyon derecesinin sabit kalması, özgül olmayan arka plan boyanmalarını engellemektedir. Probların ilave edildiği hibridizasyon çözeltisi, gece boyunca %4 PFA ile fikse edilmiş embriyolara uygulandıktan sonra 1,5 ml'lik tüpler içerisinden geri toplanarak -20 °C'de saklanabilmektedir. En az iki kez daha kullanılabilen prob içeren bu çözeltinin, 2. ve 3. kullanımında, arka plan boyanmalarının azaldığı ve daha özgül bir boyanma oluştuğu tespit edilmiştir. *İn sitü* hibridizasyon deneyinin üçüncü gününde embriyolara uygulanan, *NBT/BCIP* içeren renklendirme çözeltisinin hazırlanması ile başlayan ve embriyoların gliserol içerisine alınmasına kadar geçen süreçte, tüm deney karanlıkta ya da mümkün olduğunca az ışık görerek gerçekleştirilmelidir. Bu çözelti uygulanırken embriyonun fazla ışık alması, arka plan boyamalarının artmasına ve özgül boyanmaların seçilememesine neden olmaktadır. Bu nedenle, *NBT/BCIP* içeren renklendirme çözeltisinin uygulanması aşamasında, embriyoların boyanıp boyanmadığı mikroskop altında daha geniş aralıklarla kontrol edilmeli ve bu süre kısa tutulmalıdır. Belirtilen kritik basamaklar, yabanıl tip AB balıklarda gerçekleştirilen deneyler ile optimize edilmiştir. Optimizasyonun ardından, *KO* (-/-) balıklarda gerçekleştirilen her deney kurulumunda, yabanıl tip AB embriyolar pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.

Çalışmada tüm örnek *in sitü* hibridizasyon ve tüm örnek immünfloresan boyama deneylerinde kullanılmak üzere fikse edilen embriyoların, transparan yapılarını korumak amacıyla uygulanan PTU kimyasalının, 1X embriyo solüsyonu içerisinde embriyolara uygulanmaya başlama zamanı oldukça önemlidir. Bu kimyasal, hali hazırda oluşan pigmentleşmeleri geri döndürememektedir; ancak verildiği saatten itibaren pigment oluşumunu engellemektedir. Embriyo gövdesinde pigmentlerin bulunması, *in sitü* hibridizasyon ve immünfloresan boyama deneylerinde oluşan boyanmaların özgül görüntüsünü engellemektedir. Bunun yanında, PTU kimyasalının erken uygulanması (döllenmeden sonra 18. saate kadar), embriyolarda toksik etki yaratmaktadır. Bu kimyasalın en uygun uygulanma zamanı döllenmeden sonra 22. saat olarak belirlenmiştir; ancak çiftleşmede, dişi balığın

yumurta bırakması ile erkek balığın spermlerini bırakma süresi arasında zaman geçebilmektedir. Dolayısıyla, dişi balık tarafından yumurtaların bırakıldığı saat döllenme saatini göstermemektedir. Bu sorunun önüne geçebilmek için, PTU kimyasalının verileceği zaman olarak belirlenen döllenmeden sonra 22. saat, yumurtaların bırakıldığı saat olarak değil, embriyoların gelişimlerinin 22. saati olarak mikroskop altında kontrol edilerek ayarlanmıştır.

Tez çalışmasında gerçekleştirilen tüm örnek *in sitü* hibridizasyon deneyleri için, yabanıl tip AB, *desma KO* (-/-) ve *desmb KO* (-/-) zebra balıklarından elde edilen ve döllenmeden sonra 24, 48, 72, 96 ve 120. saatlerde fikse edilen embriyolar kullanılmıştır. Bu saatler, tez çalışması hipotezinde, yabanıl tip AB zebra balıklarında *desma* ve *desmb* ifadesinin 70. saatten itibaren değiştiği bulgusu nedeni ile seçilmiştir.

Tüm örnek in sitü hibridizasyon çalışmalarının ardından dokularda gerçekleşen özgül boyanmaların daha detaylı incelenebilmesi amacıyla embriyolar, OCT dolgu maddesi içerisinde sıvı azotta dondurulmuş ve kriyostat ile 7 mikron kalınlığında transversal doku kesitleri alınarak ışık mikroskobu altında inceleme gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.19.). Bu aşamada elde edilen kesitlerde, zebra balığı embriyolarının kafa bölgesine yakın bölgelerden doku bütünlüğü bozulmamış kesitler elde edilmiş ancak; kuyruk bölgesine yakın kısımlarında dokunun bütünlüğünün bozulduğu tespit edilmiştir. Embriyoların boyutlarının küçük olması sebebiyle, sıvı azotta dondurma aşamasında dokuların bu bölümlerinin fazla miktarda sıvı azota maruz kalarak parçalandığı düşünülmektedir. Bu sorunun önüne geçebilmek adına, dondurulmuş kesit alma protokolün geliştirmesi gerekmektedir.

Deneylerin optimize edilmesinin ardından, yabanıl tip AB zebra balıklarında gerçekleştirilen tüm örnek *in sitü* hibridizasyon çalışmalarında ve sonrasında elde edilen dondurulmuş kesitlerde, *desma* ve *desmb*'nin döllenmeden sonra 24 ve 48. saatlerde somitlerde ifade olduğu ve benzer yerleşim gösterdiği gözlenmiştir. Ayrıca, 48. saatte hem *desma* hem de *desmb* kalp kasında da ifade olmaktadır. Ancak gelişimin daha ileri saatlerinde (döllenmeden sonra 72, 96 ve 120. saatlerde) *desma,* somitlerde, mandibular kaslarda, göz kaslarında, kalp kasında ve özefagusta ifade olurken; *desmb*, bağırsak boyunca ve pektoral yüzgcç kaslarında ifade olmaktadır.

Elde edilen sonuçlar, yabanıl tip AB balıklarda *desma* ve *desmb*'nin yerleşimlerinin ve dolayısıyla işlevlerinin gelişimin erken dönemlerinde benzer olduğunu; ancak gelişimin ileriki dönemlerinde, ifade profillerinin değişmesiyle birlikte farklı işlevler üstlendiğini göstermiştir. Bulunan sonuçlar, araştırma grubumuz tarafından gerçekleştirilen ve tez çalışmasının hipotezini oluşturan ön çalışmalar ile uyumludur. (P. Dinçer, yayınlanmamış veri). Tez çalışması sonucu ve gerçekleştirilen ön çalışmanın sonuçları birlikte değerlendirildiğinde, yabanıl tip AB zebra balıklarında *desma* ve *desmb* ifadesinin, döllenme sonrası 70. saate kadar benzer şekilde, ağırlıklı olarak iskelet kası ve kalp kasında olduğunu; ancak döllenme sonrası 70. saatten itibaren *desma* ağırlıklı olarak iskelet kası ve kalp kasında ifade olurken, *desmb*'nin çoğunlukla düz kaslarda ifade olduğunu göstermektedir.

Yabanıl tip AB balıklar ve *desma KO* (-/-) balıklar arasında, desmb *antisense* probuyla yapılan tüm örnek *in sitü* hibridizasyon deneyleri ve elde edilen dondurulmuş kesitlere ilişkin veriler karşılaştırıldığında, *desmb*'nin her iki grupta da, döllenmeden sonra 24 ve 48. saatlerde somitlerde ve kalpte ifade olduğu gösterilmiştir. Döllenmeden sonra 72, 96 ve 120. saatlerde ise *desmb*'nin, yabanıl tip AB balıklarda bağırsak ve pektoral yüzgeç kasında, *desma KO* (-/-) balıklarda ise yalnızca bağırsakta ifade olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.16.).

Yabanıl tip AB balıklar ve *desmb KO* (-/-) balıklar arasında, desma *antisense* probuyla yapılan tüm örnek *in sitü* hibridizasyon deneyleri ve elde edilen dondurulmuş kesitlere ilişkin veriler karşılaştırıldığında, *desma*'nın her iki grupta da, döllenmeden sonra 24, 48, 72, 96, 120. saatlerde somitlerde ifade olduğu bulunmuştur. Ayrıca, her iki grupta da *desma*'nın, döllenmeden sonra 48. saatten itibaren kalp kasında ve 72. saatten itibaren mandibular kaslar, göz kasları, pektoral yüzgeç kasları ve özefagusta da ifade olduğu gösterilmiştir. Yabanıl tip AB balıklarda *desma* bağırsakta ifade olmazken, *desmb KO* (-/-) balıklarda ön bağırsakta ifade olduğu tespit edilmiştir. Tüm örnek in sitü hibridizasyon çalışması ardından elde edilen dondurulmuş kesitlerde, *desmb KO* (-/-) balıklarda, *desma*'nın bağırsaktaki mRNA ifadesinin ön bağırsak bölgesinde yüksek olduğu, ancak orta ve arka bağırsakta düşük olduğu görülmüştür (Şekil 4.14.).

Tüm örnek in sitü hibridizasyon çalışmasında negatif kontrol olarak kullanılan desma *sense* ve desmb *sense* problarla döllenmeden sonra 24, 48, 72, 96 ve 120. saatlerde yapılan işaretlemelerde, çoğunlukla yolk kesesinde ve düşük oranda da gövdede özgül olmayan arka plan boyanmaları gerçekleşmiştir. Bunun yanında, *desma KO* (-/-) balıklarda desma *antisense* probuyla ve *desmb KO* (-/-) balıklarda desmb *antisense* probuyla yapılan işaretlemelerde, dokularda özgül bir boyanma gerçekleşmemesi, *KO* (-/-) balıklarda mRNA ifadesinin azaldığını göstermiştir. Bulunan bu sonuç, kGZ-PZR çalışmasında da gözlenen *KO* (-/-) balıklarda mRNA'nın göreceli konsantrasyonunun azaldığı sonucunu desteklemektedir.

Tüm örnek in sitü hibridizasyon çalışmasında, yabanıl tip AB balıklar ve *desma KO* (-/-) balıklar arasında, desmb *antisense* probuyla yapılan işaretlemelerde, her iki grupta da döllenmeden sonra 24 ve 48. saatlerde *desmb*'nin somitlerde ifade olduğu görülse de, *desma KO* (-/-) balıklardaki ifadenin yabanıl tip AB balıklara göre daha düşük olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.15.). Literatürde, *desmb* ifadesinin *desma*'ya göre gelişimin daha ileriki saatlerinde başladığı ve 48. saate kadar *desma*'dan 2500 kat daha az olduğu bilinmektedir (22). Ancak, yabanıl tip AB ve *desma KO* (-/-) embriyolar, döllenmeden sonra 24 ve 48. saatlerde desmb *antisense* probuyla 4 kez eş zamanlı olarak boyanmasına rağmen, *desma KO* (-/-) embriyolar bu iki saatte yabanıl tip AB embriyolara göre daha zayıf bir boyanma göstermektedir. Bunun yanında, *desma KO* (-/-) balıklarda yabanıl tip AB balıklardan farklı olarak pektoral yüzgeç kasında desmb ifadesi bulunmamaktadır (Şekil 4.16.). Bu iki bulgu, *desma KO* (-/-) balıklarda *desmb* ifadesinin yabanıl tip AB balıklara göre daha düşük olduğunu ve daha geç başladığını düşündürmektedir.

Tez çalışmasında gerçekleştirilen tüm örnek immünfloresan boyama çalışmasında, desma ve desmb proteinlerinin dokulardaki özgül yerleşimleri gösterilmiştir. Bu çalışmanı, döllenmeden sonra 96. saatteki embriyolarda gerçekleştirilmesinin nedeni, 96. saatten önce desmb ifadesinin düşük olmasıdır (22). Çalışmada kullanılan anti-Desmin D8281 (Sigma) antikoru, hem desma hem de desmb proteinini tanımaktadır. Antikorun embriyolarda dokulara nüfuz etmesi için permeabilizasyon süresi, permeabilizasyonda uygulanan Proteinaz K konsantrasyonu ve fiksasyon aşamasında kullanılan PFA konsantrasyonu çok önemlidir. Çalışmanın

başlangıcında denenen, oda sıcaklığında 1 saat boyunca 10 µg/µl konsantrasyonunda Proteinaz K uygulanması ve ardından oda sıcaklığında 20 dk. %4 PFA içeren PBS ile fiksasyon gerçekleştirilmesi sonucunda antikorun dokulara nüfuz etmediği ve embriyonun dış çeperinde biriktiği gözlenmiştir. Farklı konsantrasyonların denenmesinin ardından, tüm örnek immünfloresan boyama deneyi için en uygun şartların, 2 saat boyunca 20 µg/µl Proteinaz K uygulaması ile permeabilizasyon ve ardından %2 oranında PFA içeren PBS ile fiksasyon yapılması olduğu bulunmuştur (Bkz. Gereç ve Yöntem, Sayfa 41). Fiksasyon sırasında kullanılan PFA'nın oranının düşürülmesi, embriyonun dış çeperinin daha gevşek bir yapı kazanmasını sağlarken; Proteinaz K miktarının ve uygulama süresinin arttırılması permeabilizasyonu arttırmıştır. Bu iki optimizasyon çalışmasının ardından, antikorun dokulara nüfuz edebildiği gözlenmiştir.

Optimizasyon çalışmasının ardından, yabanıl tip AB balıklarda gerçekleştirilen tüm örnek immünfloresan boyamada ve ardından lazer taramalı konfokal mikroskobu kullanılarak elde edilen kesit görüntülerinde, hem somitlerde hem de bağırsakta desmin boyanması tespit edilmiştir (Şekil 4.20. ve Şekil 4.21.). *İn sitü* hibridizasyon çalışmasında, döllenmeden sonra 96. saatte *desma*'nın somitlerde, *desmb*'nin ise bağırsakta ifade edildiği gösterildiğinden, yabanıl tip AB balıklarda gerçekleştirilen immünfloresan boyamada, somitlerde yerleşim gösteren proteinin desma, bağırsakta yerleşim gösteren proteinin ise desmb olduğu tespit edilmiştir.

Ardından, *desma KO* (-/-) ve *desmb KO* (-/-) balıklarda da tüm örnek immünfloresan boyama gerçekleştirilmiştir. *KO* (-/-) balıklarda gerçekleştirilen çalışmada, yabanıl tip AB balıklar pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. *desma KO* (-/-) balıklarda bağırsakta, *desmb KO* (-/-) balıklarda ise hem bağırsakta hem de somitlerde boyanma tespit edilmiştir (Şekil 4.20 ve Şekil 4.21). *desma KO* (-/-) balıklarda desma mRNA ifadesi bulunmadığından, gerçekleşen boyanma desmb proteininin ifade olduğu dokuyu göstermektedir. *desma KO* (-/-) balıklarda yalnızca bağırsakta boyanma tespit edilmiş olması, *desmb*'nin protein düzeyinde de *desma* yokluğunu telafi edemediğini göstermiştir. *desmb KO* (-/-) balıklarda desmb ifadesi bulunmadığından, bu balıklarda gerçekleşen boyanma desma proteininin yerleşimini göstermektedir. *desma*'nın yabanıl tip AB balıklarda gerçekleştirilen *in sitü*

hibridizasyon çalışmasında, bağırsakta mRNA ifadesi olmadığı gösterildiği için, *desmb KO* (-/-) balıklarda bağırsakta gerçekleşen boyanma desma proteininin bu bölgede de ifade olduğunu göstermektedir (Şekil 4.20. ve Şekil 4.21.). Elde edilen sonuçlar, desma'nın desmb yokluğunu protein düzeyinde telafi ettiğini göstermektedir.

Döllenmeden sonra 96. saatte, yabanıl tip AB, *desma KO* (-/-) ve *desmb KO* (-/-) balıklar arasında gerçekleştirilen *in sitü* hibridizasyon çalışması sonuçları ile immünfloresan boyama sonuçları karşılaştırıldığında, her iki sonuç birbirini desteklemektedir. Ancak, *desmb KO* (-/-) balıklardan elde edilen *in sitü* hibridizasyon sonuçlarında, *desma*'nın *desmb* yokluğunda, ön bağırsakta ifade olduğu tespit edilmişken; tüm örnek immünfloresan boyama sonuçlarında desma proteininin, desmb proteini yokluğunda tüm bağırsak boyunca ifade olduğu gösterilmiştir (Şekil 4.22.). Bu durum, *desmb KO* (-/-) balıklarda, orta ve son bağırsak kısımlarında mRNA ifadesinin düşük olması; ancak düşük düzeydeki mRNA ifadesinin, yeterli düzeyde protein sentezini sağlayabilmesi şeklinde yorumlanabilmektedir.

Tez çalışması sırasında, Hacettepe Üniversitesi, Patoloji Anabilim Dalı'nda, yabanıl tip AB, *desma KO* (-/-) ve *desmb KO* (-/-) erişkin (yaklaşık 1 yaşında) zebra balıklarının kas dokusundan kesitler alınmış ve rutin boyalar kullanılarak (HE, ORO, GOM, trikrom, PAS, d-PAS, NADH, SDH, COX, COX/SDH, 9,5-ATPaz) kasta herhangi bir patolojik bulgu olup olmadığı incelenmiştir. Bu belirteçlerle incelendiğinde, üç grup arasında kasta patolojik bir bulguya rastlanmamıştır (Bkz. EK 3). *desmb*'nin *desma* yokluğunda ifadesinin değişmemiş olması ve *KO* balıkların normal gelişim göstermesi, başka bir ara filament proteininin *desma* yokluğunu telafi edebileceğini düşündürmüştür. Bu durumda, desmin protein dizisine en yüksek benzerliği gösteren ve gelişimin erken döneminde (desmin ifadesi başlamadan önce) onun işlevini üstlenen vimentin proteini aday olarak seçilmiştir; ancak gerçekleştirilen kGZ-PZR çalışması sonucunda vimentin'in göreceli ifadesinde bir artış bulunmamıştır (Bkz. EK 2). Literatürde, *Des KO* (-/-) farelerde yapılan araştırmalarda, tez çalışmasına benzer şekilde farelerin normal gelişim gösterdiği, çiftleşebildiği ve vimentin'in desmin yokluğunu telafi edemediği ile ilgili sonuçlar elde edilmiştir (36). Ancak *Des KO* (-/-) farelerin kas hücrelerinde elektron

mikroskobu ile yapılan incelemelerde, organel ve çekirdek yerleşimlerinin, yabanıl tip farelere kıyasla bozulduğu gösterilmiştir. Bunun yanında, *Des KO* (-/-) farelerde kas oluşum sürecinin yabanıl tiplere benzer şekilde gerçekleşebildiği; ancak stres ve egzersiz sonucunda yeniden yapılanan kaslarda hasar oluşabildiği tespit edilmiştir. *desma KO* (-/-) balıklarda da, elektron mikroskobu ile kas hücrelerinde organel yerleşimlerinin incelenmesi ve kas hücrelerinde desmin ağının bozulup bozulmadığının araştırılması gerekmektedir.

Literatürde, zebra balıklarında *desma* ve *desmb* ifadesinin araştırılmasına yönelik, morfolino kullanılarak gerçekleştirilmiş *knockdown* çalışmaları yer almaktadır (22, 60). Ancak, bu çalışmalar kısa süreli etkileri yansıtsa da, gelişimsel süreçte bu genlerin ifade olmamasının hangi hücresel işlevlere etkisi olabileceğini detaylı araştırmak için yetersiz kalmaktadır. *desma KO* (-/-) ve *desmb KO* (-/-) zebra balıklarının oluşturulmuş olması, bu genlerin zebra balığında ifade olduğu dokuların belirlenmesi ve *KO* (-/-) balıkların gelişimsel süreç boyunca takip edilebilmesi, belirli aralıklarla histolojik ve morfolojik incelemeler yapılmasına ve bu genlerin işlevlerinin anlaşılmasına olanak verecektir. Ayrıca, *desma KO* (-/-) balıklarda daha ileri dönemlerde kas dejenerasyonu oluşup oluşmadığı takip edilebilecektir. Bunun yanında, *desma-desmb* çift *KO* (-/-,-/-) balıkların oluşturulması ve ardından bu balıklarda gerçekleştirilecek çalışmalar, tez çalışmasının sonuçlarına büyük katkı sağlayacaktır.

Tez çalışması sonucunda, yabanıl tip AB balıklarda gerçekleştirilen tüm örnek *in sitü* hibridizasyon çalışması ve ardından elde edilen dondurulmuş kesitlerde, *desma* ve *desmb*'nin 70. saate kadar, iskelet kasında ve kalp kasında benzer yerleşim gösterdiği; ancak 70. saatten sonra *desma* büyük ölçüde iskelet kası ve kalp kasında ifade olurken, *desmb*'nin çoğunlukla düz kaslarda ifade olduğu bulunmuştur. Yabanıl tip AB zebra balıklarında döllenmeden sonra 96. saatte gerçekleştirilen tüm örnek immünfloresan boyama çalışmasında ise desma proteininin yoğun olarak somitlerde, desmb proteininin ise bağırsaktaki yerleşimi gösterilmiştir. *desma KO* (-/-) balıklarda gerçekleştirilen tüm örnek *in sitü* hibridizasyon çalışması ve ardından alınan dondurulmuş kesitler yabanıl tip AB balıklarla karşılaştırıldığında, *desma* ifadesi olmadığında, *desmb*'nin döllenmeden sonra 24. ve 48. saatlerde somitlerde düşük

düzeyde ifade olduğunu göstermiştir. *desma KO* (-/-) zebra balıklarında *desmb*'nin, döllenmeden sonra 70. saatten itibaren bağırsakta ifade olduğu; ancak yabanıl tip AB balıklardan farklı olarak pektoral yüzgeç kaslarında ifade olmadığı gözlenmiştir. *desma KO* (-/-) balıklarda, döllenmeden sonra 96. saatte gerçekleştirilen immünfloresan boyama deneyleri ile desmb proteininin bağırsakta ifade olduğu gösterilmiştir. Bu sonuçlar birlikte değerlendirildiğinde, *desmb*'nin *desma KO* (-/-) balıklardaki *desma* yokluğunu telafi edemediği bulunmuştur. *desmb KO* (-/-) balıklarda gerçekleştirilen tüm örnek in situ hibridizasyon çalışması ve ardından alınan dondurulmuş kesitler yabanıl tip AB balıklardaki sonuçlarla karşılaştırıldığında, *desma*'nın her iki grupta da çalışma yapılan tüm saatlerde somitlerde ifade olduğu bulunmuştur. Ayrıca, her iki grupta da *desma*'nın, döllenmeden sonra 48. saatten itibaren kalpte ve 72. saatten itibaren göz kasları, mandibular kaslar, pektoral yüzgeç kasları ve özefagusta ifade olduğu bulunmuştur. *desmb KO* (-/-) balıklarda, yabanıl tip AB balıklardan farklı olarak, ön bağırsakta da *desma* ifadesi tespit edilmiştir. *desmb KO* (-/-) balıklarda gerçekleştirilen immünfloresan boyama çalışmasında somitlerde ve bağırsakta elde edilen boyanma, desma proteininin yerleşimini göstermektedir. İki deney sisteminden elde edilen veriler birlikte ele alındığında, *desmb KO* (-/-) zebra balıklarında, *desma*'nın yabanıl tip AB balıklardan farklı olarak, bağırsakta da ifade olduğu bulunmuştur.

Yabanıl tip AB, *desma KO* (-/-) ve *desmb KO* (-/-) zebra balıklarında gerçekleştirilen, *desma* ve *desmb*'nin ifadesine ilişkin yapılan çalışmalardan elde edilen bu verilerin, literatüre katkı sağlama potansiyeli yüksek olup, ileride bu genlere yönelik yapılacak çalışmalara ışık tutacağı düşünülmektedir.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

6.1 Sonuç

Yüksek lisans tez çalışmasında elde edilen sonuçlar aşağıda belirtilmiştir.

- Yabanıl tip AB balıklarda, tüm örnek *in sitü* hibridizasyon çalışması ve ardından elde edilen dondurulmuş kesitlerde, *desma* ve *desmb*'nin 70. saate kadar, iskelet kasında ve kalp kasında benzer yerleşim gösterdiği; ancak 70. saatten sonra *desma* büyük ölçüde iskelet kası ve kalp kasında ifade olurken, *desmb*'nin çoğunlukla düz kaslarda ifade olduğu bulunmuştur.
- Yabanıl tip AB zebra balıklarında döllenmeden sonra 96. saatte gerçekleştirilen tüm örnek immünfloresan boyama çalışmasında, desma proteininin somitlerde ve desmb proteininin bağırsaktaki yerleşim gösterdiği tespit edilmiştir.
- *desma KO* (-/-) balıklarda gerçekleştirilen, tüm örnek *in sitü* hibridizasyon çalışması ve ardından alınan dondurulmuş kesitlerin sonuçları yabanıl tip AB balıklarla karşılaştırıldığında, *desma KO* (-/-) balıklarda *desmb*'nin, döllenmeden sonra 70. saatten itibaren yabanıl tip AB balıklarla benzer şekilde bağırsakta ifade olduğu; ancak yabanıl tip AB balıklardan farklı olarak pektoral yüzgeç kaslarında ifade olmadığı gözlenmiştir.
- *desma KO* zebra balıklarında *desmb*'nin, yabanıl tip AB balıklarla karşılaştırıldığında, döllenemeden sonra 24. ve 48. saatlerde somitlerde daha düşük düzeyde ifade olduğunu göstermiştir.
- *desma KO* (-/-) balıklarda *desmb*'nin, döllenmeden sonra 70. saatten itibaren yabanıl tip AB balıklarla benzer şekilde bağırsakta ifade olduğu; ancak yabanıl tip AB balıklardan farklı olarak pektoral yüzgeç kaslarında ifade olmadığı gözlenmiştir.
- *desma KO* (-/-) balıklarda ifade olan *desmb*'nin, *desma* yokluğunu telafi edemediği bulunmuştur.
- *desmb KO* (-/-) balıklarda gerçekleştirilen tüm örnek *in sitü* hibridizasyon çalışması ve ardından alınan dondurulmuş kesitler yabanıl tip AB balıklardaki sonuçlarla karşılaştırıldığında, *desma*'nın her iki grupta da

somitlerde ifade olduğu bulunmuştur. Ayrıca, her iki grupta da *desma*'nın, döllenmeden sonra 48. saatten itibaren kalpte ve 72. saatten itibaren göz kasları, mandibular kaslar, pektoral yüzgeç kasları ve özefagusta ifade olduğu bulunmuştur.

- *desmb KO* (-/-) balıklarda gerçekleştirilen *in sitü* hibridizasyon çalışmasında, yabanıl tip AB balıklardan farklı olarak ön bağırsakta da *desma* ifadesi tespit edilmiştir.
- *desmb KO* (-/-) balıklarda gerçekleştirilen immünfloresan boyama çalışmasında, somitlerde ve bağırsakta gözlenen boyanma, desma proteininin yerleşimini göstermektedir.
- *desmb KO* (-/-) balıklarda *desma*'nın, yabanıl tip AB balıklardan farklı olarak, bağırsakta da ifade olduğu bulunmuştur.

6.2 Öneriler

Tez çalışmasını takiben yapılabilecek olan çalışmalar aşağıda sıralanmıştır.

- *desma KO* (-/-) ve *desmb KO* (-/-) balıkların kas hücrelerinde, elektron mikroskobu ile detaylı incelemeler gerçekleştirilmesi, ardından bulunan sonuçlar yabanıl tip AB balıklarla karşılaştırıldığında, hücre içi desmin ağının ve buna bağlı olarak miyofibril yerleşimlerinin, çekirdek ve organel pozisyonlarının bozulup bozulmadığı incelenmelidir.
- *desma KO* (-/-) balıklarda, gelişimin daha ileri dönemlerinde kas dejenerasyonu oluşup oluşmadığının takip edilmesi gerekmektedir.
- *desma KO* (-/-) balıklarda gelişimin ileri dönemlerinde de kas dejenerasyonu gözükmemesi durumunda, *desma* yokluğunu telafi edebilecek başka ara filament proteinleri olup olmadığı araştırılmalıdır.
- *desmb KO* (-/-) zebra balıklarında desma'nın, bağırsağın hangi kısımlarında ifade olduğunun detaylı olarak araştırılması gerekmektedir.
- *desma-desmb* çift *KO* (-/-,-/-) balıkların oluşturulması ve ardından bu balıklarda iki genin de bulunmaması durumunda ortaya çıkan fenotipin araştırılması, tez bulgularına önemli bir katkı sağlayacaktır.

7. KAYNAKLAR

1. Marieb E. Human Anatomy and Physiology. 1995, Redwood City. California: Benjamin/Cummings.

2. Wolfe RR. The underappreciated role of muscle in health and disease. The American journal of clinical nutrition. 2006;84(3):475-82.

3. Goebel HH, editor Introduction. Seminars in pediatric neurology; 2011: Elsevier.

4. Laing NG. Genetics of neuromuscular disorders. Critical reviews in clinical laboratory sciences. 2012;49(2):33-48.

5. Norwood FL, Harling C, Chinnery PF, Eagle M, Bushby K, Straub V. Prevalence of genetic muscle disease in Northern England: in-depth analysis of a muscle clinic population. Brain. 2009:awp236.

6. Costa M, Escaleira R, Cataldo A, Oliveira F, Mermelstein C. Desmin: molecular interactions and putative functions of the muscle intermediate filament protein. Brazilian journal of medical and biological research. 2004;37(12):1819-30.

7. Capetanaki Y, Milner D. Desmin cytoskeleton in muscle integrity and function. Sub-cellular biochemistry. 1998;31:463.

8. Granger BL, Lazarides E. The existence of an insoluble Z disc scaffold in chicken skeletal muscle. Cell. 1978;15(4):1253-68.

9. Tokuyasu K, Dutton AH, Singer S. Immunoelectron microscopic studies of desmin (skeletin) localization and intermediate filament organization in chicken skeletal muscle. The Journal of cell biology. 1983;96(6):1727-35.

10. Thornell LE, Eriksson A, Johansson B, Kjörell U, Franke WW, Virtanen I, et al. Intermediate Filament and Associated Proteins in Heart Purkinje Fibers: A Membrane Myofibril Anchored Cytoskeletal Systema. Annals of the New York Academy of Sciences. 1985;455(1):213-40.

11. Lazarides E. Intermediate filaments as mechanical integrators of cellular space. Nature. 1980;283(5744):249-56.

12. Fuchs E, Weber K. Intermediate filaments: structure, dynamics, function and disease. Annual review of biochemistry. 1994;63(1):345-82.

13. Goldfarb LG, Olivé M, Vicart P, Goebel HH. Intermediate filament diseases: desminopathy. The sarcomere and skeletal muscle disease: Springer; 2008. p. 131-64.

14. Capetanaki Y, Papathanasiou S, Diokmetzidou A, Vatsellas G, Tsikitis M. Desmin related disease: a matter of cell survival failure. Current opinion in cell biology. 2015;32:113-20.

15. Clemen CS, Herrmann H, Strelkov SV, Schröder R. Desminopathies: pathology and mechanisms. Acta neuropathologica. 2013;125(1):47-75.

16. Gibbs EM, Horstick EJ, Dowling JJ. Swimming into prominence: the zebrafish as a valuable tool for studying human myopathies and muscular dystrophies. FEBS Journal. 2013;280(17):4187-97.

17. Lin YY. Muscle diseases in the zebrafish. Neuromuscul Disord. 2012;22(8):673-84.

18. Berger J, Berger S, Hall TE, Lieschke GJ, Currie PD. Dystrophin-deficient zebrafish feature aspects of the Duchenne muscular dystrophy pathology. Neuromuscular Disorders. 2010;20(12):826-32.

19. Berger J, Currie PD. Zebrafish models flex their muscles to shed light on muscular dystrophies. Disease Models and Mechanisms. 2012;5(6):726-32.

20. Costa ML, Escaleira RC, Rodrigues VB, Manasfi M, Mermelstein CS. Some distinctive features of zebrafish myogenesis based on unexpected distributions of the muscle cytoskeletal proteins actin, myosin, desmin, α-actinin, troponin and titin. Mechanisms of development. 2002;116(1):95-104.

21. Bassett DI, Bryson-Richardson RJ, Daggett DF, Gautier P, Keenan DG, Currie PD. Dystrophin is required for the formation of stable muscle attachments in the zebrafish embryo. Development. 2003;130(23):5851-60.

22. Ramspacher C, Steed E, Boselli F, Ferreira R, Faggianelli N, Roth S, et al. Developmental Alterations in Heart Biomechanics and Skeletal Muscle Function in Desmin Mutants Suggest an Early Pathological Root for Desminopathies. Cell Rep. 2015;11(10):1564-76.

23. S Hikida R. Aging changes in satellite cells and their functions. Current aging science. 2011;4(3):279-97.

24. Frontera WR, Ochala J. Skeletal muscle: a brief review of structure and function. Calcif Tissue Int. 2015;96(3):183-95.

25. Ottenheijm CA, Granzier H. Lifting the nebula: novel insights into skeletal muscle contractility. Physiology. 2010;25(5):304-10.

26. Huxley AF, Niedergerke R. Structural changes in muscle during contraction; interference microscopy of living muscle fibres. Nature. 1954;173(4412):971-3.

27. Huxley H, Hanson J. Changes in the cross-striations of muscle during contraction and stretch and their structural interpretation. Nature. 1954;173:973-6.

28. Cooke R. Actomyosin interaction in striated muscle. Physiological Reviews. 1997;77(3):671-97.

29. Mescher AL. Junqueira's basic histology: text and atlas. Mcgraw-hill; 2013.

30. Gautel M. The sarcomeric cytoskeleton: who picks up the strain? Current opinion in cell biology. 2011;23(1):39-46.

31. Gautel M, Djinovic-Carugo K. The sarcomeric cytoskeleton: from molecules to motion. J Exp Biol. 2016;219(Pt 2):135-45.

32. Eriksson JE, Dechat T, Grin B, Helfand B, Mendez M, Pallari H-M, et al. Introducing intermediate filaments: from discovery to disease. The Journal of clinical investigation. 2009;119(7):1763-71.

33. Coulombe PA, Wong P. Cytoplasmic intermediate filaments revealed as dynamic and multipurpose scaffolds. Nature cell biology. 2004;6(8):699-706.

34. Lazarides E. Intermediate filaments: a chemically heterogeneous, developmentally regulated class of proteins. Annual review of biochemistry. 1982;51(1):219-50.

35. Capetanaki Y, Bloch RJ, Kouloumenta A, Mavroidis M, Psarras S. Muscle intermediate filaments and their links to membranes and membranous organelles. Exp Cell Res. 2007;313(10):2063-76.

36. Li Z, Mericskay M, Agbulut O, Butler-Browne G, Carlsson L, Thornell L-E, et al. Desmin is essential for the tensile strength and integrity of myofibrils but not for myogenic commitment, differentiation, and fusion of skeletal muscle. The Journal of cell biology. 1997;139(1):129-44.

37. Allen RE, Rankin LL, Greene EA, Boxhorn LK, Johnson SE, Taylor RG, et al. Desmin is present in proliferating rat muscle satellite cells but not in bovine muscle satellite cells. Journal of cellular physiology. 1991;149(3):525-35.

38. Li H, Capetanaki Y. Regulation of the mouse desmin gene: transactivation by MyoD, myogenin, MRF4 and Myf5. Nucleic acids research. 1993;21(2):335-43.

39. Li Z, Lilienbaum A, Butler-Browne G, Paulin D. Human desmin-coding gene: complete nucleotide sequence, characterization and regulation of expression during myogenesis and development. Gene. 1989;78(2):243-54.

40. Goldman RD, Cleland MM, Murthy SP, Mahammad S, Kuczmarski ER. Inroads into the structure and function of intermediate filament networks. Journal of structural biology. 2012;177(1):14-23.

41. Tang DD. Intermediate filaments in smooth muscle. American Journal of Physiology-Cell Physiology. 2008;294(4):C869-C78.

42. Paulin D, Li Z. Desmin: a major intermediate filament protein essential for the structural integrity and function of muscle. Exp Cell Res. 2004;301(1):1-7.

43. Hnia K, Ramspacher C, Vermot J, Laporte J. Desmin in muscle and associated diseases: beyond the structural function. Cell Tissue Res. 2015;360(3):591-608.

44. Capetanaki Y. Desmin cytoskeleton: a potential regulator of muscle mitochondrial behavior and function. Trends in cardiovascular medicine. 2002;12(8):339-48.

45. Schröder R, Vrabie A, Goebel HH. Primary desminopathies. Journal of cellular and molecular medicine. 2007;11(3):416-26.

46. Walter M, Reilich P, Huebner A, Fischer D, Schröder R, Vorgerd M, et al. Scapuloperoneal syndrome type Kaeser and a wide phenotypic spectrum of adult-

onset, dominant myopathies are associated with the desmin mutation R350P. Brain. 2007;130(6):1485-96.

47. Cetin N, Balci-Hayta B, Gundesli H, Korkusuz P, Purali N, Talim B, et al. A novel desmin mutation leading to autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophy: distinct histopathological outcomes compared with desminopathies. J Med Genet. 2013;50(7):437-43.

48. Santoriello C, Zon LI. Hooked! Modeling human disease in zebrafish. The Journal of clinical investigation. 2012;122(7):2337-43.

49. Howe K, Clark MD, Torroja CF, Torrance J, Berthelot C, Muffato M, et al. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. Nature. 2013;496(7446):498-503.

50. Langheinrich U. Zebrafish: a new model on the pharmaceutical catwalk. Bioessays. 2003;25(9):904-12.

51. Taylor JS, Van de Peer Y, Braasch I, Meyer A. Comparative genomics provides evidence for an ancient genome duplication event in fish. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences. 2001;356(1414):1661-79.

52. P Chitramuthu B. Modeling Human Disease and Development in Zebrafish. Human Genetics & Embryology. 2013;03(01).

53. Devoto SH, Melançon E, Eisen JS, Westerfield M. Identification of separate slow and fast muscle precursor cells in vivo, prior to somite formation. Development. 1996;122(11):3371-80.

54. Bassett DI, Currie PD. The zebrafish as a model for muscular dystrophy and congenital myopathy. Hum Mol Genet. 2003;12 Spec No 2:R265-70.

55. Stickney HL, Barresi MJ, Devoto SH. Somite development in zebrafish. Developmental Dynamics. 2000;219(3):287-303.

56. Guyon JR, Steffen LS, Howell MH, Pusack TJ, Lawrence C, Kunkel LM. Modeling human muscle disease in zebrafish. Biochim Biophys Acta. 2007;1772(2):205-15.

57. Felsenfeld AL, Curry M, Kimmel CB. The fub-1 mutation blocks initial myofibril formation in zebrafish muscle pioneer cells. Developmental biology. 1991;148(1):23-30.

58. Williamson RA, Henry MD, Daniels KJ, Hrstka RF, Lee JC, Sunada Y, et al. Dystroglycan is essential for early embryonic development: disruption of Reichert's membrane in Dag1-null mice. Human molecular genetics. 1997;6(6):831-41.

59. Loh S-H, Chan W-T, Gong Z, Lim T-M, Chua K-L. Characterization of a zebrafish (Danio rerio) desmin cDNA: an early molecular marker of myogenesis. Differentiation. 2000;65(5):247-54.

60. Li M, Andersson-Lendahl M, Sejersen T, Arner A. Knockdown of desmin in zebrafish larvae affects interfilament spacing and mechanical properties of skeletal muscle. The Journal of general physiology. 2013;141(3):335-45.

61. Holmberg A, Olsson C, Holmgren S. The effects of endogenous and exogenous nitric oxide on gut motility in zebrafish Danio rerio embryos and larvae. Journal of experimental biology. 2006;209(13):2472-9.

8. EKLER

EK-1: Tez Çalışması ile İlgili Etik Kurul İzni.

A.

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU

06100 Sıhhıye Ankara
Telefon: 0 (312) 305 1090-1082 • Faks: 0 (312) 310 0580
www.etikkurul.hacettepe.edu.tr/index_hdk.php

[redacted]
Sayı: 52338575 – 15

20 Subat 2014

HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURUL KARARI

TOPLANTI TARİHİ	:	18.02.2014 (SALI)
TOPLANTI SAYISI	:	2014/01
DOSYA KAYIT NUMARASI	:	2014/07
KARAR NUMARASI	:	2014/07-08
ARAŞTIRMA YÜRÜTÜCÜSÜ	:	Prof.Dr. Pervin DİNÇER
HAYVAN DENEYLERİNDEN SORUMLU ARAŞTIRMACI	:	Prof.Dr. Pervin DİNÇER, Öğr. Gör. Burcu HAYTA, Doç.Dr. Özlen KONU, Gülsüm KAYMAN-KÜREKÇİ, Tülay ARAYICI
YARDIMCI ARAŞTIRMACILAR	:	Yrd.Doç.Dr.Beril TALİM, Prof.Dr. Sevim ERDEM-ÖZDAMAR, Prof.Dr. Petek KORKUSUZ ve Prof.Dr. Nuhan PURALI
ONAYLANAN HAYVAN TÜRÜ ve SAYISI	:	Zebra balığı (Danio rerio) 4000 embriyo, 48 erişkin

Üniversitemiz Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Prof.Dr. Pervin DİNÇER'in araştırma yürütücüsü olduğu 2014/07 kayıt numaralı ***"Desmin Mutasyonunun Protein İşlevi Üzerindeki Etkisinin Zebra Balığı Modelinde Araştırılması"*** isimli çalışma Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesi'ne göre uygun bulunarak oy birliği ile onaylanmasına karar verilmiştir.

Sorumlu araştırmacı deneylere başlangıç tarihini Etik Kurula bildirmekle yükümlüdür.

Prof. Dr. Sema ÇALIŞ
Etik Kurul Başkanı

B.

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU

06100 Sıhhiye-Ankara
Telefon: 0 (312) 305 1090-1082 • Faks: 0 (312) 310 0580
www.etikkurul.hacettepe.edu.tr/index_hdk.php

Sayı: B.30.2.HAC.0.05.06.00/21

16 Şubat 2015

Prof.Dr.Pervin DİNÇER
Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı
Öğretim Üyesi

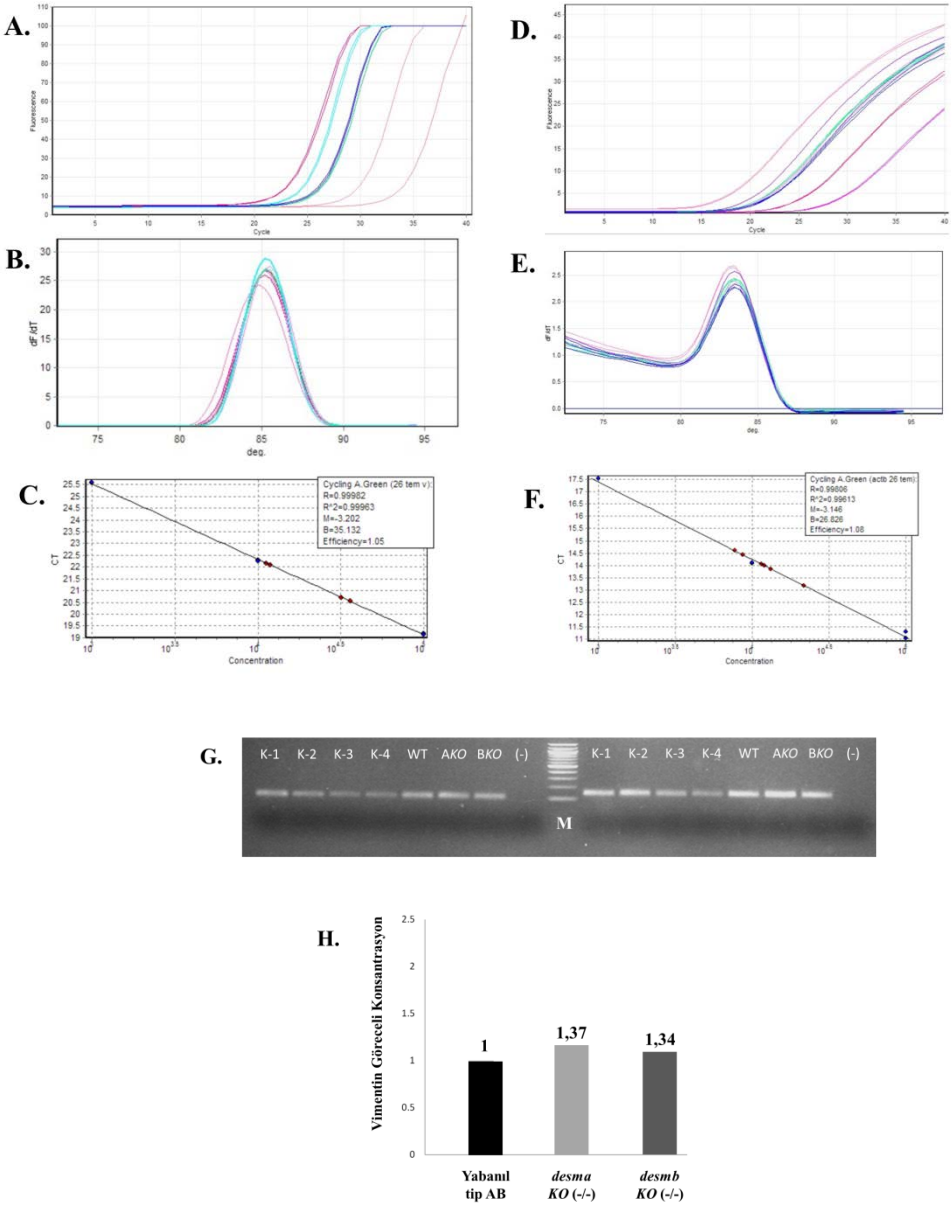
Sayın Prof.Dr.Pervin DİNÇER,

Sorumlu araştırmacısı olduğunuz Kurulumuzun 18.02.2014 tarihli toplantısında onaylanan, 2014/07 dosya kayıt numaralı ve ***"Desmin Mutasyonunun Protein İşlevi Üzerindeki Etkisinin Zebra Balığı Modelinde Araştırılması"*** başlıklı çalışmaya Ecem KURAL ve Cansu KOYUNLAR'ın yardımcı araştırıcı olarak eklenmesi Kurulumuzun 03.02.2014 tarihli toplantısında görüşülmüş olup, uygun bulunmuştur.

Bilgilerinizi saygılarımla rica ederim.

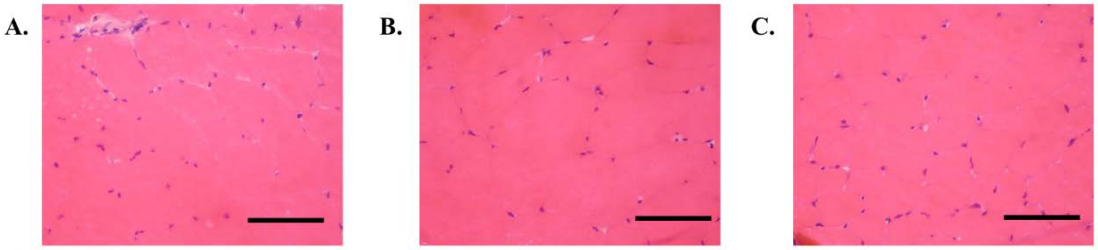
Prof. Dr. Sema ÇALIŞ
Etik Kurul Başkanı

EK-2: Vimentin İfadesinin kGZ-PZR Çalışması İle Analizi.



Ek Şekil 1. Yabanıl tip AB, *desma KO* (-/-) ve *desmb KO* (-/-) zebra balıklarında, vimentin'in (*vim*) mRNA ifade düzeyinin analizi. A: *vim* amplifikasyon eğrisi, B: *vim* erime eğrisi, C: *vim* standart eğri, D: *actb1* amplifikasyon eğrisi, E: *actb1* erime eğrisi, F: *actb1* standart eğri, G: *actb1* (sol) ve *vim* (sağ) transkriptine özgül amplifikasyon ürünlerinin %3'lük agaroz jel görüntüsü. K-1: Standart kontrol örneği, K-2: 10^{-1} standart dilüsyon, K-3: 10^{-2} standart dilüsyon, K-4: 10^{-3} standart dilüsyon, WT: Yabanıl tip AB örneği, A*KO*: *desma KO* (-/-) örneği, B*KO*: *desmb KO* (-/-) örneği, (-): Negatif kontrol, M: 100 bç moleküler ağırlık belirteci.

EK-3: Erişkin Zebra Balıklarının Kas Dokusundan Alınan Kesitlerde Gerçekleştirilen Hematoksilen Eozin Boyaması.



Ek Şekil 2. Erişkin zebra balıklarının kas dokusundan, Hacettepe Üniversitesi, Patoloji Anabilim Dalı'nda alınan transversal kesitlerde gerçekleştirilen hematoksilen eozin boyaması. Üç zebra balığı grubunda da patolojik bulguya rastlanmamıştır. A: yabanıl tip AB, B: *desma KO* (-/-), C: *desmb KO* (-/-). Ölçek: 250 µm.

9. ÖZGEÇMİŞ

I- Bireysel Bilgiler

Adı-Soyadı: Cansu Koyunlar

Doğum yeri ve tarihi: Karşıyaka, 1991

Uyruğu: T.C.

İletişim adresi ve telefonu: Sokullu Caddesi, Nimet Sokak 16/7 Dikmen/Ankara, +905312877476

II- Eğitimi

Yüksek Lisans, Hacettepe Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı	2014- 2017
Lisans, Hacettepe Üniversitesi, Biyoloji Bölümü	2009-2014
Ayrancı Anadolu Lisesi	2005-2009

III- Mesleki Deneyimi

Desmin mutasyonunun protein işlevi üzerindeki etkisinin zebra balığı modelinde araştırılması (TUBİTAK, Proje no: 214S174), Bursiyer

IV- Bilimsel Faaliyetleri

Yayınları:

Taskiran EZ, Korkmaz E, Gucer S, Kosukcu C, Kaymaz F, Koyunlar C, Bryda EC, Chaki M, Lu D, Vadnagara K, Candan C, Topaloglu R, Schaefer F, Attanosio M, Bergmann C, Ozaltin F. Mutation in ANKS6 causes Nephronophthisis-Like Phenotype and End Stage Renal Disease. J Am Soc Nephrol 2014 Aug; 25(8): 1653–1661.

Kural E, Kayman-Kürekci G, Koyunlar C, Dincer P. Hacettepe University Zebrafish Research Laboratory : Zebrafish Disease Modeling By Genome Editing Tools. FEBS J. 2016;283:116.