



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



**AGRESİF PERİODONTİTİSTE ETKİN GLT6D1
GENİNİN ZEBRABALIĞINDAKİ ORTOLOĞUNUN
TANIMLANMASI**

Rahme BARBAROS

**PERİODONTOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Doç. Dr. Gülden EREŞ**

**ANKARA
2018**

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**AGRESİF PERİODONTİTİSTE ETKİN GLT6D1
GENİNİN ZEBRABALIĞINDAKİ ORTOLOĞUNUN
TANIMLANMASI**

Rahme BARBAROS

**PERİODONTOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

DANIŞMAN

Doç. Dr. Gülden EREŞ

**Bu araştırma Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Müdürlüğü'nün
17B0234001 proje numarası ile desteklenmiştir.**

ANKARA

2018

Etik Beyan

Ankara Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Doktora tezi olarak hazırlayıp sunduğum “Agresif periodontitiste etkin GLT6D1 geninin zebrabalığındaki ortoloğunun tanımlanması” başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Doktora Öğrencisinin Adı Soyadı : Rahme BARBAROS
Tarih :
İmza :

KABUL VE ONAY

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Periodontoloji Anabilim Dalında Rahme Barbaros tarafından hazırlanan “Agresif
Periodontitiste Etkin GLT6D1 Geninin Zebrabalığındaki Ortoloğunun
Tanımlanması” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından
DOKTORA TEZİ olarak OY BİRLİĞİ/ÇOKLUĞU ile kabul/ret edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi:
03/09/2018

Jüri Başkanı
Prof. Dr. Murat AKKAYA

Üye
Doç. Dr. Gülden EREŞ

Üye
Doç. Dr. Özlen KONU

Üye
Prof. Dr. Nilgün Özlem ALPTEKİN

Raportör
Prof. Dr. Elif ÜNSAL

Tez hakkında alınan jüri kararı, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır.

Prof. Dr. Mehmet AKAN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Kabul ve Onay	iii
İçindekiler	iv
Önsöz	vi
Simgeler ve Kısaltmalar	viii
Şekiller	ix
Çizelgeler	xi
1.GİRİŞ	1
1.1. Periodontitis	1
1.2. Periodontitiste Genetik Faktörlerin Rolü	2
1.2.1. Gen Polimorfizmleri	3
1.2.1.1. Sitokin Gen Polimorfizmleri	3
1.2.1.2. Hücre Yüzey Reseptörü Polimorfizmleri	5
1.2.1.3. Metabolizmayla İlişkili Gen Polimorfizmleri	6
1.2.1.4. Antijen Tanıma ile İlişkili Gen Polimorfizmleri	7
1.2.1.4.1. İnsan Lökosit Antijen Polimorfizmleri	7
1.2.1.4.2. CD14 Polimorfizmleri	7
1.3. GWAS Çalışmalarında Agresif Periodontitisle İlişkili Bulunan Gen Polimorfizmleri ve Genler	8
1.4. Genetik Çalışmalarda Kullanılan Omurgalı Hayvan Modelleri	11
1.4.1. Hayvan Modeli Olarak Zebrabalığı Tercih Edilmesinin Sebepleri	11
1.4.1.1. Zebrabalığı Dişleri ve Diş Gelişimi	13
1.5. Zebrabalığında Dişle İlgili Yapılan Çalışmalar	16
2. GEREÇ VE YÖNTEM	21
2.1. Etik Kurul Onayı	21
2.2. Zebrabalığı ve Embriyolar	21
2.3. Biyoenformatik Analizler	21
2.4. Zebrabalığında GLT6D1 Geninin Olası Ortologlarının İfade Analizi	22
2.4.1. RNA Ekstraksiyonu ve cDNA Eldesi	22
2.4.2. Gerçek Zamanlı PCR ile Embriyolardaki İfade Profiline Belirlenmesi	23
2.5. Paralog Gbgt113 Geninin Alternatif Kırılma Analizi	24
2.6. İstatistiksel Analizler	24
3. BULGULAR	27
3.1. GLT6D1 Geninin Biyoenformatik Analizi	27
3.2. RT-qPCR ile İlgili Genlerin Embriyolardaki İfade Profillerinin Belirlenmesi	33
3.2.1. Referans Genlerin (Actb2 ve Elfa Genleri) DNA Uzaklaştırması Yapılarak ve Yapılmadan Elde Edilen Embriyo Örneklerinde Ortaya Koydukları İfade Profiline Belirlenmesi	33
3.2.2. Fabp10a Geninin DNA Uzaklaştırılarak ve Uzaklaştırılmadan Elde Edilen Embriyo Örneklerinde Ortaya Koyduğu Göreceli İfadesi	36

3.2.3. Paralog Gbgt113 Geninin DNA Uzaklaştırılarak ve Uzaklaştırılmadan Elde Edilen Embriyo Örneklerinde Ortaya Koyduğu Göreceli İfadesi	38
3.2.4. Paralog Gbgt114 Geninin DNA Uzaklaştırılarak ve Uzaklaştırılmadan Elde Edilen Embriyo Örneklerinde Ortaya Koyduğu Göreceli İfadesi	43
3.2.5. Paralog Gbgt111 Geninin DNA Uzaklaştırılarak ve Uzaklaştırılmadan Elde Edilen Embriyo Örneklerinde Ortaya Koyduğu Göreceli İfadesi	45
3.3. Gbgt113 Geninin Alternatif Kırılma Analizi	47
4. TARTIŞMA	49
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	58
ÖZET	59
SUMMARY	60
KAYNAKLAR	61
EKLER	68
EK 1. Etik Kurul Kararı	68
EK 2. Fotoğraf Kullanma İzni	69
EK 3. Fotoğraf Kullanma İzni	71
ÖZGEÇMİŞ	72

ÖNSÖZ

Doktora eğitimim sürecinde değerli bilgi, tecrübe ve yardımlarını benden hiçbir zaman esirgemeyen, hem hoşgörüsü ve güler yüzüyle çalışmalarımızı keyifli hale getiren hem de eğitim haricinde yaşadığım tüm sıkıntılarda her zaman yanımda olan, özveri ve gayretini örnek aldığım, üzerimde büyük emekleri olan çok sevgili hocam Doç. Dr. Gülden EREŞ'e,

Bu araştırma Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Müdürlüğü'nün desteklediği 17B0234001 numaralı "Agresif Periodontitiste Etkin GLT6D1 Geninin Zebrabalığındaki Ortoloğunun Tanımlanması" isimli bağımsız projenin bir bölümüdür. Bilkent Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü ile ortak yürüttüğümüz bu proje aracılığıyla tanıştığım, çalışmanın gerçekleşmesinde yol gösteren, engin tecrübe ve bilgilerini benden esirgemeyen değerli hocam Doç. Dr. Özlen KONU'ya,

Mesleki ve hayat tecrübeleriyle eğitimim boyunca her zamanda yanımda olup bana yol gösteren, sevgi ve hoşgörüsünü esirgemeyen, üzerimdeki emeklerini hiçbir zaman unutamayacağım değerli hocam Prof. Dr. Murat AKKAYA'ya,

Hayvan deneyleri ve laboratuvar çalışmaları esnasında güleryüzleri ve sonsuz sabırlarıyla bana yardımcı olan Bilkent Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü asistanları Ayşe Gökçe KEŞKÜŞ, Fatma Betül DİNÇASLAN, Tuğberk KAYA, Bilkent Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Zebrabalığı Tesisi teknisyeni Tülay Arayıcı'ya ve Ankara Üniversitesi Moleküler Biyoloji Laboratuvarı araştırma görevlisi Dr. Ayça YILMAZ'a,

Zorlu doktora eğitimim süresince ortak projede birlikte görev aldığımız, sevgisini kalbimde, desteğini her zaman omzumda hissettiğim, bu süreci keyifle geçirmemde büyük emeği olan, sevgili dostum ve bölüm arkadaşım Canan BOZ başta olmak üzere, aynı ortamda çalışmaktan büyük keyif aldığım, eğitimim sonrasında da devam

edecek güçlü dostluk bağı kurduğum diğer bölüm arkadaşlarıma ve kürsü personeline,

Doktora eğitimim boyunca mesleki ve bilimsel tecrübelerinden yararlandığım, yardımlarını benden sakınmayan değerli bölüm hocalarım Prof. Dr. Meral GÜNHAN, Prof. Dr. Elif ÜNSAL, Prof. Dr. Yaşar AYKAÇ, Prof. Dr. Adnan TEZEL, Doç. Dr. Nilsun BAĞIŞ, Doç. Dr. Şivge KURGAN, Doç. Dr. Canan ÖNDER ve kıdemlilerim Dr. Dt. Fatma KARACAOĞLU, Dr. Dt. İlkin KARADAĞ'a,

Eğitimimin ve hayatımın iyi kötü her anında yıllardır yanımda olan, varlığıyla bana güç veren, koşulsuz sevgi ve desteğini hissettiren, hayattaki en büyük şanslarımdan olan can dostum uzman Dt. Meryem ZİYA başta olmak üzere tüm dostlarıma,

Bugünlere gelmemde ve bu eğitimi almamda en büyük emeğe sahip, sevgi ve şefkatleriyle hayatım boyunca her zaman yanımda olan, zor zamanlarımda bana sonsuz sabır gösteren, haklarını hiçbir zaman ödeyemeyeceğim, çocukları olmaktan gurur duyduğum canım annem Emel BARBAROS, canım babam Hasan BARBAROS, doktora mezuniyetimi görmeyi dört gözle bekleyen ama artık aramızda olmayan canım dedem Halil KANSEL ve desteklerini her zaman hissettiğim canım ablam Burcu BARBAROS ile abimden öte olan eniştem Enver ENVEROĞLU başta olmak üzere tüm aileme sonsuz teşekkür ediyorum.

SİMGELER VE KISALTMALAR

%	Yüzde
µl	Mikrolitre
BMP	Kemik Morfogenik Protein
Ct	Threshold Cycle
dpf	Fertilizasyondan sonra gün
EtBr	Etidyum Bromür
FcγR	Fc-Gama Reseptörü
FGF	Fibroblast Büyüme Faktörü
GATA-3	Gata Bağlayıcı Protein 3
GLT	Glikoziltransferazlar
GWAS	Genom Çaplı İlişkilendirme Çalışmaları
Ig G	İmmunglobulin G
IL-1	İnterlökin-1
IL-6	İnterlökin-6
MHC	Majör Doku Uygunluk Kompleksi
ml	mililitre
MMP	Matriks Metalloproteinaz
ng	Nanogram
°C	Santigrat Derece
<i>P. gingivalis</i>	<i>Porphyromonas gingivalis</i>
RT-qPCR	Gerçek Zamanlı PCR
s	Saniye
S1P	Sfingosin-1-fosfat
SNP	Tek Nükleotid Polimorfizmi
TLR	Toll Like Reseptör
Tm	Temperature of Melting
TNF-α	Tümör Nekroz Faktör α
UV	Ultraviyole
V	Volt
VDR	Vitamin D Reseptörü
ΔCT	Delta CT

ŞEKİLLER

Şekil 1.1. GLT6D1'in insan dokularındaki jel elektroforez görüntüsü	10
Şekil 1.2. Yetişkin zebrabalığı görüntüsü (Wild type-yabanıl tür)	12
Şekil 1.3. Yetişkin zebrabalığından diseke edilen 5. farengeal ark görüntüsü	14
Şekil 2.1. Ekzon 1-5 bölgesi için primer tasarımı	25
Şekil 2.2. Ekzon 4-7 bölgesi için primer tasarımı	26
Şekil 3.1. GLT6D1 geninin insandaki paralogları	29
Şekil 3.2. GLT6D1 geninin filogenetik analizi	30
Şekil 3.3. GLT6D1 geninin insan protein sekansının zebrabalığı genomuyla eşleştirilmesi (%36 benzer sekans)	31
Şekil 3.4. GLT6D1'in zebrabalığındaki olası ortolog genlerinin ifade profilleri	32
Şekil 3.5. Elfa ve Actb2 referans genlerinin DNA uzaklaştırması yapılarak ve yapılmadan elde edilen örneklerde ortaya koydukları ifade profilleri	34
Şekil 3.6. (a) Actb2 geninin 2, 3, 4, 5, 6 günlük embriyolardan DNA çıkartma yapılarak ve yapılmadan elde edilen örneklerde ortaya koyduğu ifade değerlerinin korelasyon analizi ile karşılaştırılması (b) Elfa geninin 2, 3, 4, 5, 6 günlük embriyolardan DNA çıkartma yapılarak ve yapılmadan elde edilen örneklerde ortaya koyduğu ifade değerlerinin korelasyon analizi karşılaştırılması	35
Şekil 3.7. Fabp10a geninin DNA çıkartma yapılarak ve yapılmadan elde edilen örneklerde ortaya koyduğu ifade profilinin Actb2 ve Elfa referans genleriyle normalizasyonu	37
Şekil 3.8. Paralog Gbgt113 geninin DNA çıkartma yapılarak ve yapılmadan elde edilen örneklerde ortaya koyduğu ifade profilinin Actb2 ve Elfa referans genleriyle normalizasyonu	40
Şekil 3.9. (a) Paralog Ggt113 geninin Actb2 referans geniyle normalize edilmesi sonucunda DNA çıkartma yapılarak ve yapılmadan elde edilen 2, 3, 4, 5, 6 günlük embriyo örneklerinde ortaya koyduğu ifade değerlerinin korelasyon analizi ile karşılaştırılması (b) Paralog Ggt113 geninin Elfa referans geniyle normalize edilerek DNA çıkartma yapılarak ve yapılmadan elde edilen 2, 3, 4, 5, 6 günlük embriyo örneklerinde ortaya koyduğu ifade değerlerinin korelasyon analizi ile karşılaştırılması	41
Şekil 3.10. DNA uzaklaştırması yapılan 3, 4, 5 günlük embriyo örneklerinin RT-qPCR amplifikasyon ürünlerinin %1.5'luk agaroz jel elektroforez görüntüsü	42

Şekil 3.11. Paralog Gbgt114 geninin DNA çıkartma yapılarak ve yapılmadan elde edilen örneklerde ortaya koyduğu ifade profilinin Actb2 ve Elfa referans genleriyle normalizasyonu 44

Şekil 3.12. Paralog Gbgt111 geninin DNA çıkartma yapılarak ve yapılmadan elde edilen örneklerde ortaya koyduğu ifade profilinin Actb2 ve Elfa referans genleriyle normalizasyonu 46

Şekil 3.13. Altı günlük embriyolardan elde edilen örneklere 1-5, 4-7 ve 1-7 ekzon bölgelerine ait primerler kullanılarak yapılan Gradient PCR uygulamasının %1.5'luk agaroz jel elektoroforez görüntüsü 47

Şekil 3.14. İki, 3, 4, 5, 6 günlük embriyo örneklerinin ekzon 1-5 ve ekzon 4-7 bölgelerine ait primerlerle 60°C'de yapılan PCR ürünlerinin %1.5'luk agaroz jel elektoroforez görüntüsü 48



ÇİZELGELER

Çizelge 2.1. Gbgt1l3, Gbgt1l1, Gbgt1l4, Actb2, Elfa, Fabp10a genleri için tasarlanan forward ve reverse primerler	24
Çizelge 2.2. Ekzon 1-5 ve ekzon 4-7 bölgeleri için tasarlanan primerler	26



1.GİRİŞ

1.1. Periodontitis

Periodontitis, immunoenflamatuvar konak cevaplarını uyararak alveoler kemik ve ataçman kaybına sebep olan enfeksiyöz bir hastalıktır (Duarte ve ark., 2015). Bir başka deyişle periodontitis; periodonsiyumun bakteriyel ürünler, çok sayıda hücre popülasyonu ve enflamatuvar mediatörler arasındaki etkileşimlerini içeren kronik enflamatuvar bir durumdur. Periodontitisin, diş yüzeyinde oluşan karmaşık ve çeşitli mikrobiyal biyofilmler yani dental plak tarafından başlatıldığı kabul edilir. Bu biyofilmden salınan lipopolisakkaritler, antijenler ve diğer virülans faktörleri gibi maddeler dişeti dokularına geçer ve konak savunma hücrelerinin aktivasyonuna yol açan enflamatuvar ve immün yanıtı başlatırlar. Hücresel aktivasyonun sonucu olarak sitokinler, kemokinler, araşidonik asit metabolitleri, proteolitik enzimler gibi enflamatuvar mediatörler doku yıkımı ve kemik kaybına katkıda bulunurlar (Yucel-Lindberg ve Bage, 2013). Periodontitisin başlıca klinik özellikleri klinik ataçman kaybı, alveolar kemik kaybı, periodontal cep oluşumu ve gingival enflamasyondur. Buna ek olarak; dişetinde sondalamadan sonra kanama, dişeti büyümesi veya çekilmesi, dişte mobilite artışı ve diş kaybı görülebilir (Flemmig, 1999).

Agresif ve kronik periodontitis multifaktöriyel etiyolojiye sahip olan karmaşık hastalıklardır. Bu etiyolojik faktörler karmaşık bir etkileşim mekanizmasıyla modifiye edilmektedir (Vieira ve Albandar, 2014). Periodontal hastalıkların başlıca etiyolojik ajanı; tüm sert ve yumuşak doku yüzeylerinde oluşabilen, yapışık, bakteriyel biyofilm olan dental plaktır (Fine, 1988). Esas etiyolojik faktör olan ve yüzlerce bakteri türünü içeren dental plağın yanısıra diğer sebepler; hem diş-kök yüzeyi üzerinde hem de cep epitelinde bulunan subgingival biyofilm, genetik faktörler ve epigenetik modifikasyonlar, sigara içme, stres, kötü beslenme gibi yaşam

tarzıyla ilişkili risk faktörleri, özellikle diyabet olmak üzere bireyde görülen sistemik hastalıklardır (Van der Velden, 2017).

Kronik periodontitis, genelde yetişkinlerde gözlenir ve belirgin şekilde biyofilm ve kalkulus birikimiyle birlikte yavaş bir şekilde ilerler (Duarte ve ark., 2015). Agresif periodontitis ise genç yaşlarda başlayan, yüksek seviyelerde biyofilm ve kalkulus miktarıyla ilişkili olması gerekmeyen, hızlı alveoler kemik yıkımıyla birlikte periodontal ataçman kaybı da izlenen ve ailesel geçiş gösterme eğiliminde olan bir hastalıktır (Duarte ve ark., 2015; Tonetti ve Mombelli, 1999).

Kronik ve agresif periodontitiste, doku kaybının patogenezi ve mekanizması benzer olsa da konak faktörlerinin doku kaybındaki etkisi bariz bir şekilde daha belirleyicidir. Örneğin, agresif periodontitisin ailesel kümelenme gösterdiğine dair güçlü kanıtlar vardır ve hastalığın gelişim riskini arttıracabilecek birkaç genetik faktör tanımlanmıştır. Hastalığın ailesel paterni, genetik yatkınlığın bulunduğunu gösteren önemli bir özelliktir. Bunun aksine kronik periodontitiste lokal etiyolojik faktörler ana rol oynarken, konak faktörlerinin rolü daha az öneme sahiptir (Albandar, 2014).

1.2. Periodontitiste Genetik Faktörlerin Rolü

Günümüzde, genetik faktörlerin doğal immün sistemi düzenlediği ortaya konulmuştur. Bazı genetik polimorfizmler, enfekte edici mikroorganizmaların saldırılarına karşı bağışıklık sisteminin savunmada başarısız olmasına ve immün sistemin bozulmasına sebep olurlar (Vieira ve Albandar, 2014).

Bakteriyel enfeksiyonlara karşı konak yanıtında etkili olan genetik değişkenler periodontitis için önemli risk faktörleridirler. Çok sayıda genetik ilişkilendirme çalışması, proteinleri kodlayan genlerin periodontitise duyarlılık durumunda verilen immün cevapta olası bir rolü olduğunu göstermiştir (Hashim ve ark., 2015).

1.2.1. Gen Polimorfizmleri

Periodontitise verilen konak cevabında bazı genlerin ve bunların polimorfizmlerinin rolleri hakkında yayınlanan çok sayıda bilimsel makale vardır. Genetik polimorfizmler, kodlanmış proteinde veya ekspresyonunda değişime neden olarak doğal ve adaptif immünitede değişikliklere yol açabilirler ve bu durum hastalıkla sonuçlanmada belirleyici olabilir (Laine ve ark., 2012).

Periodontitisle ilgili yapılan çoğu genetik araştırmada, immünoregülasyon veya metabolizmada rol oynayan sitokinler, hücre yüzey reseptörleri, metabolizmaya alakalı ve antijen tanıma ile ilişkili gen polimorfizmlerine odaklanılmıştır. Tüm bu gen polimorfizmleri konağın bakterilere karşı verdiği immun cevabı değiştirmektedir (Yoshie ve ark., 2007).

1.2.1.1. Sitokin Gen Polimorfizmleri

İnterlökin-1 (IL-1), interlökin-6 (IL-6), tümör nekroz faktörü- α (TNF- α) gibi sitokinlerin, periodontal hastalığın fokal immünopatolojisinde önemli bir rol oynadığı bilinmektedir. Bu nedenle sitokin fonksiyonlarının genetik kontrolü ve polimorfizmleri, periodontitisin ortaya çıkışını veya şiddetini etkileyebilir (Nikolopoulos ve ark., 2008).

IL-1, esas olarak monositler, makrofajlar ve dendritik hücreler tarafından salınan güçlü bir pro-enflamatuar mediatördür (Yoshie ve ark., 2007). Periodontitis ile ilişkili IL-1 gen polimorfizmine yönelik literatürdeki ilk çalışmada; bir grup araştırmacı sigara içmeyen beyaz ırkta, IL-1A geninin -889 pozisyonundaki minör alleli ve IL-1B geninin +3954 pozisyonundaki minör allelinin kombine mevcudiyetinin kronik periodontitisin şiddeti ile ilişkili olduğunu bildirmişlerdir. Son yapılan çalışmalara göre bu kombinasyon, “IL-1 kompozit genotipi” olarak tarif edilmiştir (Vaithilingam ve ark., 2014).

Başka bir geniş kapsamlı vaka-kontrol çalışmasında agresif periodontitisin, IL-1 gen kümesinin IL-1A -889 (+4845), IL-1B -511 (-31), IL-1B +3954 IL-1RN +2018 pozisyonlarındaki 10 tane tek nükleotid polimorfizmiyle (SNP) olan ilişkisi araştırılmıştır. Bu çalışmaya beyaz ırktan 415 agresif periodontitis hastası ve 874 sağlıklı birey dahil edilmiştir. İncelenen 10 SNP'ten hiçbirisi hasta ve kontrol bireyleri arasındaki allel veya genotip frekansları açısından istatistiksel olarak anlamlı değildi (Fiebig ve ark., 2008).

Son literatür taramalarına göre, Nikolopoulos ve ark. (2008) daha önce beyaz ırkta IL-1 kompozit genotipi ile kronik periodontitis arasında ilişki bulan çalışmaya benzer şekilde, IL-1A -889 ve IL-1B +3953 R allelleri ile kronik periodontitis arasında bir ilişki olduğunu bildirmişlerdir. Meta analiz metodu kullanılarak yapılan bu çalışmada, agresif periodontitis ve IL-1 gen polimorfizmleri arasında herhangi bir ilişki bulunamadı. Vaka-kontrol çalışmaları hep birlikte ele alındığında, IL-1 gen kümesi polimorfizmlerinin agresif veya kronik periodontitis duyarlılığı için kesin risk faktörü olarak kabul edilemeyeceği bildirilmiştir (Vaithilingam ve ark., 2014).

TNF- α , pro-enflamatuvar bir sitokin olup geniş bir yelpazeye yayılan immün düzenleyici işlevlere sahiptir. Monositler, makrofajlar ve lenfositler tarafından üretilirler ve enflamasyon derecesini arttıran kemokinler veya siklo-oksijenaz ürünleri gibi ikincil mediyatörlerin üretimini uyarma potansiyeline sahiptirler (Laine ve ark., 2012; Loos ve ark., 2005).

Farklı etnik popülasyonlarda yapılan birçok çalışmada TNF- α gen polimorfizminin, periodontitis için risk faktörü olup olmadığı değerlendirilmiştir. TNF promotor değişkenlerinin araştırıldığı birçok vaka kontrol çalışması sonucunda çelişen bulgular ortaya çıkmıştır. TNF- α -380 bölgesindeki polimorfizm; Çekoslovakyalı beyaz ırkta kronik periodontitis duyarlılığıyla ilişkilendirilirken Hollanda, Polonya, İsveç veya ABD beyaz ırkında böyle bir ilişki tespit edilememiştir. Bu çalışmanın sonucunda, daha önce ABD beyaz ırkında aynı bölgedeki polimorfizmin kronik periodontitis şiddeti ile ilişkili bulunduğu çalışmayla tamamen zıt sonuçlar bulunmuştur. Aynı çalışmada agresif

periodontitisle bu bölgedeki polimorfizm arasında herhangi bir ilişki tespit edilemedi (Yoshie ve ark., 2007).

Yukarıda ifade edilen sitokinlerin dışında, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-13, IL-17 sitokinlerindeki gen polimorfizmleri ile periodontitis arasındaki ilişki birçok çalışma için araştırma konusu olmuştur (Laine ve ark., 2012; Vieira ve Albandar, 2014).

1.2.1.2. Hücre Yüzey Reseptörü Polimorfizmleri

Çok hücreli bir organizmanın içindeki hücreler, işlevlerini koordine etmek için birbirleriyle iletişim kurmalıdırlar. Doğrudan hücre-hücre iletişimi, hücre yüzeyinden çıkıntı yapan özel reseptör moleküllerinin etkileşimleri ile sağlanır. Bu etkileşimler, bir hücre tarafından hedef hücreye sinyal vermek için salgılanan moleküllerin uygun yüzey reseptör moleküllerine bağlanmasıyla gerçekleşir. Bu fizyolojik etkileşimlere paralel olarak, virüsler organizmayı enfekte etmek için hücre yüzeyi reseptörleri ile spesifik etkileşimlerden yararlanırlar (Deller ve Jones, 2000).

Fc-gama reseptörü (FcγR) fagositler üzerinde bulunan, immünglobulin G (IgG)'nin Fc kısmına bağlanan ve böylece bakterilerin opsonize edilip fagositoza uğramasında çok önemli rolü olan bir reseptördür. FcγR'ler periodontal dokularda immün hücrelerin çoğunda bulunurlar. Fc reseptörleri ile IgG alt sınıfları arasındaki bağlanma afinitesini etkileyen polimorfizmlerin, periodontal hastalığa yatkınlıkta önemli rol oynadığı düşünülmüştür (Kinane ve Hart., 2003).

Sarı ırkta yapılan bir çalışmada (Kobayashi ve ark., 2000), FcγRIIIA N alleli ve FcγRIIIB +141 R allelinin genotipiyle agresif periodontitis arasında bir ilişkili olduğu gösterilmiştir. Japon nüfusunda yapılan bir başka çalışmada (Sugita ve ark., 1999), FcγRIIIA R allelinin, periodontal hastalığın yeniden ortaya çıktığı durumda fazlaca tespit edildiği bulunmuştur. Detaylı bir literatür araştırılması yapıldığında, FcγR polimorfizmiyle periodontitis arasında ilişki bulan çalışma sayısı fazla

olmasına rağmen, zıt sonuçlar bulan çalışmaların da olduğu (Chai ve ark., 2011) bildirilmiştir.

1.2.1.3. Metabolizmayla İlişkili Gen Polimorfizmleri

Katepsin C; avuç içi, diz, oral keratinize dişeti gibi hiperkeratotik epitelyal lezyonlardan eksprese edilen bir proteinazdır (Hart ve ark., 1989). Katepsin C genindeki fonksiyonel mutasyonlar prepubertal periodontitis ve Papillon Le Fevre Sendromu için sebep olarak kabul edilebilirler (Noack ve ark., 2004).

D vitamini kalsiyum ve fosfor metabolizmasında rol oynar. İnsan Vitamin D Reseptör (VDR) geni osteokalsin seviyeleri ve kemik mineral yoğunluğu ile ilişkili fonksiyonel polimorfizmler sergilemektedir. Bu nedenle, VDR polimorfizmleri alveolar kemiğin yıkımında rol oynayabilir (Yoshie ve ark., 2007). Alveoler kemik rezorpsiyonu ve bakteriyel birikim periodontal hastalıkların başlıca özellikleri olduğundan, VDR ve bu reseptörün genetik polimorfizmleri periodontitis duyarlılığında rol oynar (Laine ve ark., 2012). Yapılan birçok çalışmada (de Brito ve ark., 2004; Hennig ve ark., 1999; Inagaki ve ark., 2003) periodontitisle VDR polimorfizmleri arasında ilişki bulunurken, buna zıt olacak şekilde periodontitisle VDR polimorfizmleri arasında ilişki saptanamayan bir çalışma (Yoshihara ve ark., 2001) da mevcuttur.

Matriks metalloproteinazlar (MMP) embriyonik gelişim, morfogenez, anjiyogenez, doku onarımı safhaları boyunca görülen fizyolojik ve patolojik olaylarda önemli bir rol oynarlar. Ayrıca periodontitis gibi enflamatuar bozukluklarda, bağ dokusunun aşırı yıkımından sorumludurlar. Enflame periodontal dokularda birçok MMP türü tanımlanmıştır (Ingman ve ark., 1996).

Yapılan bir çalışmada MMP-1 polimorfizminin şiddetli kronik periodontitisli 26 hastada; orta derecede kronik periodontitisli 24 hastaya ve 37 kontrol grubuna göre daha sık görüldüğü ortaya konmuştur (de Souza ve ark., 2003). Bunun aksini

belirten bir çalışmada (Itagaki ve ark., 2004); 37 agresif periodontitisli, 205 kronik periodontitisli hasta ve 142 sağlıklı bireyde MMP-1 ve MMP-3 polimorfizmleri araştırılmış ancak periodontitis ile anlamlı bir ilişki bulunamamıştır.

1.2.1.4. Antijen Tanıma ile İlişkili Gen Polimorfizmleri

1.2.1.4.1. İnsan Lökosit Antijen Polimorfizmleri

MHC (Majör Doku Uygunluk Kompleksi) sistemi, insan lökosit antijenlerini kodlayan genlerin kümelenmesinden oluşmaktadır (Bach ve ark., 1967). İnsan lökosit antijen bölgesi MHC 1 ve MHC 2 olmak üzere iki sınıfa ayrılır (Yoshie ve ark., 2007). Yapılan bir çalışmada (Shapira ve ark., 1994), araştırmacılar bazı insan lökosit antijenlerinin agresif periodontitisli hastalarda sağlıklı kontrollerle karşılaştırıldığında yükseldiğini bulmuşlardır. Japonlarda yapılan bir diğer çalışmada (Takashiba ve ark., 1994), insan lökosit antijen -DQa geniyle agresif periodontitise yatkınlık arasında anlamlı bir ilişki olduğu gösterilmiştir. Bu sonuçlara benzer şekilde son zamanlarda yapılan bir çalışmada (Machulla ve ark., 2002), bazı insan lökosit antijen allellerinin agresif periodontitis ve kronik periodontitisle önemli bir ilişkisi olduğu gösterilmiştir.

1.2.1.4.2. CD14 Polimorfizmleri

CD14 molekülü lipopolisakkaritlerin tanınması için gerekli bir reseptördür ve bakteriyel invazyona karşı doğal immün yanıtı başlatır (Goyert ve ark., 1988). Promotor bölgede -159 pozisyonunda, transkripsiyonel aktiviteye ve CD14 yoğunluğuna etki eden tek bir nükleotid polimorfizmi (C-T) tanımlanmıştır (Yoshie ve ark., 2007).

Batı Avrupalı hastalarda yapılan bir çalışmada (James ve ark., 2007), CD14 SNP'yle (-159 ve -1359) agresif periodontitis arasında ilişki bulunamazken,

Asp299Gly TLR-4 gen polimorfizmiyle azalmış agresif periodontitis riski arasında ilişki olduğu ortaya konmuştur.

Bir diğer çalışmada (Holla ve ark., 2002), Çek hastalarda CD14'ün -1359 C/T genotipinin şiddetli kronik periodontitis ile ilişkili olduğu bulunurken -159 G/T genotipi ile herhangi bir ilişki bulunamadı Japonya'da yürütülen başka bir çalışmada (Yamazaki ve ark., 2003), CD14 genotipinin periodontitis gelişimi ile ilişkili olmadığı, ancak erken hastalık aktivitesi ile ilişkili olabileceği saptanmıştır.

1.3. GWAS Çalışmalarında Agresif Periodontitisle İlişkili Bulunan Gen Polimorfizmleri ve Genler

Agresif periodontitis patogeneğinde, kronik periodontitise göre genetik faktörlerin daha önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir. Bu durum, agresif periodontitis patogeneğinde doğal immun sistemin büyük ölçüde önemi olmasına bağlanmaktadır. Bundan dolayı genetik ilişkilendirme çalışmalarında, agresif periodontitisin risk belirteçleri saptanmaya çalışılırken bağışıklık yanıtını düzenleyen genetik faktörler üzerinde odaklanılmıştır (Vieira ve Albandar, 2014).

Genom çaplı ilişkilendirme çalışmalarını (GWAS) takiben geniş vaka-kontrol popülasyonlarında yapılan kopyalama çalışmaları sonucunda, birkaç gen lokusunda agresif periodontitis için risk faktörü olabilecek bir takım SNP'ler tanımlanmıştır (Van der Velden, 2017).

GWAS, genomik DNA'daki yüzbinlerce hatta milyonlarca varyasyonu aynı anda analiz etmek ve herhangi bir lokusun belirli bir hastalık fenotipi ile ilişkili olup olmadığını belirlemek için güçlü bir moleküler tekniktir (Laine ve ark., 2014).

Yapılan literatür taramasında kronik periodontitise göre agresif periodontitisle daha yüksek derecede ilişkili bulunan çeşitli gen polimorfizmleri belirtilmiştir. GWAS'ın son 3 yıldaki raporlarında agresif periodontitisin birçok genle ilişkili

olduğu bildirilmiştir (Schaefer ve ark., 2014). Bu genlerden biri olan CDKN2B antisense RNA 1 (ANRIL) geninin agresif periodontitisle olan ilişkisini araştırmak için yapılan bir çalışmada (Schaefer ve ark., 2009), 35 yaş ve altında olan lokalize agresif periodontitis hastalarından ve aynı yaş aralığında kontrol grubu bireylerinden alınan kan örnekleri üzerinde çalışılmış ve tüm genom amplifikasyonları değerlendirilmiştir. Sonuç olarak agresif periodontitisle bu genin orta derecede ilişkiye sahip bir gen olduğu ortaya konmuştur

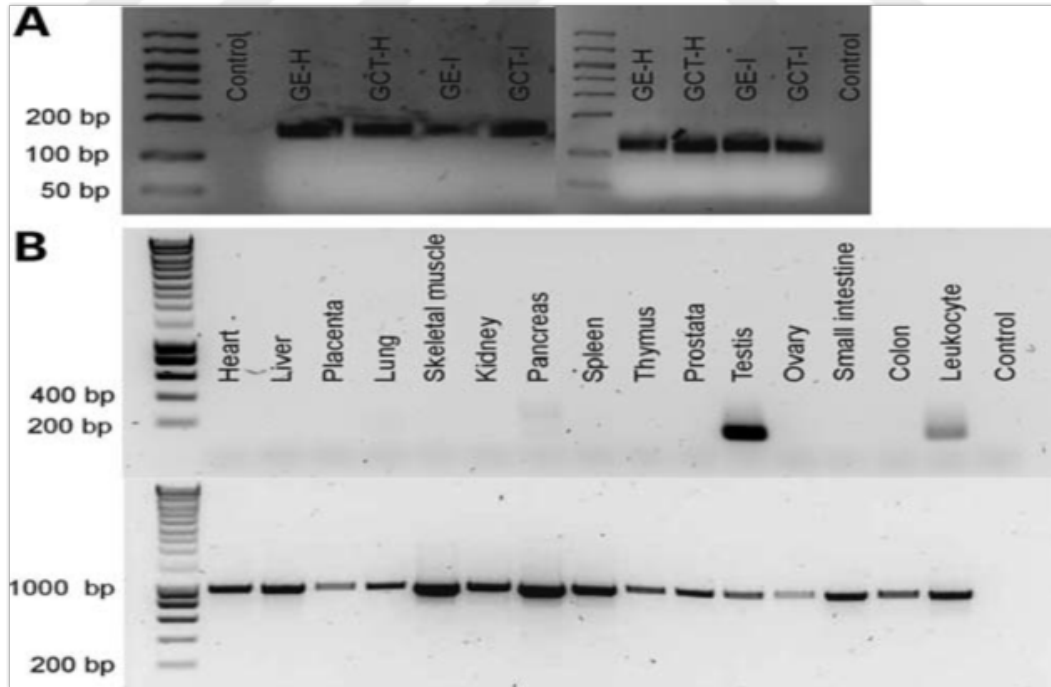
Bir başka gen araştırması için agresif periodontitis, şiddetli kronik periodontitis ve sağlıklı gönüllülerden elde edilen genomik DNA örnekleri değerlendirilmiştir. Bu çalışmanın raporlarına göre (Suzuki ve ark., 2004), CTSD geni agresif ve kronik periodontitisle orta derecede ilişkiye sahip bir diğer gendir.

FPR1 genini araştırmak için agresif periodontitisli ve sağlıklı bireylerden elde edilen periferik kan örneklerinden lökosit izolasyonu yapıp DNA ekstraksiyonu değerlendirilmiştir. Elde edilen verilere göre FPR1 geni agresif periodontitisle orta derecede ilişkiye sahip bir diğer gendir (Gunji ve ark., 2007).

GSTM1, IL-1B, IL-1RN, IL-6, PTSG2 gibi genler agresif periodontitisle orta derecede ilişkiye sahip olan diğer genlerdir (Carranza, 2015).

Son yapılan GWAS çalışmalarına göre, GLT6D1 agresif periodontitis ile ilişkilendirilen en güçlü aday gen olarak tanımlanmıştır (Schaefer ve ark. 2010). Glikoziltransferazlar (GLT), hücre içi membrana bağlı enzimlerin fonksiyonel bir ailesini oluştururlar. Çeşitli hücreler işlevlerinde önemli bir rol oynayan glikoproteinlerin ve glikolipidlerin karbonhidrat parçalarının biyosentezine katılırlar. GLT6 gen ailesi ABO kan grubu genlerinin de dahil olduğu bir gen ailesidir. Bu gen ailesinin filogenetiği memeli ve zeytin balığı da dahil olmak üzere birden çok tür için sekans bazında araştırılmıştır Ancak GLT6D1 zeytin balığı homologu ile ilgili bilgiler literatürde halen eksiktir (Turcot-Dubois ve ark., 2007). 2014 yılında Schaefer ve ark. periodontitisin genetik risk faktörlerinin tanımlanması için Alman agresif

periodontitisli hastalarda daha detaylı bir şekilde GWAS çalışmaları yaptılar. Bu çalışmanın sonucunda agresif periodontitisin GLT6D1 geninde bulunan intronik SNP rs1537415 polimorfizmi ile güçlü şekilde ilişkili olduğu bulundu. SNP, genomda belirli bir pozisyonda meydana gelen tek bir nükleotiddeki varyasyondur. Rs1537415 allelindeki SNP'in, transkripsiyon faktörü olan GATA bağlayıcı protein 3 (GATA-3)'ün bağlanmasında bozulmaya sebep olduğu gösterilmiştir. GATA-3 T-helper 2 hücre farklılaşmasının transkripsiyonel kontrolünde ana transkripsiyon faktörü olarak kabul edilir (Zheng ve Flavell, 1997). Schaefer ve ark. (2014) yaptıkları çalışmada; GLT6D1'in insan dokularındaki ekspresyon şablonunun analizini yaparak testis, lökositler, sağlıklı ve enflame gingival dokularda güçlü GLT6D1 ekspresyonu olduğunu göstermişlerdir. Bu çalışmada GLT6D1 geninin dokuya özel ifadesini göstermek için, elde edilen cDNA'lar RT-qPCR ile amplifiye edildikten sonra jel elektroforez deneyi gerçekleştirilmiştir. Sonuç olarak gingival bağ dokusunda gingival epitelden belirgin derecede daha güçlü GLT6D1 ifadesine rastlanılmıştır. GLT6D1 geninin hangi dokularda ifade olduğu Şekil 1.1.'de gösterilmektedir.



Şekil 1.1. GLT6D1'in insan dokularındaki jel elektroforez görüntüsü (Schaefer ve ark., 2014) (Resmin kullanımı için Oxford University Press'ten izin alınmıştır: Ek 2)

(A) Sağlıklı ve iltihaplı dişeti epitelinde (GE) ve dişeti bağ dokusunda (GCT) dokuya özgü ekspresyon H=sağlıklı, I= iltihaplı, kontrol=su.

(B) Kontrol=su

1.4. Genetik Çalışmalarda Kullanılan Omurgalı Hayvan Modelleri

Cavia porcellus (Gine domuzu, Kobay), *Cricetus cricetus* (Hamster), *Gallus gallus domesticus* (Tavuk), *Felis domesticus* (Kedi), *Canis lupus familiaris* (Köpek), *Mus musculus* (Fare), *Rattus norvegicus* (Sıçan, Rat), *Danio rerio* (Zebrabalığı), *Oryctolagus cuniculus* (Tavşan) and *Rana tigrina* (Kurbağa) gibi omurgalı hayvan modelleri genetik araştırmalar için kullanılmaktadır (Govind, 2011).

1.4.1. Hayvan Modeli Olarak Zebrabalığı Tercih Edilmesinin Sebepleri

Streisinger ve ark. (1981) zebrabalığını genetik model sistemi olarak belirlemişlerdir. Zebrabalığı, gelişimsel biyoloji, nörofizyoloji, biyomedikal araştırma ve etiyoloji alanlarında bilim adamları için umut vadeden bir model organizma haline gelmiştir (Friedrich ve ark., 2010). İnsan genomuyla zebrabalığı genomunun karşılaştırılması sonucunda, insan genlerinin yaklaşık %70'inin zebrabalığında ortologlarının var olduğu ortaya konmuştur (Howe ve ark., 2013). Zebrabalığı beyin, omurilik gibi organ ve dokuları olan, entegre sinir sistemine sahip omurgalı bir hayvan türüdür (Kabashi ve ark., 2011).

Zebrabalığı çok sayıda embriyo üretimi, kısa embriyonik gelişim dönemi, embriyoların transparan olması, DNA/RNA/protein dizisinin memeli organizmalarla yapı ve işlev benzerliği göstermesi dolayısı ile insan hastalık modeli olarak sıklıkla ve fareye alternatif olarak kullanılmaktadır (Doldur-Ballı ve ark., 2015) (Şekil 1.2). Zebrabalığının çok sayıda ve saydam embriyolar üretmesi sonucunda gelişim evrelerinin mikroskopik tekniklerle gözlenmesine olanak sağlanmaktadır. Ayrıca, embriyoların hızla gelişmesiyle temel gelişimsel olaylar memelilere göre daha erken ve daha hızlı gözlemlenir. Örneğin fertilizasyondan yaklaşık olarak 10 saat sonra sinir sisteminin oluşması (nörogenez), 18 saat sonra embriyoların ilk davranışları başlar ve yaklaşık 52 saat sonra embriyoların yumurtadan çıktığı gözlenir (Friedrich ve ark., 2010; Kabashi ve ark., 2011). İki günlük gelişimden sonra, zebrabalığı

embriyosunun iç organları, gözleri, kulakları ve 12 kısma ayrılan beyni oluşur (Nüsslein-Volhard ve Dahm, 2015).



Şekil 1.2. Yetişkin zebrabalığı görüntüsü (Wild type-yabanıl tür)

(<https://www.biochemie.abi.med.uni-muenchen.de/haass/zebrafish/index.html> internet erişim adresindeki resmin kullanımı için içerikten sorumlu Dr. Bettina Schmid'ten yazışma aracılığıyla izin alınmıştır: Ek 3)

Yapılan literatür taraması sonucunda mutant zebrabalığı karakterizasyonunun, insanda görülen hastalıklardan sorumlu gen veya genlerin tanımlanmasına katkıda bulunduğu bir dizi başarılı vaka saptanmıştır. Örneğin zebrabalığının weissherbst mutantında, ferroportin1 geni hipokromik kan oluşumundan sorumludur. Bu mutantın fonksiyonel analizi zebrabalığındaki ferroportin1'in, embriyonun beslenmesini sağlayan yumurta kısmından demir taşınması için gerekli olduğunu ortaya koymuştur (Donovan ve ark., 2000). Bu keşiften bir yıl sonra iki farklı grup (Montosi ve ark., 2001; Njajou ve ark., 2001) bağımsız olarak, insan Ferroportin1'inin diyetel iyonun aşırı emilmesi ile karakterize olan kalıtsal hemokromatozis hastalarında mutasyona uğradığını bildirmiştir. Başka bir çalışmada (Kawahara ve ark., 2009) bir grup araştırmacı, zebrabalığı kalp mutantını analiz ederken, yeni bir zar proteini olan Spns2'nin, sfingosin-1-fosfatın (S1P) lipid mediyatörünün taşıyıcısı olarak işlev gördüğünü bulmuştur. Bu çalışmadan sonra, memelilerde bulunan Spns2'nin endotelial hücrelerde S1P salgısını düzenlediği gösterilmiştir (Hisano ve ark., 2012a,b). Bu bulgular gelişimsel gen fonksiyonlarının zebrabalığı ve insanlar arasında uyumlu olduğunu ve konjenital insan anomalileri

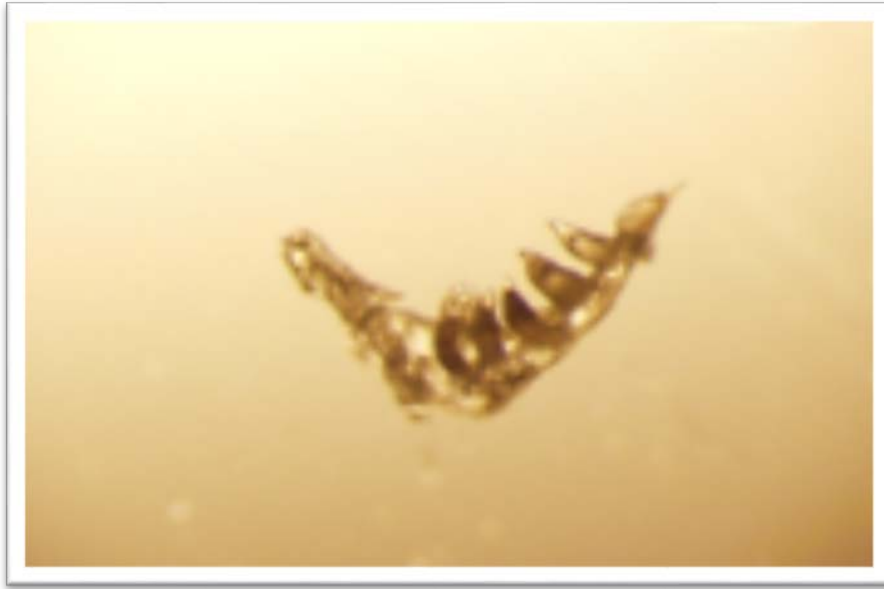
çalışılırken zebrabalığı kullanmanın yararlılığını göstermektedir (Ota ve Kawahara, 2014).

Zebrabalığı genetik manipölasyonların kolay yapılabilirdiği güçlü bir model organizma olması sebebiyle diş hekimliğinde diş rejenerasyonu alanındaki çalışmalarda tercih edilmektedir fakat periodontitise neden olan genler ve gen polimorfizmleri alanında zebrabalığı modeli kullanılarak yapılan bir çalışmaya rastlanmamıştır. Periodontoloji alanında olmasa da insanlarda yarık dudak-damak vakalarına sebep olan gen polimorfizmleri temel alınarak zebrabalığında çalışmalar yapılmıştır. Örneğin Leslie ve ark., (2015), insanlarda yarık dudak ve kombine yarık dudak-damakla ilişkilendirilen genlerin zebrabalığındaki fonksiyonel varyantları üzerinde çalışmışlar ve anlamlı sonuçlar bulmuşlardır. Yapılan literatür taraması sonucunda zebrabalığında MHC sınıf 1 ve 2 polimorfizmlerini araştıran çalışmalara (Graser ve ark., 1996) ulaşılmıştır. İnsan lökosit antijenlerini kodlayan MHC sistemiyle ilgili polimorfizmlerin zebrabalığında çalışılmasının önemi; agresif periodontitisle insan lökosit antijen allelleri arasında ilişki bulunan çalışmalar dikkate alındığında (Machulla ve ark., 2002) zebrabalığı modelinin kullanılarak periodontitise neden olan genler ve polimorfizmlerle ilgili araştırmalar yapılması için ümit vadetmesidir.

1.4.1.1. Zebrabalığı Dişleri ve Diş Gelişimi

Zebrabalığı, dişlerin ömrü boyunca sürekli olarak değiştiği anlamına gelen polifodont bir organizmadır. Zebrabalığı oral dentisyon göstermez fakat posterior branşial arklarla ilişkili farengeal dişlere sahiptir (Van der Heyden ve ark., 2000). Bu dişlerin basit morfolojisi birçok omurgalı türün dişlerine benzerlik göstermektedir (Neues ve ark., 2006). Zebrabalığı dişleri, beşinci keratobranşiyallerin olduğu bölgede konumlanan ve farengeal çeneler diye adlandırılan çeneler üzerinde bulunurlar. Zebrabalığının dişleri farengeal bölgede olsa da yapılan morfolojik çalışmalar zebrabalığının diş gelişiminin memeli diş gelişimi ile belirgin benzerlikler taşıdığını göstermiştir (Bruneel ve ark., 2015). Bu dişler vücudun her iki tarafında

simetrik olarak bulunan; üzerinde 5 diş bulunan ventral dizi, üzerinde 4 diş bulunan mediodorsal dizi, üzerinde 2 diş bulunan dorsal dizi olmak üzere üç diş dizisinden oluşmaktadır. Toplamda her faregeal arkta 11 adet diş vardır (Van der Heyden ve ark.,) (Şekil 1.3). İlk diş, ventral diş dizisindeki dördüncü pozisyonda gelişir ve fertilizasyondan 48 saat sonra erken morfogenez evresinde mikroskopik olarak görüntülenebilir. Ventral diş dizisi fertilizasyondan 16 gün sonra tamamlanır ve ilk diş değiştirme bu diş dizisi tamamlanmadan çok önce yaklaşık olarak embriyo oluşumundan sonra 80. saatte gözlenir (Bruneel ve ark., 2015). Mediodorsal dizideki dişler fertilizasyon sonrası 14-24. günler arasında gelişir ve en son olarak fertilizasyondan sonra 24-28. günler arasında dorsal dizideki dişler gelişir. Bu nedenle yapılacak embriyo çalışmalarında özellikle ventral dişlere yoğunlaşılması mantıklı olacaktır. Gelişen fazla odontojenik dalgalanma sonucunda yer değiştiren dişlerin oluşumu başlamakta fakat ilk oluşan dişlerin görünme zamanına göre yeniden diş oluşma sayısı farklılık göstermektedir. Her diş ailesi içerisinde bulunan dişlerin sayısı, yaşı daha büyük juvenil ve olgun zebrabalıklarında yer değiştirme hızının düşmesiyle birlikte azalma göstermiştir (Van der Heyden ve ark., 2000).



Şekil 1.3. Yetişkin zebrabalığından diseke edilen 5. faregeal ark görüntüsü
(Bu görüntü Bilkent Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Zebrabalığı Tesisi'nde Tülay Arayıcı tarafından çekilmiştir)

Zebrabalığı dişlerinin oluşumu ve değişimiyle ilgili dinamiklerin araştırıldığı bir çalışmaya göre (Van der Heyden ve ark., 2000), diş gelişimi memelilerinki gibi belirgin tomurcuk, takke, çan ve diferansiasyon aşamalarından geçer. Diş oluşumu, dişin şekli ya da boyutu ne olursa olsun beş başarılı gelişim evresi ile tamamlanır. Morfogenezisin başlangıcı olan birinci aşamada odontojenik epitelyum kalınlaşır ve invaze olmaya başlar. Devam eden morfogeneze evresi olarak bilinen ikinci aşamada, epitel çan oluşturmak amacıyla yeniden invaze olur ve aşağı yönde büyüme görülmeye başlar. Hücre farklılaşmasının görüldüğü aşama olan üçüncü aşamada, ilk matriks çökmesi dişin uç kısmında olmakta ve bu arada epitelyal organın aşağı yöndeki büyümesi devam etmektedir. Tutunma aşaması olarak adlandırılan dördüncü aşamada yeni oluşmuş diş kemik ataçmanı oluşturarak kemik desteğine tutunur ve fonksiyona gelmek için farengeal epitel diler. Rezorpsiyon ve dökülme aşaması olan beşinci aşamada osteoklastlar destek kemiği, ataçman kemiği ve dentini rezorbe eder. Yeni tutunan fonksiyonel diş, pulpalarındaki özellikleri ile eski dişten farklılık gösterir.

Önceki dişin epiteline bağlı olan ve lamina sekeli olarak isimlendirilen epitelyal bir büyümeden meydana gelen dişler sürekli olarak yenilenmektedir. Geriye kalan lamina erken morfogeneze aşamasında kalınlaşarak yeniden ortaya çıkar. Bu lamina geç morfogeneze aşamasında, bir dış ve bir iç epitel tabakasından oluşan iki katmanlı çan şeklinde bir yapı oluşturur. Preameloblastların ve preodontoblastların farklılaşması, erken hücre farklılaşması evresini işaret eder. Geç hücre farklılaşması evresine ulaşıldığında, diş ucunda mine ve dentin matriksinin birikmesi başlar. Tüm bunların sonunda, diş altta yatan farengeal çeneye ankiloza benzer bir mekanizmayla tutunur (Bruneel ve ark., 2015).

Farengeal dişlerin basit morfolojisi birçok omurgalı türün dişlerine benzerlik göstermektedir. Yeni diş oluştuğunda eski diş dökülmekte ve yenisi diş arkında tutunarak fonksiyonel hale gelmektedir. Çoğu omurgalı hayvan gibi yetişkin zebrabalığı dişleri de, pulpa boşluğunu çevreleyen dentinden oluşur ve hipermineralize bir tabaka ile çevrelenir. Kron yapısı ince tabaka şeklinde bulunan mineyle kaplanmıştır. Diş yapısı odontoblastlar ve pulpa hücreleriyle birlikte pulpa

odasını çevreleyen tübüler dentin ve mineden oluşmaktadır (Neues ve ark., 2006). Mine yapısı omurgalı türlere ait dişlerden organik içeriği bakımından farklılık göstermektedir (Arnold ve ark., 2008). Dentin, tip I kollajen lifleri ve diğer proteinlerin matriksindeki karbon apatit kristallerinden oluşur ve odontoblastlar olarak bilinen mezenkimal kaynaklı hücreler tarafından üretilir. Zebrabalığı dentini de, diğer omurgalı türlerde baskın dentin tipi olan ortodentindir. Yetişkin zebrabalığı dişlerinin pulpa boşluğu sinirlerden ve kan damarlarından zengindir. Zebrabalığı larvalarının dişlerinde görülen dentin ve pulpa boşluklarının yapısı yetişkinlerden daha farklıdır. Bu durumun olası sebebi, larva boyutlarının yetişkinlere göre daha küçük olmasıdır. Larva dentini tübüllerden yoksundur, pulpa boşluğu ise sadece birkaç odontoblast hücresi içerirken hiçbir kılcal damar veya sinir içermez (Stock, 2007). Kök yapısı alttaki branşiyal kemiğe özelleşmiş bir kemik bağlantısı ile tutunmuştur. Farengial dişler zebrabalıklarının yaşam süreleri boyunca 11-13 gün içerisinde sürekli olarak yenilenmektedir. Bu durum zebrabalığını, mine ve dentinin gelişimi ve biyomineralizasyonu açısından araştırma yapılabilmesi için model organizma yapmaktadır (Arnold ve ark., 2008).

1.5. Zebrabalığında Dişle İlgili Yapılan Çalışmalar

Zebrabalığında yapılan diş hekimliği alanındaki çalışmalar genelde diş gelişim aşamaları, dişlerin yer değiştirmesi ile ilgili dinamikler, diş gelişimine katkıda bulunan yapılar, sinyalizasyon mekanizmaları ile ilgilidir. Yapılan literatür taraması sonucunda periodontal hastalıklar ile ilgili genlerin modellemesi için zebrabalığı kullanılarak yapılan herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Yapılan bir çalışmada (Zhang ve ark., 2016), zebrabalığı larvalarında dental florozisin derecelendirilmesi ve ölçülmesiyle ilgili parametrelere bakılmıştır. Bu çalışmada, zebrabalığı yumurtaları oluştuktan sonra 5 gün boyunca fazla miktarda flora maruz bırakılmışlardır (19 ppm, 38 ppm ve 76 ppm). İlk süren dişlerde gözlenen morfolojik değişiklikler hematoksilen eozin, tüm ağız alizarin kırmızı, alsiyan mavi boyaması ve tarayıcı elektron mikroskobu ile incelenmiştir. Flor

uygulamasından sonra dişler çeşitli yoğunluk ve dağılımlarda kırmızı renk boyaması göstermiştir. 19 ve 38 ppm flor uygulanan diş grubunda, tüberküllerden dişin 1/3 alt bölümüne kadar olan bölgede koyu kırmızı renk boyanma gözlenmiştir. 76 ppm flor uygulanan diş grubunda bazı dişler malformasyon göstermiş ve yapısı zayıflamıştır. Sonuç olarak fazla dozda flor uygulaması zebrabalığı larvalarının dişlerinde doza bağımlı florozis oluşturmuştur.

Verstraeten ve ark.nın (2010) yaptığı bir diğer çalışmaya göre, diş gelişimi mezenşim ve epitelin arasındaki etkileşim sonucu olmaktadır ve her ikisi de kapsamlı morfogeneze uğramaktadır. Morfogenezisteki hücre adezyon moleküllerinin önemi uzun zamandır bilinmektedir fakat diş gelişiminde bu moleküllerin fonksiyonu ve dağılımlarıyla ilgili çok az çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmada önemli bir epitelyal kadherin olan E-kadherinin ekspresyon yolağı, zebrabalığında yerine gelen dişlerin yanı sıra ilk gelişen dişlerin de oluşumu sırasında gözlenen protein dağılımı ve mRNA ekspresyonunu belirlemek için immünohistokimyasal boyama yöntemi ve *in situ* hibridizasyon metodu kullanılarak analiz edildi. Diş gelişiminin farklı aşamalarında mine organının her katmanında E-kadherin tespit edildi fakat ilk oluşan dişlerle sonradan oluşan dişlerin sinyalizasyon gücü ve dağılımında hafif farklılıklar ortaya kondu. Bu çalışmaya göre mezenşimden gelişen dental papilde herhangi bir ekspresyon gözlenmemiştir. Dikkat çekecek şekilde, fonksiyonel dişin etrafında E-kadherin farengial bölge boyunca düzensiz dağılım göstermiştir. E-kadherinin kesintisiz ekspresyonu, diş gelişiminin tomurcuk safhasının oluşabilmesi için E-kadherin ekspresyonunun azalmasına ihtiyaç olmadığını göstermiştir. Sonuç olarak dişlerin gelişimi ve yerine gelen dişlerin oluşumunda diğer hücre adezyon sistemlerini anlaşılabilmesi için daha ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

Bir başka çalışmaya göre (Verstraeten ve ark., 2013), N-kadherin dişlerin birçok gelişimsel aşamasıyla ilişkili, sinyalizasyon fonksiyonu olduğu bilinen, birçok çalışmada araştırılmış bir kadherin türüdür. Bu çalışmada zebrabalığı model olarak kullanılarak, N-kadherin dağılımındaki değişikliklerin diş morfogeneze eşlik ettiği ve N-kadherin eksikliğinin diş gelişimini bozduğu hipotezi test edildi. Araştırmanın sonucunda Cdh2 geni tarafından kodlanan N-kadherinin, immünohistokimyasal

alışmalarla hem ilk oluşan hem de yerine gelen dişlerin morfogenez ve başlangıç aşamalarında rol almadığı gösterilmiştir. Ancak çalışmaya göre N-kadherin ekspresyonu, i dental epitelin ve dental papilla hücrelerinin yani sırasıyla ameloblastlar ve odontoblastların farklılaşmaya başlamasıyla artar. Bu araştırmadaki yazarlar, farelerde N-kadherini kodlayan genin yok edilmesiyle erken dönemde lme sebep olunduğu için bu hayvanlarda N-kadherinin odontogenezisteki fonksiyonlarıyla ilgili çalışma yapamadıklarını belirtmişlerdir. Bu sebepten ötürü hayvan modeli olarak zebrabalığı kullanılarak N-kadherini kodlayan genin yok edilmesiyle yapılan bu çalışmaya göre, ilk dişler oluşur fakat gelişimleri erken hücre farklılaşması aşamasında durur. Araştırcılara göre bunun muhtemel sebebi ilk diş farklılaşması olduğunda, N-kadherin uyarımının eksikliğine bağlı olarak oluşan dişlerin gelişiminin engellenmesidir. Sonuç olarak bu çalışmanın verilerine göre, zebrabalığının diş gelişiminde hücre farklılaşması aşamasında N-kadherin ekspresyonunun yanı sıra i mine epitelinde de E ve N-kadherinin ko-ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir.

Kemik morfogenezik protein (BMP) sinyalizasyonunun, başlangıçtan sert doku oluşumuna kadar olan tüm diş gelişimi evrelerinde önemli rol oynadığı bilinmektedir. Yapılan bir çalışmaya göre (Wise ve Stock, 2010), zebrabalığında ve farede diş gelişiminde rolü olduğu düşünülen bmp2b ve bmp4 ligandlarının tamamen elimine edilmesi veya azaltılması için morfolino antisens oligonükleotidleri ve mutant analizleri yapılmıştır. İlginç bir şekilde, bu iki genin fonksiyonunun tek başına veya birlikte elimine edilmesinin olgun dişin oluşmasını engellemediğı grlmştir. Araştırmacılar bu sonucun zebrabalığında ve farede farklılık gösterebilen diğer fonksiyonel BMP ligandlarının fazlalığı nedeniyle oluştuğunu bildirmişlerdir.

Yapılan bir diğer çalışmada (Jackman ve ark. 2004) fibroblast büyüme faktör (FGF) sinyalizasyonunun, zebrabalığındaki farengeal dentisyonun gelişimi sırasındaki rolü araştırılmıştır. Zebrabalığının diş gelişimi ile ilişkili birçok genin ifadesinin, epitelyal ve mezenşimal işaretleyicilerini içerecek şekilde fare

ortologlarıyla benzerlik gösterdiği bulunmuştur. Bu çalışmanın sonuçlarına göre, FGF sinyalleri dental epiteli hedef alır ve tüm bunlar diş morfogenezi için gereklidir.

Bir başka çalışmaya göre (Jackman ve ark., 2010), memelilerde hedgehog sinyalizasyonunun odontogenezisin birçok aşaması için önemli olduğu bilinmektedir ancak diş gelişiminin başlangıcı veya daha sonraki morfogenezde potansiyel rolü tam olarak anlaşılmamıştır. Bu çalışmada zebrabalığının diş gelişimi sırasında, hedgehog ligandı Shha ve Ptc1 ve Ptc2 reseptörlerinin mRNA ekspresyonları da incelenmiştir. Araştırmanın sonucunda, memelilerde olduğu gibi zebrabalığında da sadece Shha ligandının diş gelişimi aşamalarına katılmakta olduğu gösterilmiştir ve hedgehog sinyalizasyonunun odontogenezis sırasında sürekliliğinin gerektiği bildirilmiştir.

Yapılan literatür taramaları sonucunda, periodontoloji alanında zebrabalığı kullanılarak yapılan tek bir çalışma olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışmada (Widziolek ve ark., 2016), zebrabalığı modeli kullanılarak kronik periodontitis etiyolojisinde rol oynayan *Porphyromonas gingivalis* (*P.gingivalis*)'in kardiyovasküler hastalıklar üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Araştırmada zebrabalığı larvasında, yeni bir sistemik enfeksiyon modeli oluşturulmuştur. Sonuçlara göre *P.gingivalis*, zebrabalığı vasküler endoteline hızla yapışarak perikardiyal ödemin ve kardiyak hasarın gelişimine ve bununla ilişkili olarak doza ve zamana bağlı mortalite görülmesine neden olur. Oluşturulan bu *in vivo* modelde, gingipain eksik *P.gingivalis* mutantları kullanılarak, *P.gingivalis*'in eksprese ettiği gingipain proteazlarının sistemik olarak rolü araştırılmıştır. Sonuçlar azalmış zebrabalığı morbiditesi ve mortalitesini ortaya koymuştur. Ek olarak, bir gingipain inhibitörünün *P.gingivalis* kaynaklı sistemik hastalık üzerindeki etkinliğini göstermek için zebrabalığı modeli kullanılmış ve olumlu sonuçlar neticesinde bu inhibitörün kardiyovasküler hastalıkların tedavisinde terapötik olarak kullanımı önerilmiştir. Çalışmadan elde edilen veriler, bir enfeksiyon modelinin endotelinde hücre içi *P.gingivalis*'in ilk gerçek zamanlı *in vivo* kanıtlarını ortaya koymaktadır. Aynı zamanda gingipainlerin sistemik hastalık ile çok önemli bir şekilde bağlantılı olduğu ve kardiyovasküler hastalıklara potansiyel katkıda bulunduğu kanıtlanmıştır.

Zebrabalığı hayatı boyunca sürekli olarak diş üretmekte ve insan diş doku mühendisliği ile genetik çalışmalara yardımcı olabilecek özgün özellikler barındırmaktadır. Zebrabalığında sürekli diş üretiminde etkili olan faktörler araştırmaya açıktır. Zebrabalığında, periodontal patojenler çok yakın zamanda çalışılmaya başlanmış olup (Widziolek ve ark., 2016) bu modelin periodontitis çalışmaları için uygun bir model olabileceğine değinilmiştir. Tüm bu çalışmalar diş gelişimini kısa sürede tamamlayan ve memeli ile benzer gen ve sinyal yollarının diş oluşumu ve patogenezi etkilediği bilinen zebrabalığının kullanılarak, periodontal hastalıklar çerçevesinde daha detaylı araştırmalar yapılması gerektiğini gözler önüne sermektedir.

Planladığımız bu tez çalışmasının amacı, yapılan GWAS çalışmaları sonucunda agresif periodontitisle güçlü ilişkiye sahip olduğu düşünülen, insanda tanımlı GLT6D1 geninin zebrabalığında;

- Gen, mRNA ve protein sekanslarının memeli ile karşılaştırmalı olarak belirlenmesi
- Muhtemel transkript varyantlarının tanımlanması ve zebrabalığı embriyolarında bu genin ifade profilinin ortaya konulmasıdır.

Böylelikle GLT6D1 geninin agresif periodontitis üzerindeki fonksiyonlarının ortaya konması için, genin susturulması (knock-down), genin etkisinin azaltılması (knock-out) veya overeksprese edilmesi gibi genetik metodlar kullanılarak yapılacak daha ileri çalışmalar için temel çalışma tamamlanmış olacaktır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Etik Kurul Onayı

Bilkent Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 27.10.2016 tarihli toplantısında alınan 2016/32 sayılı kararına göre etik açıdan uygun olduğuna karar verilerek yürütülen bu çalışma *in vivo* bir araştırmadır (Ek 1).

2.2. Zebrabalığı ve Embriyolar

Bu çalışmada kullanılan zebrabalığı ve embriyolar, Bilkent Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Zebrabalığı Tesisi'nde yetiştirilip bakıldı. Zebrabalığının AB (wild type) suşları kullanıldı. Embriyolar üreme çiftlerinden elde edilip, E3 besiyerinde büyütüldü. Tüm balık ve embriyolar 28°C de, 14 saat gündüz 10 saat gece döngüsünde tutuldu.

2.3. Biyoenformatik Analizler

Genetik araştırmaların laboratuvar çalışmaları yapılmadan önce, araştırılacak olan genle ilgili bilgiler içeren veri bankalarından yararlanılır. Bu genetik veri bankalarında ön çalışma yapma olanağı da vardır. Bu veri bankalarından en çok kullanılanı farklı türlerden bilgi içeren Ensembl'dir. GLT6D1 geninin filogenetik analizi için Ensembl veri bankası kullanıldı (<http://www.ensembl.org/index.html>). Ayrıca insan GLT6D1 proteini, NCBI Blast veri tabanı kullanılarak (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) zebrabalığı genomunda araştırılarak benzerlik oranı ve zebrabalığındaki tahmini konumu belirlendi. GLT6D1 geninin zebrabalığındaki ortoloğu olabilecek genlerin ifade seviyeleri ise Expression Atlas veri tabanı kullanılarak analiz edildi (<http://www.ebi.ac.uk/gxa>).

2.4. Zebrabalığında GLT6D1 Geninin Olası Ortologlarının İfade Analizi

2.4.1. RNA Ekstraksiyonu ve cDNA Eldesi

İki, 3, 4, 5, 6 günlük embriyolar toplanarak gruplar oluşturuldu. Her bir gün için 5'er grup embriyo toplandı. Bu gruplar 3 adet n=30, 2 adet n=20 olacak şekildedir. Her gün için ayrı olacak şekilde 20-30 arasında embriyo kullanılarak total RNA izolasyonu yapıldı (74104, RNeasy Mini Kit, Qiagen, Valencia, CA). İlk deneyde, total RNA eldesi tüm gruplar için genomik DNA uzaklaştırması yapılmadan elde edildi. İkinci deneyde tüm gruplar için genomik DNA uzaklaştırması yapılarak total RNA eldesi yapıldı (12185010, PureLink™ DNase Set, Invitrogen, USA). Her iki yöntemin kullanılmasının sebebi, DNA çıkartımı yapılmasına ilişkin literatür bilgilerini destekleme amaçlıdır. Literatüre göre DNA çıkartımı yaparak RNA izolasyonu yapılması; RT-qPCR analizlerinde RNA preparatlarını kirleten genomik DNA'nın da çoğaltılıp yanlış pozitif yanıtlara yol açabilmesinden kaynaklanan hatalı sonuçları önlediğinden tercih edilmektedir. PCR'ın aşırı duyarlılığı nedeniyle, genomik dizinin tek bir kopyası bile cihaz tarafından tespit edilebilir. Bu durum, test edilen genler DNA seviyesinde mRNA'ya benzer sekanslara sahip psödogenler barındırdığında daha da kötüleşir. Bu nedenle RNA elde edilirken DNA çıkartımı yapılması önerilir. DNA çıkartımıyla ekstrakte edilen RNA'dan elde edilen cDNA'nın, RT-qPCR'da ortaya koyduğu eşik döngülerinde bir azalma vardır ve sonuçlar genomik DNA kontaminasyonu içermediği için daha güvenilirdir (Dotti ve Bonin, 2011).

Elde edilen total RNA'nın 500 nanogramı (ng) kullanılarak oligoDT yöntemiyle cDNA sentezlendi (K1622, RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit, Fermentas Thermo Fisher Scientific, Hudson, NH, USA).

2.4.2. Gerçek Zamanlı PCR ile Embriyolardaki İfade Profilinin Belirlenmesi

Gerçek Zamanlı PCR (RT-qPCR) deneyinde kullanılmak üzere Gbgt1l3, Gbgt1l1, Gbgt1l4, Actb2, Elfa, Fabp10a genleri için primerler tasarlandı (Çizelge 2.1). Tüm RT-qPCR deneyleri, LightCycler 480 (Roche Diagnostics, Penzberg, Germany) sistemi ve syber green master miksi (4707516001, FastStart SYBR Green Master 5ml, Roche) kullanılarak yapıldı. Numunelerden elde edilen cDNA'lar 1:10 oranında seyreltildi ve 1 mikrolitre (μ l) olarak kullanıldı. RT-qPCR deneyinin her örneği; 5 μ l SYBR green master miks, 2 μ l RNA içermeyen su, ilgili genin 1 μ l reverse primeri, 1 μ l forward primeri ve 1 μ l cDNA olmak üzere toplam 10 μ l hacimlik reaksiyonlar olacak şekilde hazırlandı. Böylece cDNA'lar Ensembl kullanılarak elde edilen primer çiftleriyle RT-qPCR ile amplifiye edildi. Her reaksiyon aynı plakada iki teknik replika olacak şekilde yapıldı. RT-qPCR koşulları 95°C'de 10 dakika boyunca denatürasyon, ardından 95°C'de 10 s, 60°C'de 30 s, 72°C'de 20 s 50 döngülük amplifikasyon tamamlanacak şekilde gerçekleştirildi. PCR amplifikasyonundan hemen sonra 95°C'de 5 s, 55°C'de 60 s ve 55°C ile 95°C arasında 0.11°C/s sıcaklık geçiş hızı ile erime eğrileri oluşturuldu. Ct (Threshold cycle) ve TM (Temperature of melting) değerleri ikinci türev metoduyla, LCS480 yazılımı (Roche, Almanya) kullanılarak elde edildi. RT-qPCR işlemi sonucunda elde edilen Ct değeri, PCR ürünlerinin miktarındaki ilk önemli artışı ifade eder. Her bir örneğe ait ilgili genin Ct değeri, o örneğin referans geninin Ct değerinden çıkartılarak delta Ct (Δ Ct) değerleri hesaplandı. Bu değerler Excel programına girildi ve $2^{(-\Delta$ CT) metoduyla analizleri yapıldı. Böylece her bir örnek için (2, 3, 4, 5, 6 günlük embriyoların örnekleri) ilgili genlerin referans genlere göre göreceli ifadesi hesaplandı. $2^{(-\Delta$ CT) metodundan elde edilen verilere göre Graphpad Prism 7 yazılım programı (GraphPad Software, California, USA) kullanılarak grafikler çizildi.

Çizelge 2.1. Gbgt1l3, Gbgt1l1, Gbgt1l4, Actb2, Elfa, Fabp10a genleri için tasarlanan forward ve reverse primerler (Actb2, Elfa, Fabp10a genlerinin primerleri Dr. Ender Avcı tarafından tasarlanmıştır)

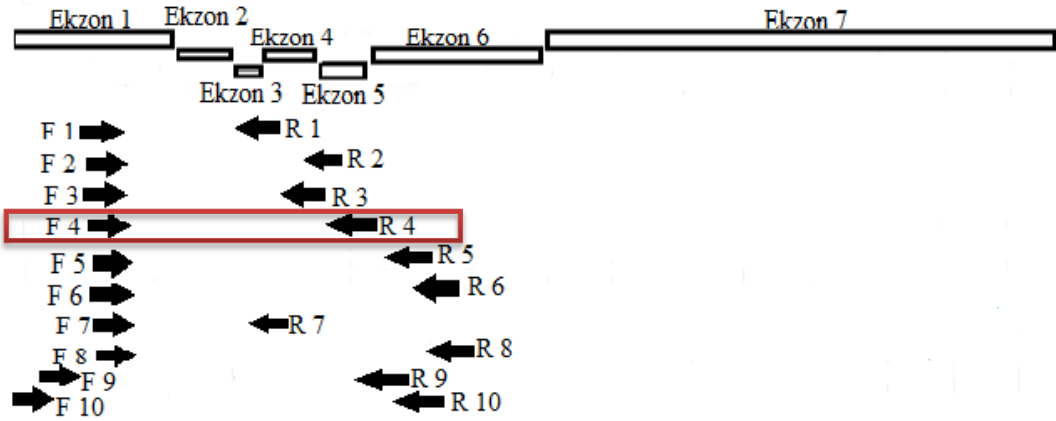
Gen	Primer	Sekans
Gbgt1l3	F	5'-TGGCAAAGTTGGTCCTCTGG-3'
	R	5'-CCTGCTCTGGATGATCGGTG-3'
Gbgt1l1	F	5'-TTCTTCTTGGGGTGACTGCT-3'
	R	5'-AGTCAAAGGTTCCCGTCCAA-3'
Gbgt1l4	F	5'-ACTACAGTCTTCGCTCTTGGA-3'
	R	5'-TCACCGTCAACTGATGTCCT-3'
Actb2	F	5'-GCCTGACGGACAGGTCAT-3'
	R	5'-ACCGCAAGATTCCATACCC-3'
Elfa	F	5'-CCCTGGACACAGAGACTTCSA-3'
	R	5'-CAGCCTCAAACCTACCAACA-3'
Fabp10a	F	5'-AGAAAGCATGGCCTTCAGC-3'
	R	5'-TGGTGAAACGCTTCAGATCTTC-3'

2.5. Paralog Gbgt1l3 Geninin Alternatif Kırpılma Analizi

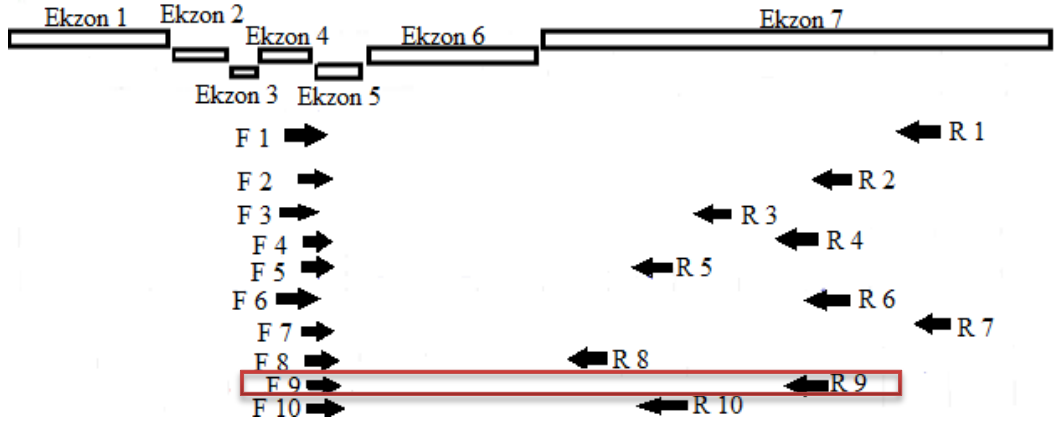
Buradaki amaç insandaki GLT6D1 geninin zebrabalığındaki muhtemel ortoloğunun (Gbgt1l3), insanda olduğu gibi birden fazla transkripti olup olmadığını ortaya çıkarmaktır. Gbgt1l3 daha önce karakterize edilmediği için Ensembl (ENSDARG00000035555) veri tabanından elde edilen gen sekansı, bu deneylerde kullanılacak primerleri tasarlamak için kullanıldı.

Gbgt1l3 geninin alternatif kırpılma analizinin yapılması için ekzon 1-5 ve ekzon 4-7 bölgeleri için ayrı primerler dizayn edildi (Çizelge 2.2). Şekil 2.1'deki ekzon 1-5 bölgesi için 4. primer çifti tasarlandı. Ekzon 4-7 bölgesi için Şekil 2.2'deki primerlerden 9. primer çifti tasarlandı. Bu primerleri test etmek ve optimum bağlanma sıcaklığını belirlemek için 6 günlük zebrabalığı embriyo örneklerinden cDNA elde edildi. Olası genomik DNA kontaminasyonu ihtimalini elimine etmek

için, cDNA sentezi sırasında reverse transkriptaz içermeyen (–RT) negatif kontrol örnekleri de deneye dahil edildi. Bu primerler ve elde edilen cDNA’ler kullanılarak gradient PCR yapıldı. PCR ürünleri %1.5’luk agaroz jelde yürütüldü. Deney sonucunda primerlerin sorunsuz bir şekilde çalıştığı ortaya kondu ve optimum bağlanma sıcaklığı 60°C olarak belirlendi. Daha sonra araştırmada kullanılan 2, 3, 4, 5, 6 günlük embriyo örneklerinin tümünden cDNA elde edildi ve farklı ekzon bölgelerine özel tasarlanan bu primerler ile 60°C’de PCR yapıldı. Elde edilen PCR ürünleri %1.5’luk agaroz jelde yürütüldü. Böylece Gbgt1l3 geninin alternatif kırılma analizi yapıldı. %1.5’luk agaroz jel, 100 ml 10X TAE’ye 1.5 gr agarose reducta (085501PR, Prona) eklenerek hazırlandı. Bu karışım agaroz çözülünceye kadar mikrodalga fırında kaynatıldı. Agaroz tamamen çözündükten sonra solüsyonun biraz soğuması beklendi ve 5 µl Etidyum Bromür (EtBr) eklendi. Agaroz jelin donması için yarım saat bekledikten sonra örnekler kuyucuklara yüklendi. Elektroforez 90V’ta 40 dakika olacak şekilde uygulandı. Elektroforez işleminin ardından UV ışık altında görüntüleme sistemi ile bantların değerlendirilmesi yapıldı.



Şekil 2.1. Ekzon 1-5 bölgesi için primer tasarımı



Şekil 2.2. Ekzon 4-7 bölgesi için primer tasarımı

Çizelge 2.2. Ekzon 1-5 ve ekzon 4-7 bölgeleri için tasarlanan primerler

Ekzon Bölgesi	Primer	Sekans
Ekzon 1-5	F	5'-AAGCAAGGATAACAGGTGGAAT-3'
	R	5'-GCCCAATACTACTGGGCTGAT-3'
Ekzon 4-7	F	5'-AGTCGCCTCAAGGGCTTAAATA-3'
	R	5'-TCCAGCCTTTTCATCCTGCC- 3'

2.6. İstatistiksel Analizler

İlgili genin her bir örneğe ait Ct değeri, o örneğin referans geninin Ct değerinden çıkartılarak delta Ct (ΔCt) değerleri hesaplandı. Bu değerler Excel programına girildi ve $2^{(-\Delta Ct)}$ metoduyla (Livak ve Schmittgen, 2001) analizleri yapıldı. Böylece her bir örnek için ilgili genlerin referans genlere göre göreceli ifadesi hesaplandı. $2^{(-\Delta Ct)}$ metodundan elde edilen verilere göre Graphpad Prism 7 yazılım programı (GraphPad Software, California, USA) kullanılarak barplot çizimleri yapıldı. Korelasyon analizleri ise Excel'de yapıldı ve Mathpad yazılım programı (MathPad Software, California, USA) kullanılarak dotplot çizimleri tamamlandı.

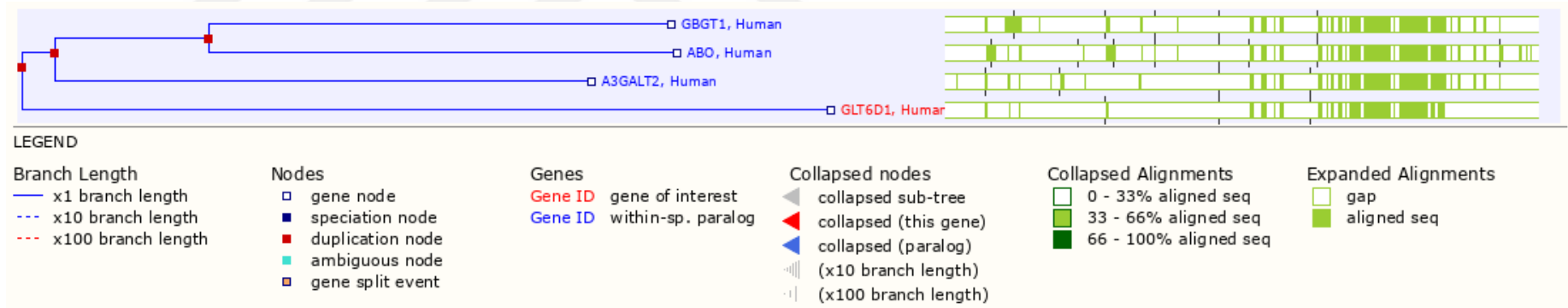
3. BULGULAR

3.1. GLT6D1 Geninin Biyoenformatik Analizi

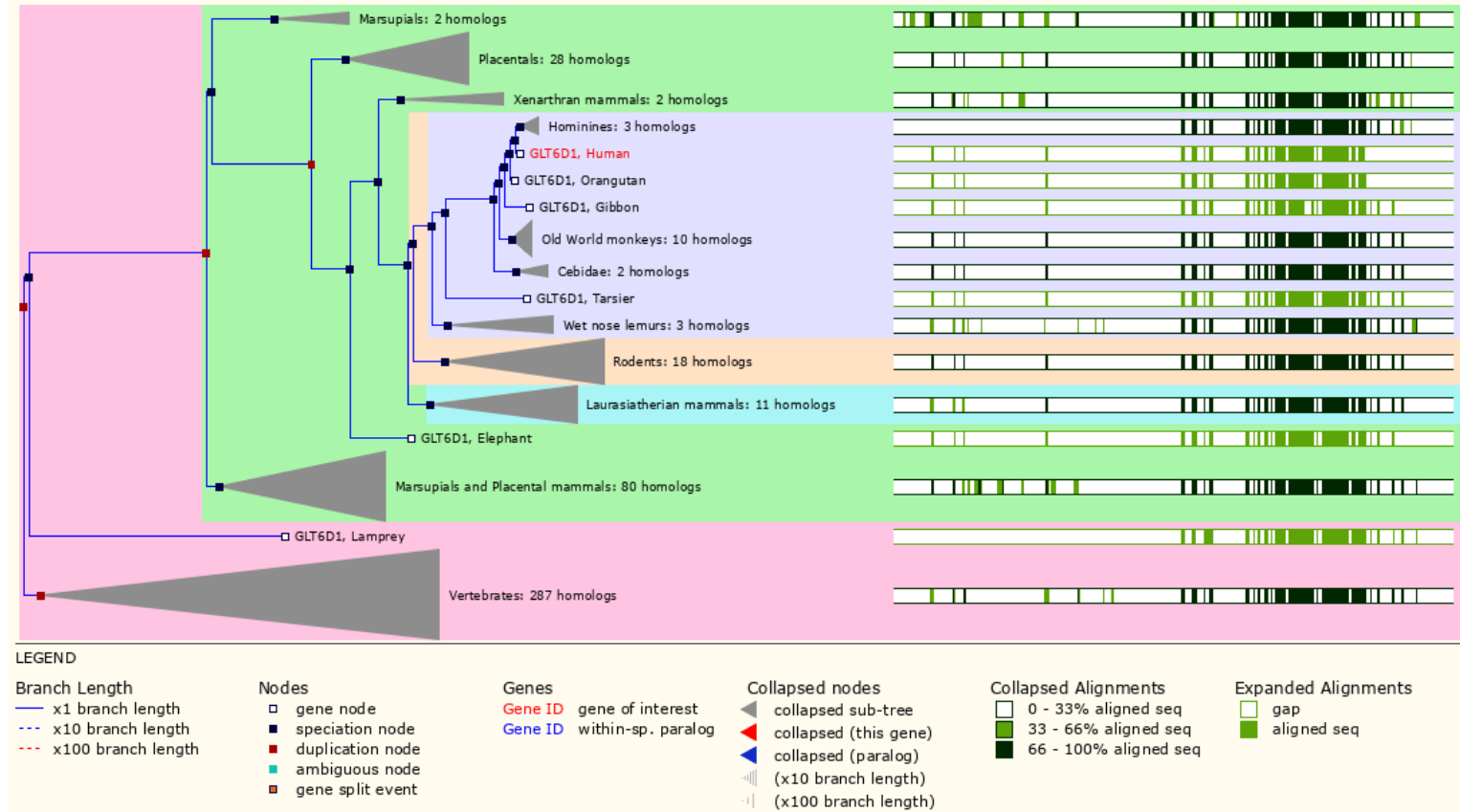
Ensembl’da yapılan araştırmalara göre GLT6D1 geninin insanda ABO, GBGT1, A3GALT2 olmak üzere 3 tane paraloğu bulunmaktadır (şekil 3.1). Bu genlerin homoloji değerlerine bakıldığında GLT6D1 geniyle ABO geni arasında %23.86, A3GALT2 geni ile arasında %27.65, GBGT1 geni ile arasında ise %27.09 oranında benzerlik vardır. Ayrıca bu genin 2 tane transkript varyantı vardır. Bu transkript varyantlarından bir tanesi olan ENST00000371763.5 transkript ID’li GLT6D1-201; 276 amino asitten ve 1526 baz çiftinden meydana gelir. Diğer transkript varyantı olan ENST00000613244.1 ID’li GLT6D1-202 ise 307 amino asitten ve 1523 baz çiftinden oluşur. GLT6D1-202 transkript varyantında, GLT6D1-201 transkript varyantından farklı olarak 6. ekzon eksiktir. (http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?db=core;g=ENSG00000204007;r=9:135623656-135639540). Gerçekleştirdiğimiz deneyin  n çalışmalarında, omurgalılarda GLT6D1 geninin filogenetiği Ensembl veri tabanında araştırıldı (şekil 3.2). Ensembl filogenetik analizine göre GLT6D1 geni primatlarda (şempanze-insan arasında %81,98 benzerlik, orangutan-insan arasında %96,75 benzerlik) yüksek ölçüde korunmaktadır. GLT6D1 geninin ortoloğu fare (insanla %55,63 benzerlik), rat (insanla %55,31 benzerlik), inek (insanla %56,56 benzerlik), domuz (insanla %57,28 benzerlik), köpek (%58.44 benzerlik) gibi birçok türde de bulunmaktadır. Bu karşılaştırmalarda kullanılan aminoasit dizileri Ensembl veri tabanından elde edildi (release 92). Bu genin tanımlanmış 56 tane ortoloğu vardır. Ensembl’da zebrabalığı için GLT6D1 geninin ortoloğu henüz tanımlanmamıştır. Bu yüzden bu genin paraloglarının ortologları hedef genler olarak belirlendi. GLT6D1 geninin 3 tane paraloğu arasından GBGT1 geni tanımlanması hedeflenen gen olarak belirlendi. Bunun sebebi GBGT1 paraloğunun GLT6D1 genine benzerlik oranının ABO paraloğuna göre yüksek olması (<http://www.ensembl.org/index.html>), Expression Atlas veri tabanında (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) yapılan araştırmaya göre ise zebrabalığındaki ifade değerlerinin homoloji değerleri yakın olan A3GALT2

paraloğuna göre daha uyumlu olmasıdır. Paralog GBGT1 geninin 4 tane alt grubu vardır. Bu genler Gbgt1l4 (genID ENSDARG00000068503), Gbgt1l3 (genID ENSDARG00000035555), Gbgt1l2 (genID ENSDAEG00000092718), Gbgt1l1 (genID ENSDARG00000025275) gibi zebrabalığı genleridir. Ayrıca insan GLT6D1 proteini, NCBI Blast veri tabanı kullanılarak zebrabalığı genomunda araştırılarak tahmini konumu belirlendi (Şekil 3.3). Buna göre zebrabalığında olası bir GLT6D1 geni 5. kromozomda bulunmakta olup, bu bölge insan ile %33-%37 oranında benzerlik göstermektedir. Bu bölgede lokalize olan genler ile homoloji analizi ile elde ettiğimiz genler uyumaktadır. Bu da homoloji analiziyle belirlediğimiz genlerin güvenilirliğini göstermektedir.

Expression Atlas veri tabanı kullanılarak (<http://www.ebi.ac.uk/gxa>), insandaki GLT6D1 geninin zebrabalığındaki ortoloğu olabilecek Gbgt1l1, Gbgt1l2, Gbgt1l3, Gbgt1l4 genlerinin ifade seviyeleri analiz edilmiştir (Şekil 3.4). Bu veri tabanında, zebrabalığı embriolarında ilgili genlerin ifade profilini araştıran fakat yayını henüz yapılmamış tek bir çalışma vardı. Bu çalışmanın verilerine göre, 0 saat ile 5 gün arasında farklı 18 gelişimsel dönemden 5'er grup olmak üzere 360 embriyo kullanılarak RNA-Seq yapılmış ve genlerin ortalama ifade miktarları rapor edilmiştir. Şekil 3.4'teki *in silico* bulguları değerlendirerek; zebrabalığında dış gelişim dönemi olan 2. ve 3. günlerde ifade seviyesi daha yüksek olan Gbgt1l3 genini, tanımlanması hedeflenen gen olarak belirledik. Şekil 3.4'teki renk skalasında koyu mavi daha yüksek ekspresyon seviyesini ifade ederken, açık mavi daha düşük ekspresyon seviyesini ifade etmektedir.



Şekil 3.1. GLT6D1 geninin insandaki paralogları
http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Compara_Tree?db=core;g=ENSG00000204007;r=9:135623656-135639540



Şekil 3.2. GLT6D1 geninin filogenetik analizi

(http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Compara_Ortholog?collapse=4509899;db=core;g=ENSG00000204007;r=9:135623656-135639540)

```

> GENSCAN00000011927 cdna chromosome:GRCz10:5:23345981:23351761:-1
transcript_biotype:protein_coding
Length=870

Score = 134 bits (431), Expect = 8e-42, Method: Compositional matrix adjust.
Identities = 83/228 (36%), Positives = 131/228 (57%), Gaps = 3/228 (1%)
Frame = +1

Query  51  WLAPVLWEGTFDRRVLEKHYRRRNITVGLAVFATGRFAEEYLRPFLHSANKHFM TGYRVI 110
        WLAP++ EG+FD  +++  Y+++NITV  +FA G++  +L+ FL SA +HF  G+RV
Sbjct  73  WLAPIVSEG SFDP T LIDAIYKQQNITVATTIFALGKYTV-FLKDFLES AEQHFFVGFRVH 249

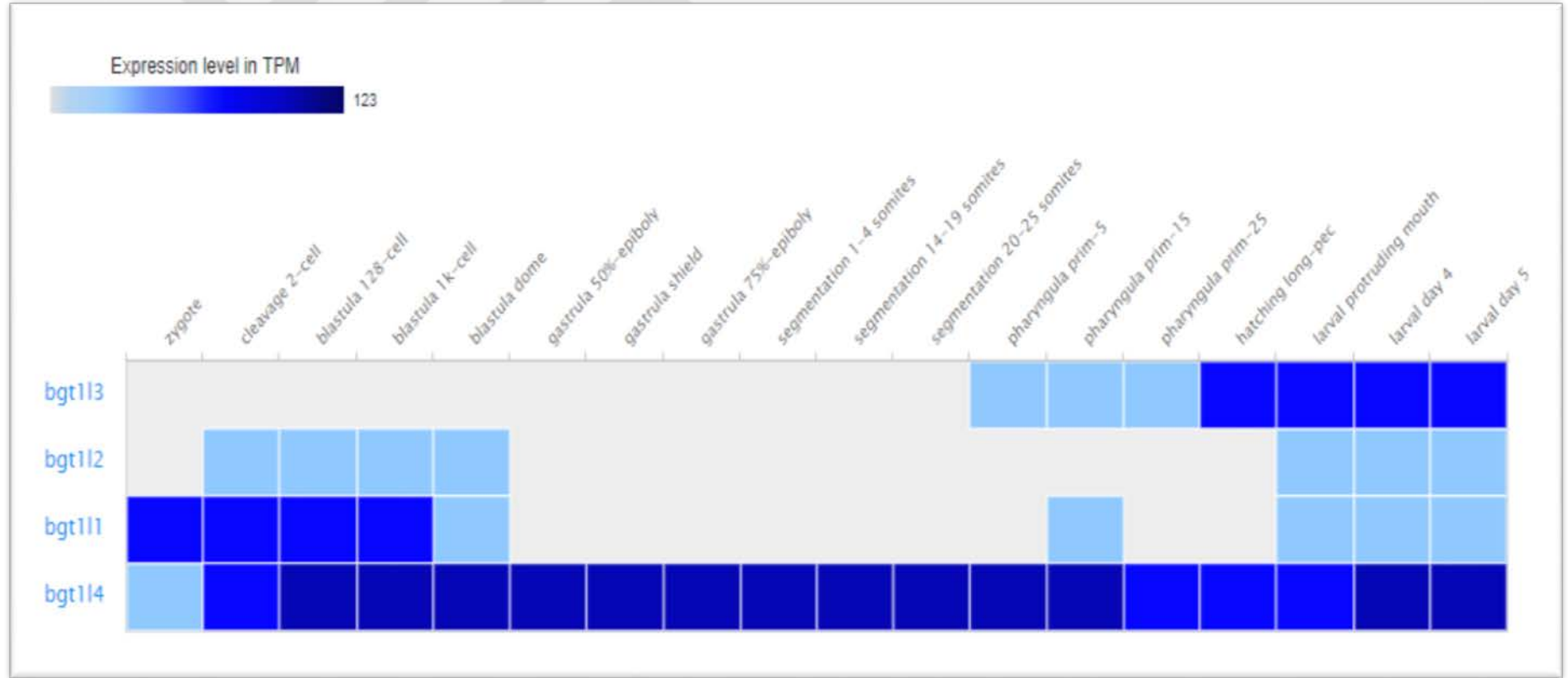
Query  111 FYIMVDAFFKLPDIEPSPLRTFKAFKVGTERWWLDGPLVHVKSLGEHIA SHIQDEVD FLF 170
        +Y+ D  ++PD++          V +  W D L  +K L  I S + ++ D+LF
Sbjct  250 YYVFTDHPEQVPDVKLGEHELTVM TVNSSSRWQDMSLGRMKRLEMLIESGLVNDADYLF 429

Query  171 SMAANQVFQNEFGVETLGPLVAQLHAWWYFRNTKNFPYERRPTS AACIPFGQGDFYYGNL 230
        S+  + F  +G ETLG L+ +HAW+Y+  + FPYERRP S A IP+ +GD+YYG
Sbjct  430 SLDVDTKFYGRWGAETLGLIGVIHAWYYYTFREQFPYERRPESQAFIPYSEG DYYYGGGA 609

Query  231 MVGGTIPHNILDFIKEYLNGVIHDIKGNLNSTY--EKHLNKYFYLNKPT 276
        ++GG+  +  K  + D  + + + E HLNKYF NKP+
Sbjct  610 VLGGSVKCVYQLAKTCREQLDIDA AKSIEAAWQEESH LNKYFLYNKPS 753

```

Şekil 3.3. GLT6D1 geninin insan protein sekansının zebra balığı genomuyla eşleştirilmesi (%36 benzer sekans) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)

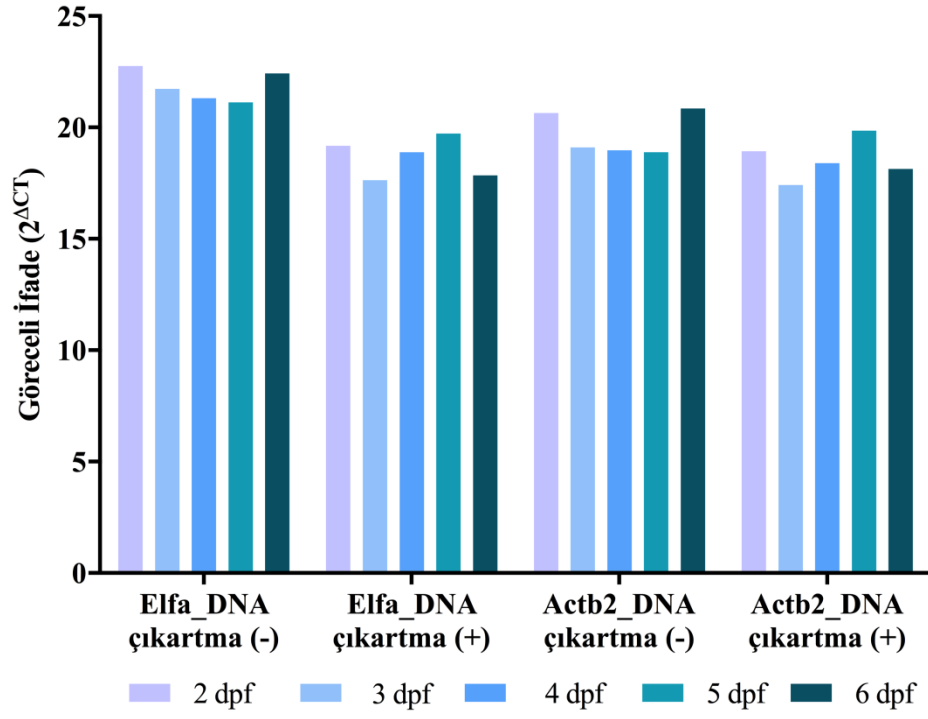


Şekil 3.4. GLT6D1'in zebrafalığındaki olası ortolog genlerinin ifade profilleri (<http://www.ebi.ac.uk/gxa/experiments/E-ERAD-475>)

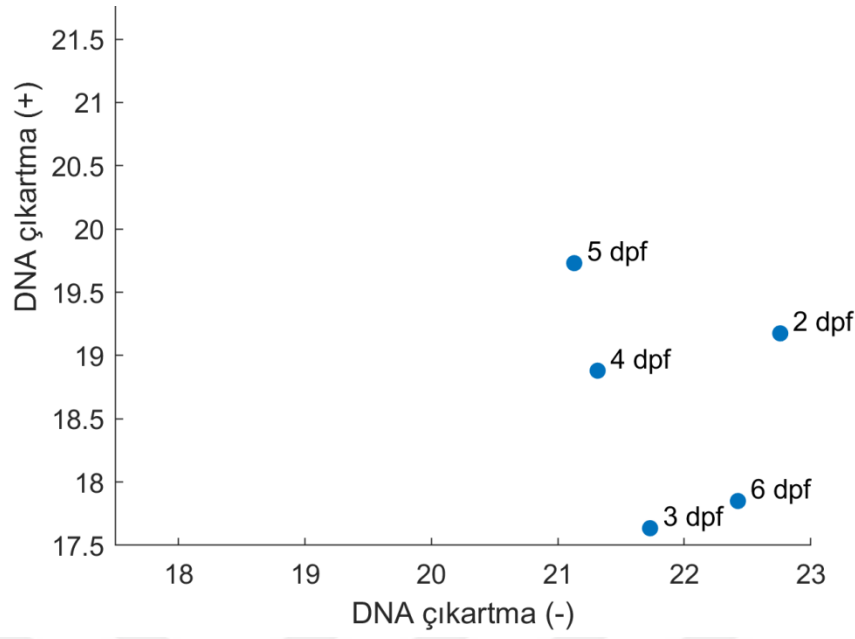
3.2. RT-qPCR ile İlgili Genlerin Embriyolardaki İfade Profillerinin Belirlenmesi

3.2.1. Referans Genlerin (Actb2 ve Elfa Genleri) DNA Uzaklaştırması Yapılarak ve Yapılmadan Elde Edilen Embriyo Örneklerinde Ortaya Koydukları İfade Profiline Belirlenmesi

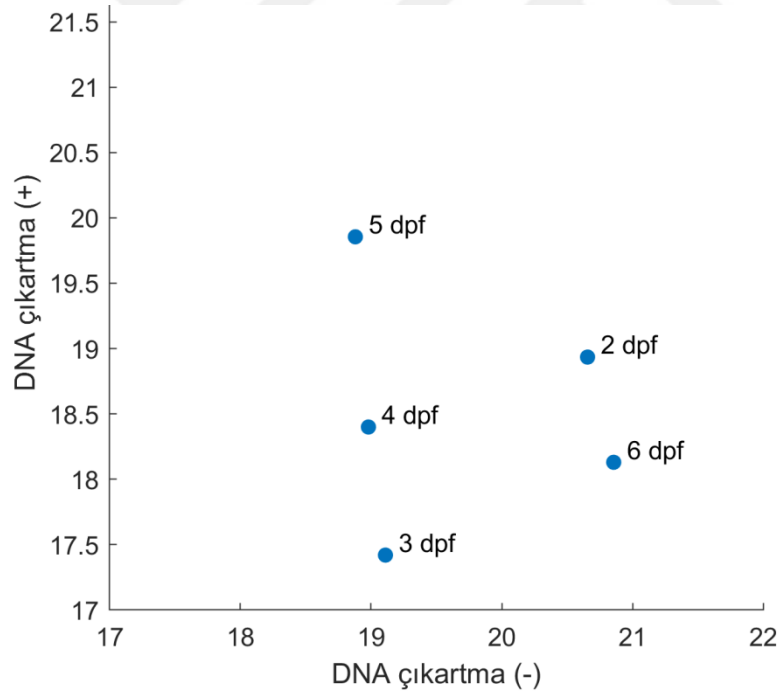
DNA çıkartılması yapılmadan elde edilen 2, 3, 4, 5, 6 günlük embriyoların RNA örnekleri kullanılarak uygulanan RT-qPCR amplifikasyonunun sonuçlarına göre 4. günde genin ifadesinde azalma görülürken, DNA çıkartılması yapılan örneklerin kullanıldığı deneyde 5. günde de azalma devam etmektedir. Bu durumun DNA çıkartma işleminden kaynaklı olup olmadığını anlamak için referans genlerle (Actb2 ve Elfa genleri) DNA çıkartma işlemi yapılarak ve yapılmadan elde edilen örnekler kullanılarak kontrol amaçlı RT-qPCR yapıldı. DNA uzaklaştırması yapılarak ve yapılmadan elde edilen 2, 3, 4, 5, 6 günlük embriyo örneklerinin sonuçlarında referans genlerin göreceli ifadelerinin seviyesinde bariz bir fark olmadığı tespit edildi (Şekil 3.5). Fakat Actb2 ve Elfa genlerinin DNA çıkartımı yapılan ve yapılmayan örneklerde ortaya koyduğu ifade profilleriyle korelasyon analizi yapıldığında Actb2 geni DNA çıkartımından etkilenmezken Elfa geninin etkilendiği tespit edildi (Şekil 3.6). Bu da DNA çıkartımının Elfa geni gibi bazı genlerin ifadesini değiştirebildiğini göstermektedir. Eğer her iki gen ile yapılan normalizasyonda DNA çıkartımı yapılan ve yapılmayan örnekler birebir uyumlu olsaydı DNA kontaminasyonu olmadığı düşünülebilirdi. Ancak korelasyon analizine göre DNA çıkartımının Elfa geninin ifade değerlerinde değişiklik yaratmasından dolayı DNA çıkartımı uygulamasının deney sonuçlarında önemli bir etkisi olduğu düşünüldü. Bu sebepten DNA uzaklaştırması yapılan örneklerde uygulanan RT-qPCR, genomik DNA kaynaklı amplifikasyonları engelleyerek sonuçları daha güvenilir yaptığından diğer deneylere bu metodla devam edildi.



Şekil 3.5. Elfa ve Actb2 referans genlerinin DNA uzaklaştırması yapılarak ve yapılmadan elde edilen örneklerde ortaya koydukları ifade profilleri. 2 dpf: 2 günlük embriyo, 3 dpf: 3 günlük embriyo, 4 dpf: 4 günlük embriyo, 5 dpf: 5 günlük embriyo, 6 dpf: 6 günlük embriyo (dpf: fertilizasyondan sonra gün)



(a) Actb2 geni

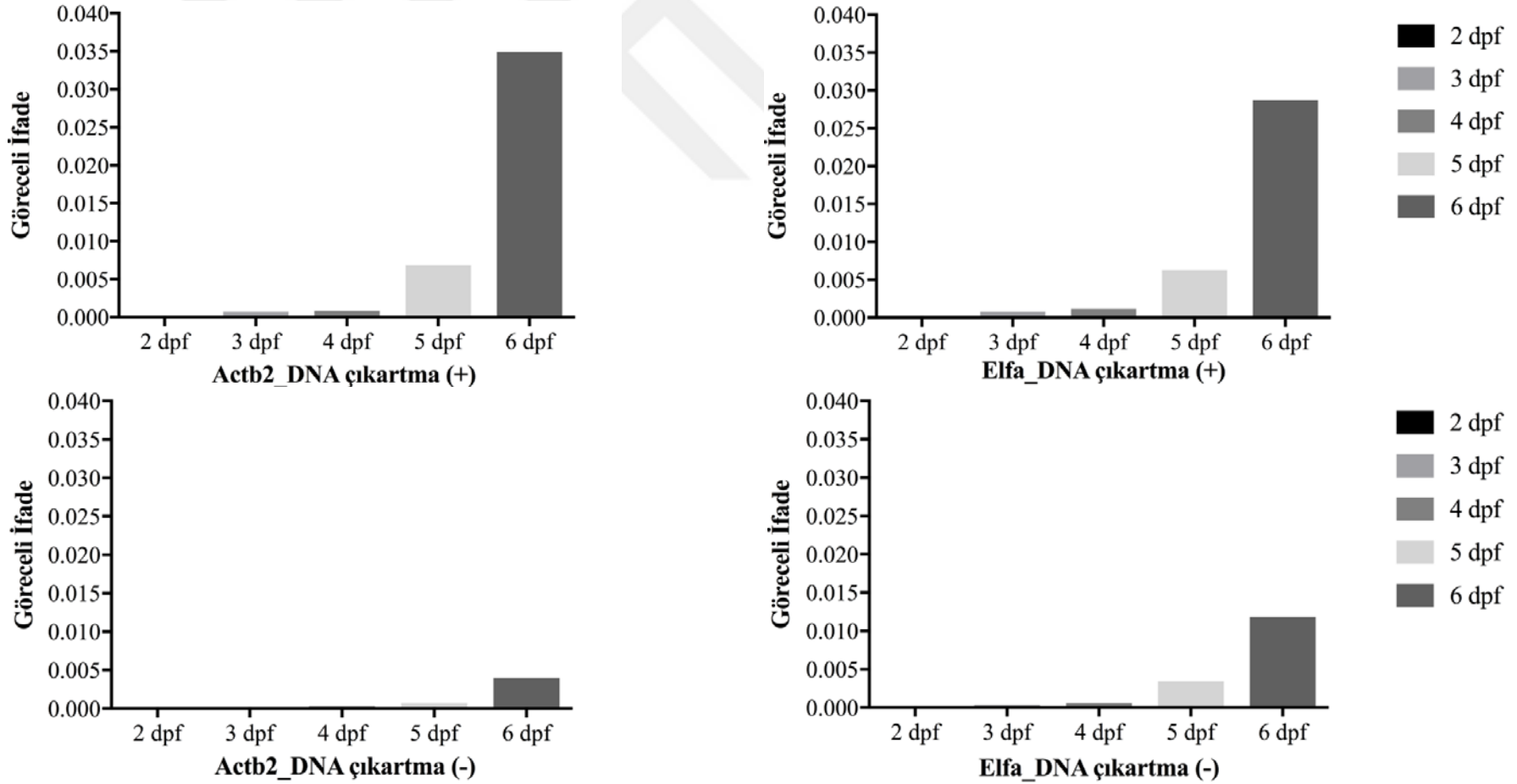


(b) Elfa geni

Şekil 3.6. (a) Actb2 geninin 2, 3, 4, 5, 6 günlük embriyolardan DNA çıkartma yapılarak ve yapılmadan elde edilen örneklerde ortaya koyduğu ifade değerlerinin korelasyon analizi ile karşılaştırılması **(b)** Elfa geninin 2, 3, 4, 5, 6 günlük embriyolardan DNA çıkartma yapılarak ve yapılmadan elde edilen örneklerde ortaya koyduğu ifade değerlerinin korelasyon analizi karşılaştırılması. 2 dpf: 2 günlük embriyo, 3 dpf: 3 günlük embriyo, 4 dpf: 4 günlük embriyo, 5 dpf: 5 günlük embriyo, 6 dpf: 6 günlük embriyo (dpf: fertilizasyondan sonra gün)

3.2.2. Fabp10a Geninin DNA Uzaklaştırılarak ve Uzaklaştırılmadan Elde Edilen Embriyo Örneklerinde Ortaya Koyduğu Göreceli İfadesi

Fabp10a geni karaciğer gelişimine özgü bir gen olup fertilizasyondan sonra 5. günde önemli derecede artışı beklenmektedir (Venkatachalam ve ark., 2009). Daha önce Dr. Ender Avcı tarafından dizayn edilen primerler kullanılarak Fabp10a geninin hem DNA çıkartımı yapılan hem de yapılmayan örneklerden elde edilen RT-qPCR sonuçları Elfa ve Actb2 referans genleriyle normalize edildi ve 2, 3, 4, 5, 6 günlük embriyolarda bu genin ortaya koyduğu ifade profilleri değerlendirildi (Şekil 3.7). DNA çıkartımı uygulanan örneklerde hem Elfa hem de Actb2 referans geniyle yapılan göreceli ifade karşılaştırması sonucunda, Fabp10a geninin her geçen gün ifadesinin arttığı ve 6. günde maksimum seviyeye ulaştığı görülmektedir. DNA çıkartımı uygulanmayan örneklerde ise bu genin ifadesinin DNA çıkarılardan daha az olduğu tespit edildi. Bu sayede DNA çıkarımının PCR verimliliğini arttırdığı ve inhibisyonu engellediği söylenebilir.



Şekil 3.7. Fabp10a geninin DNA çıkartma yapılarak ve yapılmadan elde edilen örneklerde ortaya koyduğu ifade profilinin Actb2 ve Elfa referans genleriyle normalizasyonu. 2 dpf: 2 günlük embriyo, 3 dpf: 3 günlük embriyo, 4 dpf: 4 günlük embriyo, 5 dpf: 5 günlük embriyo, 6 dpf: 6 günlük embriyo, dpf: fertilizasyondan sonra gün (Biyolojik örnek sayısı her bir grup için 1 olup, RNA 20-30 adet embriyodan çıkarılmıştır)

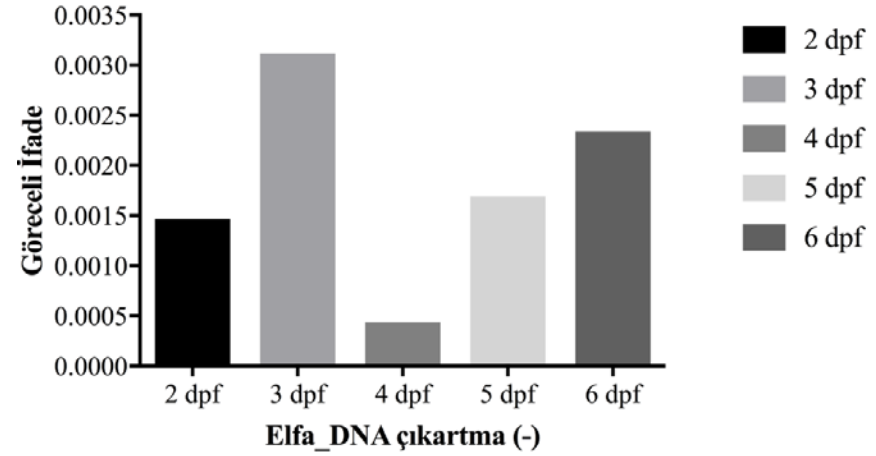
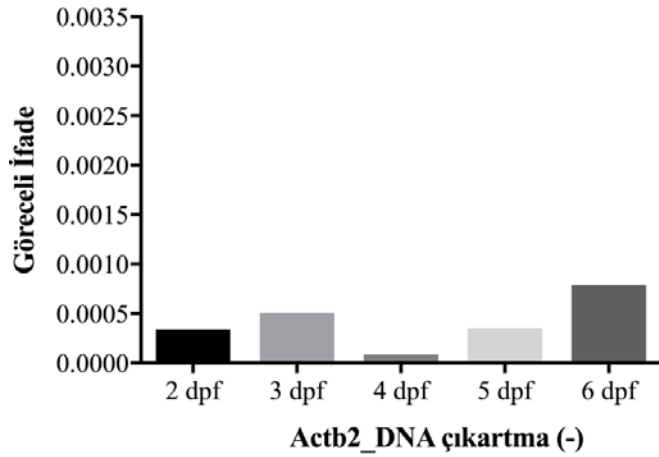
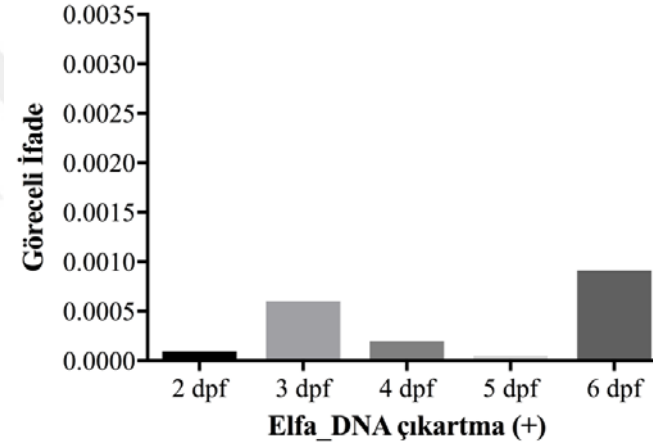
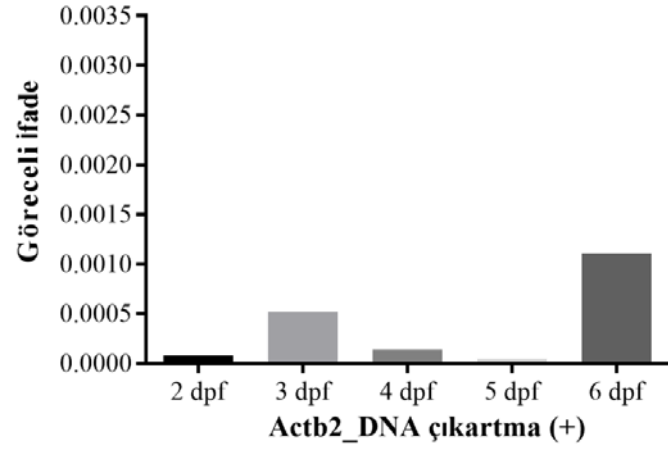
3.2.3. Paralog Gbgt113 Geninin DNA Uzaklaştırılarak ve Uzaklaştırılmadan Elde Edilen Embriyo Örneklerinde Ortaya Koyduğu Göreceli İfadesi

Hem Actb2 hem de Elfa referans genleriyle karşılaştırma yapıldığından, DNA çıkartması uygulanarak elde edilen örneklerin Gbgt113 geni için ortaya koyduğu RT-qPCR amplifikasyonunun sonuçları birbiriyle uyumludur (Şekil 3.8). Bu sonuçlara göre 3. ve 6. günlerde Gbgt113 geninin ifadesi artmakta, 6. günde ise maksimum seviyeye ulaşmaktadır. İki, 4, 5 günlük embriyolarda genin ifadesi diğer günlere göre daha azdır. Actb2 referans geniyle normalizasyon sonucunda DNA çıkartımı uygulanmayan örneklerden elde edilen deney sonuçları DNA çıkartımı yapılarak elde edilen örneklerin deney sonuçlarından 2. ve 5. günlerde genin ifadesinde artış görülmesiyle farklılık göstermektedir. Elfa referans geni kullanılarak DNA çıkartması uygulanmayan örneklerle yapılan RT-qPCR amplifikasyonunun sonuçları karşılaştırıldığında, genin maksimum ifade profili ciddi bir artışla 3. günde ortaya çıkmaktadır. İki, 4, 5, 6 günlük embriyoların hepsinde genin ifade olduğu görülmektedir. Gbgt113 geninin Actb2 geniyle normalize edilerek DNA çıkartımı yapılan ve yapılmayan 2, 3, 4, 5, 6 günlük embriyo örneklerinin ifade değerlerinin korelasyon analizine bakıldığında (Şekil 3.9) düze yakın bir çizgi elde edilirken, Gbgt113 geninin Elfa geni ile normalizasyonu sonucu elde edilen korelasyon analizi sonucunda tutarsızlık olduğu tespit edildi. Gbgt113 geninin Elfa referans geniyle normalize edilerek DNA çıkartımı yapılan ve yapılmayan örneklerde ortaya koyduğu göreceli ifade sonuçlarının korelasyon analizine göre, DNA çıkartımı uygulanmamasının Gbgt113 geninin ifade profilinde değişiklik yarattığı görüldü. DNA çıkartımı Actb2 geniyle yapılan normalizasyonda çok etkili değilken, Elfa geniyle yapılan normalizasyonda etkilidir. Bundan dolayı DNA çıkartması uygulanan örneklerin bazı genlerin ifadesinde değişiklik meydana getirmesinden dolayı DNA çıkartılarak elde edilen örneklerin deney sonuçlarının daha stabil olduğu desteklenmiş oldu.

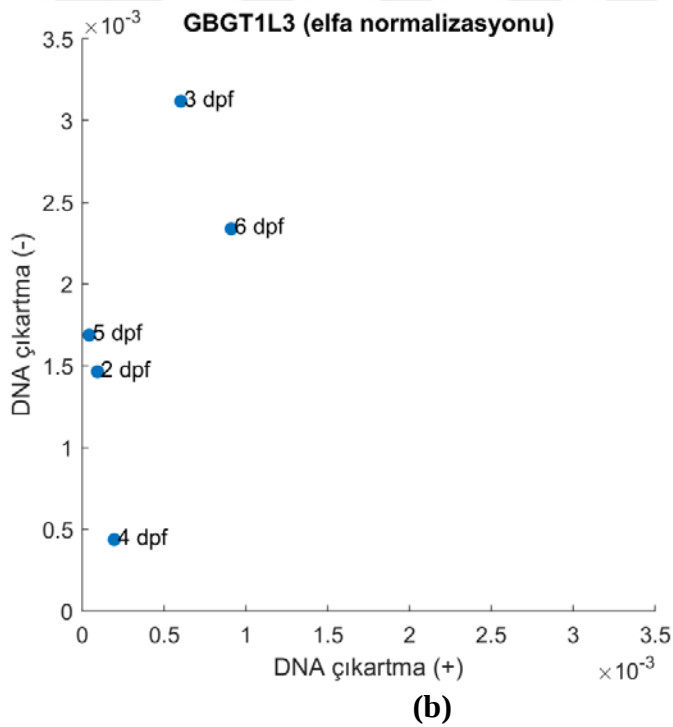
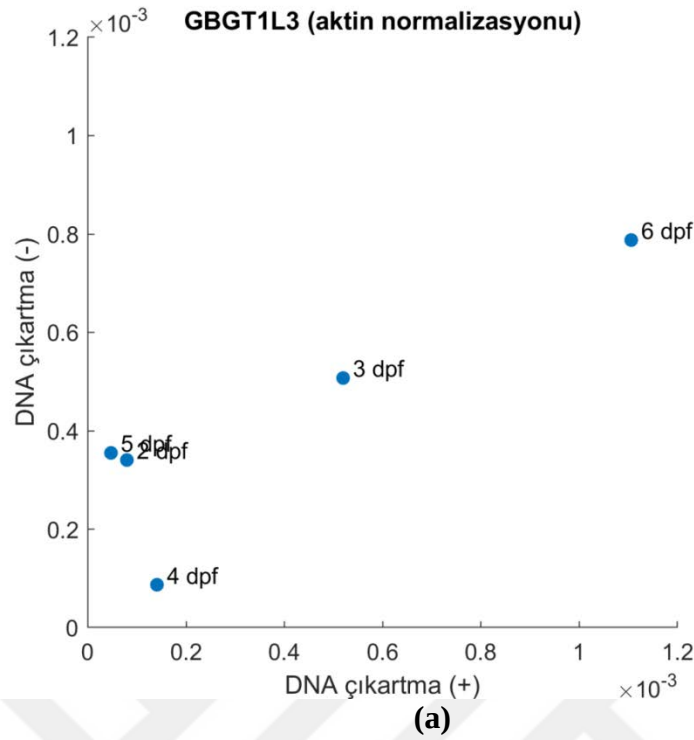
Ayrıca amplikonların gözlenebilmesi için DNA uzaklaştırması yapılan 3, 4, 5 günlük embriyo örneklerinden elde edilen RT-qPCR ürünleri, %1.5'lük agaroz jel elektroforez yöntemi uygulanarak görüntülendi (Şekil 3.10). Deney sonucunda

örneklerde beklenen boyutta, tek bir bant elde edildi. Bu durum genin doğru ve hedeflenen kısmının çoğaltıldığını göstermektedir. Negatif kontrol örneği yüklenen bölgede bant saptanmadığından, deneyin uygulanması esnasında herhangi bir kontaminasyon olmadığı belirlenmiştir.

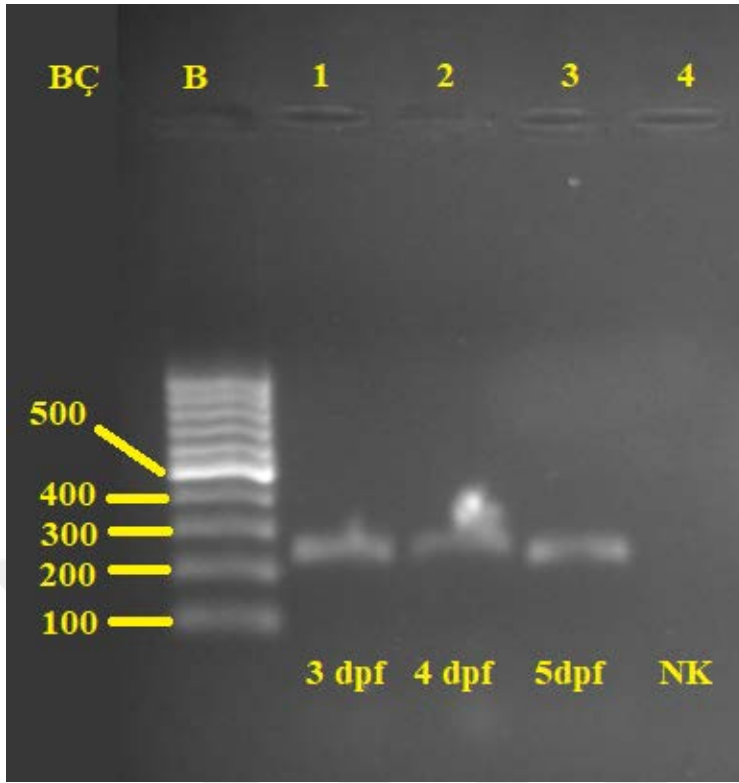




Şekil 3.8. Paralog Gbgt113 geninin DNA çıkartma yapılarak ve yapılmadan elde edilen örneklerde ortaya koyduğu ifade profilinin Actb2 ve Elfa referans genleriyle normalizasyonu. 2 dpf: 2 günlük embriyo, 3 dpf: 3 günlük embriyo, 4 dpf: 4 günlük embriyo, 5 dpf: 5 günlük embriyo, 6 dpf: 6 günlük embriyo, dpf: fertilizasyondan sonra gün (Biyolojik örnek sayısı her bir grup için 1 olup, RNA 20-30 adet embriyodan çıkarılmıştır)



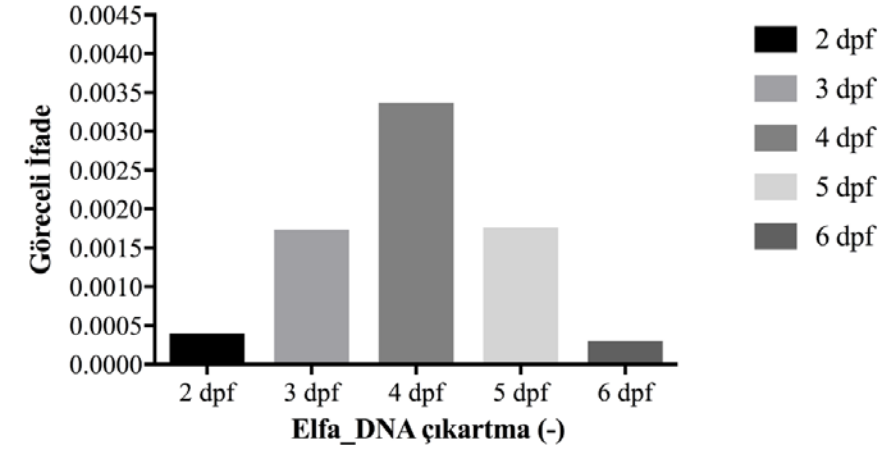
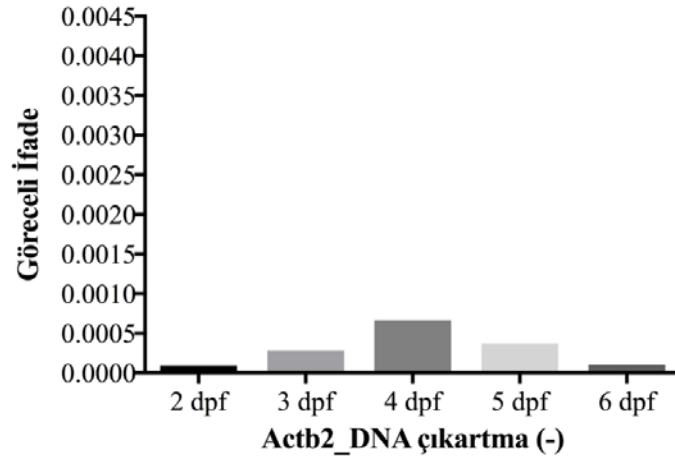
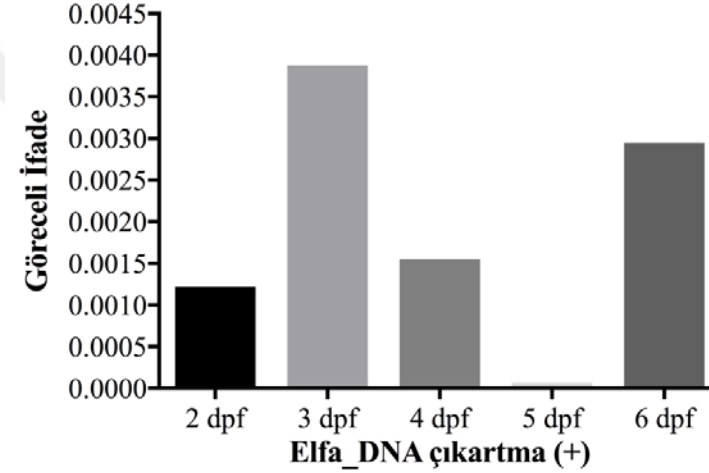
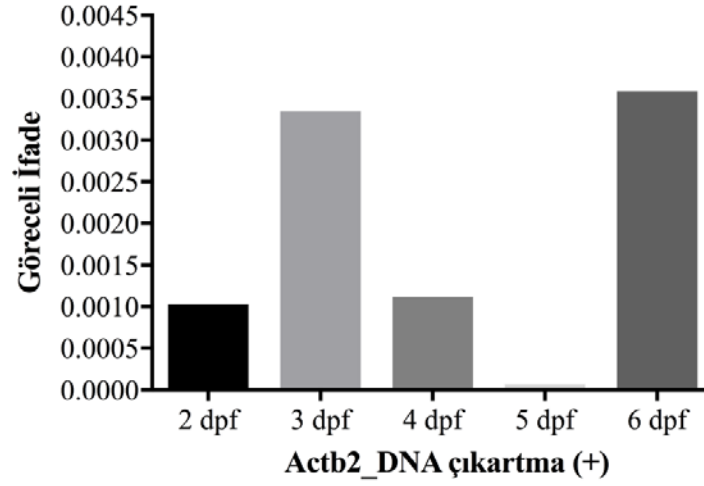
Şekil 3.9. (a) Paralog Ggt1l3 geninin Actb2 referans geniyle normalize edilmesi sonucunda DNA çıkartma yapılarak ve yapılmadan elde edilen 2, 3, 4, 5, 6 günlük embriyo örneklerinde ortaya koyduğu ifade değerlerinin korelasyon analizi ile karşılaştırılması **(b)** Paralog Ggt1l3 geninin Elfa referans geniyle normalize edilerek DNA çıkartma yapılarak ve yapılmadan elde edilen 2, 3, 4, 5, 6 günlük embriyo örneklerinde ortaya koyduğu ifade değerlerinin korelasyon analizi ile karşılaştırılması. 2 dpf: 2 günlük embriyo, 3 dpf: 3 günlük embriyo, 4 dpf: 4 günlük embriyo, 5 dpf: 5 günlük embriyo, 6 dpf: 6 günlük embriyo, dpf: fertilizasyondan sonra gün



Şekil 3.10. DNA uzaklaştırması yapılan 3, 4, 5 günlük embriyo örneklerinin RT-qPCR amplifikasyon ürünlerinin %1.5'luk agaroz jel elektoroforez görüntüsü. BÇ: Baz çifti, B: Belirteç DNA (SM0241, GeneRuler 100 bp DNA Ladder, Thermo Scientific), 1: 3 günlük embriyo grubu örneği, 2: 4 günlük embriyo grubu örneği, 3: 5 günlük embriyo grubu örneği, 4: Negatif kontrol grubu örneği, dpf: fertilizasyondan sonra gün, NK: Negatif Kontrol

3.2.4. Paralog Gbgt114 Geninin DNA Uzaklaştırılarak ve Uzaklaştırılmadan Elde Edilen Embriyo Örneklerinde Ortaya Koyduğu Göreceli İfadesi

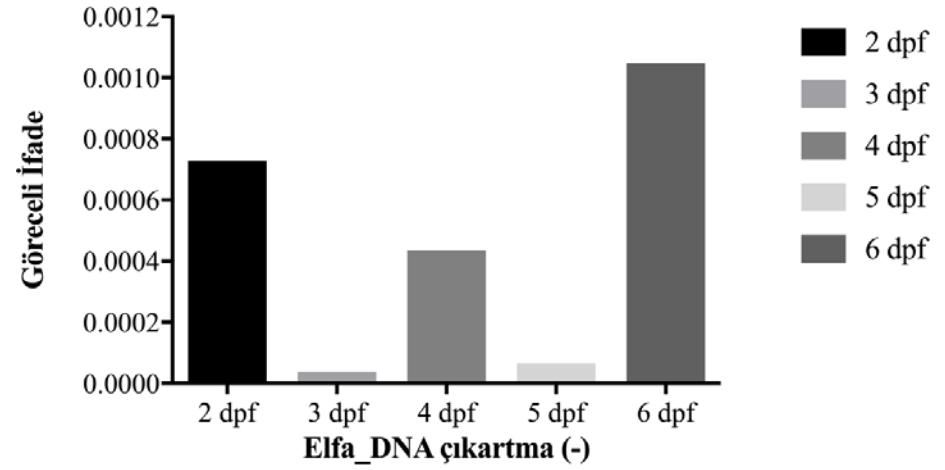
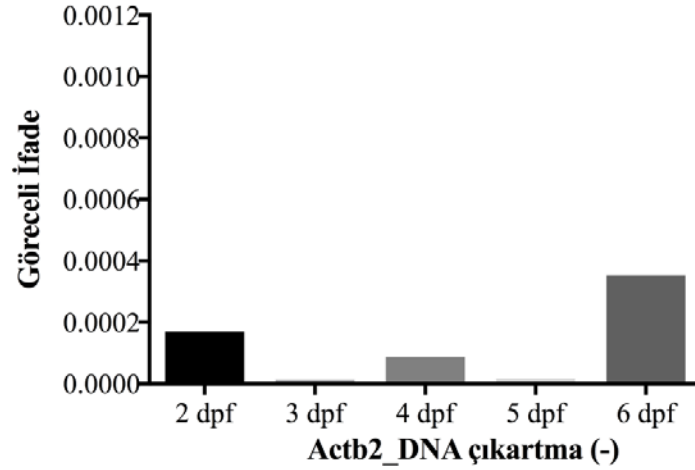
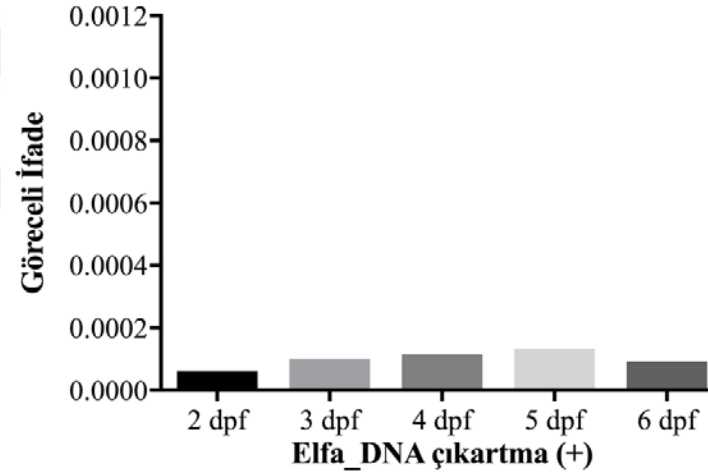
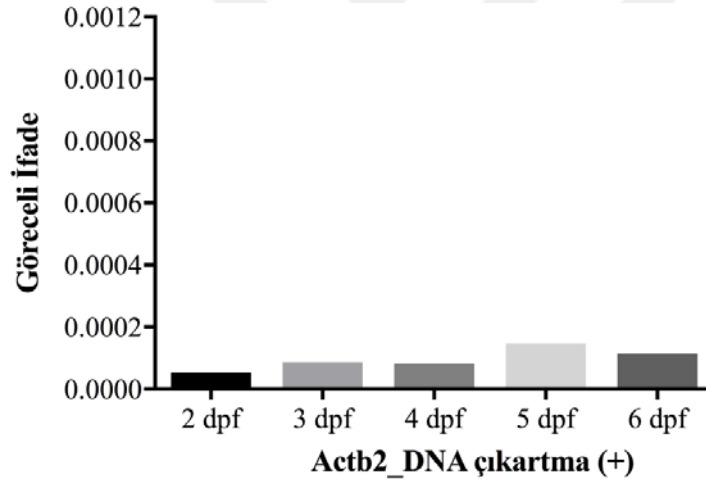
DNA çıkartımı uygulanan örneklerde Gbgt114 geninin hem Elfa hem de Actb2 referans geniyle normalize edilerek ortaya konan göreceli ifade sonuçları birbiriyle uyumludur. Bu sonuçlara göre 3. ve 6. günlerde Gbgt114 geninin ifadesi artmaktadır (Şekil 3.11). Beş günlük embriyolarda genin ifadesi diğer günlere göre minimum seviyededir. DNA çıkartması yapılmayan örneklerin Actb2 referans geniyle karşılaştırmalı olarak ortaya koyduğu göreceli ifade sonuçlarına göre ise genin ifadesi tüm günlerde azdır. DNA çıkartması uygulanmayan grupta ilgili genin göreceli ifadesini belirlemek için Elfa geninin kullanıldığı RT-qPCR amplifikasyonunun sonuçlarına göre, genin maksimum ifade profili 4. günde ortaya çıkmaktadır. Üçüncü günde DNA çıkartma uygulanan gruba göre genin ifadesinde azalma görülmektedir. DNA çıkartımı yapılmayan örneklerin Gbgt114 için ortaya koyduğu göreceli ifade profillerini karşılaştırmada Actb2 ve Elfa referans genlerinin kullanımına göre sonuçlarda farklılık görülmektedir.



Şekil 3.11. Paralog Gbgt114 geninin DNA çıkartma yapılarak ve yapılmadan elde edilen örneklerde ortaya koyduğu ifade profilinin Actb2 ve Elfa referans genleriyle normalizasyonu. 2 dpf: 2 günlük embriyo, 3 dpf: 3 günlük embriyo, 4 dpf: 4 günlük embriyo, 5 dpf: 5 günlük embriyo, 6 dpf: 6 günlük embriyo, dpf: fertilizasyondan sonra gün (Biyolojik örnek sayısı her bir grup için 1 olup, RNA 20-30 adet embriyodan çıkarılmıştır)

3.2.5. Paralog Gbgt111 Geninin DNA Uzaklaştırılarak ve Uzaklaştırılmadan Elde Edilen Embriyo Örneklerinde Ortaya Koyduğu Göreceli İfadesi

DNA çıkartımı uygulanarak elde edilen örneklerin, Elfa ve Actb2 referans genleriyle Gbgt111 geninin ortaya koyduğu RT-qPCR amplifikasyonunun sonuçları karşılaştırıldığında 2, 3, 4, 5, 6 günlük embriyoların hepsinde ilgili genin ifade profili düşüktür (Şekil 3.12). Actb2 referans geniyle normalize edilerek DNA çıkartımı yapılmadan elde edilen grubun deney sonuçlarına göre, 6. günde genin ifadesi maksimum seviyeye ulaşmaktadır. DNA çıkartımı yapılmadan elde edilen örneklerin Elfa referans geniyle normalizasyonunda 2. ve 6. günlerde Gbgt111 geninin ifadesinde artış görülmekte, 6. günde ise maksimum seviyeye ulaşmaktadır. DNA çıkartımı yapılmadan elde edilen örneklerin Actb2 referans geniyle normalizasyonunun yapıldığı deney sonuçlarına göre Gbgt111 geninin ifadesi 3. ve 5. günlerde daha azken, Elfa referans geniyle yapılan normalizasyonda bu günlerde Gbgt111 geninin ifadesinin daha yüksek olduğu ortaya kondu.

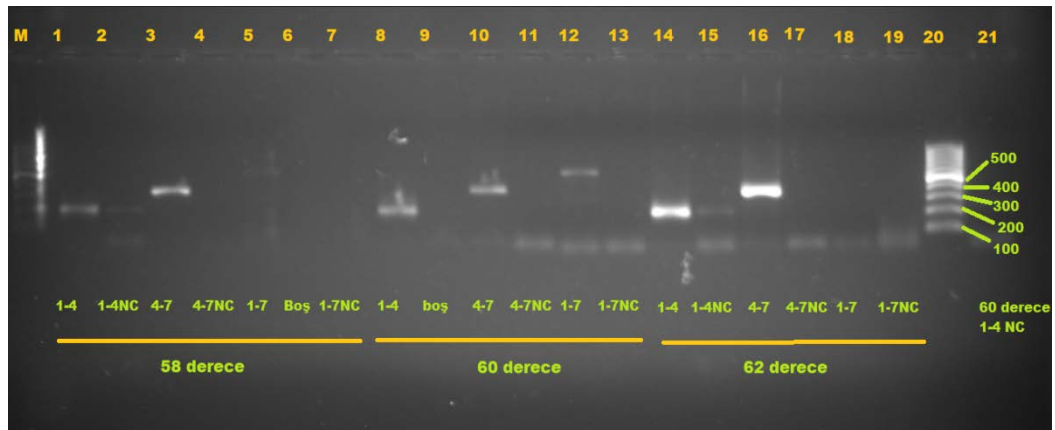


Şekil 3.12. Paralog Gbgt111 geninin DNA çıkartma yapılarak ve yapılmadan elde edilen örneklerde ortaya koyduğu ifade profilinin Actb2 ve Elfa referans genleriyle normalizasyonu. 2 dpf: 2 günlük embriyo, 3 dpf: 3 günlük embriyo, 4 dpf: 4 günlük embriyo, 5 dpf: 5 günlük embriyo, 6 dpf: 6 günlük embriyo, dpf: fertilizasyondan sonra gün (Biyolojik örnek sayısı her bir grup için 1 olup, RNA 20-30 adet embriyodan çıkarılmıştır)

3.3. Gbgt113 Geninin Alternatif Kırılma Analizi

Bağlanma sıcaklığının optimizasyonu için gradient PCR yapılması gerekmektedir (58°C, 60°C, 62°C olacak şekilde 3 farklı derecede). Bu nedenle 6 günlük embriyolar kullanılarak 1-4, 4-7, 1-7 ekzon bölgelerine ait primerler dilüe edilip her 3 grup için 3 farklı derece (58°C, 60°C, 62°C) ayarı yapılarak Gradient PCR yapıldı. Sonuçlara göre 60°C’de her 3 ekzon bölgesine ait primerlerin ifadesinin görüldüğü ve primerlerin etkin bir şekilde çalıştığı tespit edildi (Şekil 3.13).

60°C optimum sıcaklık derecesi olarak belirlendikten sonra 2, 3, 4, 5, 6 günlük embriyolardan elde edilen örneklerle ve 1-5 ve 4-7 ekzon bölgelerine ait primerler ile PCR yapıldı. Elde edilen PCR ürünleri %1,5’luk agaroz jel hazırlanarak elektroforezde yürütüldü (Şekil 3.14). Jel sonuçlarına göre ekzon 1-5 bölgesinin yaklaşık uzunluğu 200 baz çiftiyken, ekzon 4-7 bölgesinin uzunluğu yaklaşık 400 baz çifti civarındadır. Negatif kontrollerde herhangi bir bant görülmemektedir. Bu da deneyler sırasında herhangi bir kontaminasyon olmadığına işaret etmektedir. Gbgt113 geninin ekzon 4-7 bölgesinde görüntülenen bantların daha belirgin olması genin bu ekzon bölgesinde daha fazla ifade olduğuna işaret etmektedir.



Şekil 3.13. Altı günlük embriyolardan elde edilen örneklerle 1-5, 4-7 ve 1-7 ekzon bölgelerine ait primerler kullanılarak yapılan Gradient PCR uygulamasının %1,5’luk agaroz jel elektroforez görüntüsü. M: Belirteç DNA (SM0241, GeneRuler 100 bp DNA Ladder, Thermo Scientific), 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 sırasıyla 58°C ‘de Gbgt113 geni için 1-4, 1-4 NC, 4-7, 4-7 NC, 1-7, boş, 1-7 NC, 8,9,10,11, 21 sırasıyla 60°C’de Gbgt113 geni için 1-4, boş, 4-7, 4-7 NC, 1-4 NC, 14,15,16,17,18,19 sırasıyla 62°C’de Gbgt113 1-4, 1-4 NC, 4-7, 4-7 NC, 1-7, 1-7 NC, 20: Belirteç DNA (SM0241, GeneRuler 100 bp DNA Ladder, Thermo Scientific), NC: Negatif Kontrol



Şekil 3.14. 2, 3, 4, 5, 6 günlük embriyo örneklerinin ekzon 1-5 ve ekzon 4-7 bölgelerine ait primerlerle 60°C’de yapılan PCR ürünlerinin %1.5’luk agaroz jel elektoroforez görüntüsü. BÇ: Baz çifti, B: Belirteç DNA (SM0241, GeneRuler 100 bp DNA Ladder, Thermo Scientific), 2 dpf: 2 günlük embriyo, 3 dpf: 3 günlük embriyo, 4 dpf: 4 günlük embriyo, 5 dpf: 5 günlük embriyo, 6 dpf: 6 günlük embriyo, dpf: fertilizasyondan sonra gün, 1-6: Ekzon 1-5 bölgesine ait primerler, 7: Boş, 8-13: Ekzon 4-7 bölgesine ait primerler

4. TARTIŞMA

Kronik periodontitisin aksine agresif periodontitis; daha erken yaşlarda ve daha şiddetli seyretmekle birlikte, popülasyonda daha az sıklıkta görülmektedir. Bireylerin her iki periodontitis tipine duyarlılığı; bakteriler, bağışıklık sistemi ve sigara, stres, diyet gibi yaşam tarzı faktörlerinin arasındaki karmaşık etkileşimler tarafından belirlenir ve genlerin de bu düzenlemede etkin rolü vardır Agresif periodontitisin konvansiyonel periodontal tedaviye vereceği yanıt öngörülemez ve bu hastalar için genel prognoz kronik periodontitisli hastalardan daha kötüdür. Agresif periodontitis hastaları konvansiyonel yöntemlere arzu ettiğimiz yanıtı vermedikleri ve hastalık olağandışı bir hızla ilerlediği için bu durumda sorulabilecek en mantıklı soru bozulmuş konak bağışıklık yanıtı ile ilişkili olarak bu hastalığa katkıda bulunabilecek ve her zamanki terapötik önlemlere rağmen hastalığa sınırlı yanıt verilmesine sebep olabilecek başka etkenlerin olup olmadığıdır. Bu bağlamda agresif periodontitiste genetik faktörlerin, hastalığın gelişimi ve ilerlemesine büyük ölçüde katkıda bulunduğu düşünülmektedir. Agresif periodontitis gibi daha nadir ve erken yaşlarda görülen hastalıkların ortaya çıkmasında nedensel rol oynayan gen varyantlarının etkisi oldukça fazladır ve bunu doğrulamak için farklı popülasyonlarda GWAS çalışmaları yapılmaktadır (Carranza, 2015; Laine ve ark., 2014; Vaithilingam ve ark., 2014). Alman popülasyonu ele alınarak yapılan bir GWAS çalışması sonucunda (Schaefer ve ark. 2010), insandaki GLT6D1 geninin agresif periodontitisle ilişkilendirilen en güçlü aday gen olduğu ortaya konmuştur. Bu araştırmada, GLT6D1 geninin rs1537415 varyantının G allelinde görülen SNP'in bu ilişkide rolü olduğu iddia edilmiştir. Schaefer ve ark.nın yaptığı çalışma referans alınarak, Sudan popülasyonunda agresif periodontitis ve kontrol bireylerinin dahil edildiği bir pilot çalışma yapılmış (Hashim ve ark., 2015) ve GLT6D1 geninin agresif periodontitisle anlamlı derecede ilişkili olduğu bu popülasyonda da ortaya konmuştur. GLT6D1 geni ve agresif periodontitis arasındaki ilişkiyi araştırmak için yapılan her iki GWAS çalışmasında da; kontrol ve hasta bireylerden kan örnekleri toplanmış, bu kan örneklerinden DNA ekstraksiyonu yapılmış, genomik DNA elde edildikten sonra önceden belirlenen SNP'ler için genotipleme yapılarak bu ilişki ortaya konmuştur. Konuyla ilgili detaylı literatür taraması yapıldığında, GLT6D1 geninin agresif

periodontitis üzerindeki etkisini kanıtlamak ve bu geni en güçlü aday gen konumundan çıkarıp ilişkisi kesin olarak kanıtlanan gen konumuna getirmek için herhangi bir çalışma yapılmadığı farkedilmiştir. Bu tez çalışması planlanırken, GLT6D1 geninin agresif periodontitis üzerindeki etkilerinin kanıtlanması için; genin susturulması, genin etkisinin azaltılması veya overeksprese edilmesi gibi genetik manipülasyonlar kullanılarak yapılan daha ileri çalışmalara ihtiyaç duyulduğu tespit edilmiştir.

Çalışmamızı planlarken hedefimiz, GLT6D1 geninin ifade profilinde değişiklikler oluşturarak agresif periodontitisle olan ilişkisini kesin ve somut kanıtlar üzerine dayandırmaktır. İnsan üzerinde bu genin etkisini değiştirmek hem daha önce yapılan ve kesin sonuçlar içeren hayvan çalışmaları olması zorunluluğu barındırdığından hem de ilgili genin daha önce tanımlanmamış hayati fonksiyonları olabilmesi açısından tehlike arz etmekte ve bu çalışmayı yapmayı etik açıdan imkansız kılmaktaydı. Sonuç olarak bu durum bizi hayvan modelleriyle çalışma yapmaya yönlendirdi.

Buradan yola çıkarak yaptığımız ön analizler sonucunda, GLT6D1 geninin fare, rat gibi hayvanlardaki ortoloğunun tanımlı olduğu fakat zebrafish'teki ortoloğunun henüz tanımlı olmadığını tespit ettik. Fare, rat gibi hayvan modelleri yerine zebrafish modeli tercih etmemizin sebebi; son dönemlerde zebrafish'in özellikle embriyonik gelişiminin genetik kontrolünü inceleyen araştırmacılar için arzu edilen bir omurgalı model organizma haline gelmiş olmasıdır. Bunun sebebi zebrafish'in bir dizi embriyolojik ve deneysel avantaja sahip olmasıdır. Zebrafish'in bakımı ve üretimi kolaydır ve embriyolar mikroyenjeksiyon, hücre transplantasyonu gibi deneysel manipülasyonlar için yeterince güçlüdür (Brand ve ark., 2002). Fare, rat gibi hayvan modellerinde uzun yıllar sürebilecek deneylerin yapımı, zebrafish'leri çok hızlı bir şekilde geliştirdiğinden ve böylece deneylerin genellikle birkaç saatten birkaç güne kadar tamamlanmasına olanak sağladığından zaman kazancı sağlamaktadır. Memelilerde bulunan çoğu gen ailesinin, zebrafish'lerinde bir veya birden daha fazla ortologu bulunmaktadır. Bu modelde çok sayıda insan hastalığına ait gen ortologlarının tanımlanması, zebrafish'i

insanda görülen hastalıkların incelenmesi için uygun model haline getirmektedir (Carpio ve Estrada, 2006; Dahm, 2002; Gilmour ve ark., 2002).

GLT6D1 geninin zebrabalığındaki ortoloğu tanımlı olmadığından, ilk adımımız GLT6D1 geninin paraloglarının zebrabalığında ortoloğu olup olmadığını araştırmaktı. Yaptığımız ön araştırmalar sonucunda insan GLT6D1 geninin paraloğu olan GBGT1 geninin zebrabalığında tanımlanmış ortologları olduğunu tespit ettik. GBGT1 geninin zebrabalığındaki ortologları Gbgt111, Gbgt113 ve Gbgt114 genlerinin dahil olduğu GBGT1 ailesidir. Yeni zebrabalığı genom/proteom eklemeleri çıktıkça, Ensembl veri tabanında insan protein sekansı incelenmeye devam edilip varsa başka paraloglar da deneylerle test edilecektir. Elimizdeki mevcut *in silico* bulgulara göre (Şekil 3.4), Gbgt111 geni maternal bir gendir ve embriyonun sadece erken gelişim evrelerinde ihtiyaç duyulan proteinleri sağlamaktadır. Gbgt114 geninin ifadesi ise embriyogenezin başlangıcından itibaren sürekli yüksek seviyededir. Bunun yanında Gbgt113 geninin zebrabalığı embriyolarında dış gelişim döneminin başlangıcı olan 2. ve 3. günlerden itibaren ifadesi artmaktadır. Bu bilgiler ışığında Gbgt113 geni, insan GLT6D1 geninin muhtemel ortoloğu olarak düşünülmüştür. Bu hipotezi doğrulamak amacıyla tüm genler için aynı deneyler yapılmıştır. Paralog genler üzerinden ilerlememizin riski paralog genlerin tek genomda gen ikilenmesi sonucunda oluşan ürünler olduğundan işlevlerinin farklılık gösterebilmesiydi.

Deneylere başlamadan önce kullanılacak embriyo sayısı yeterli miktarda RNA ekstraksiyonu yapabilmek için literatürdeki çalışmalar dikkate alınarak (Avcı ve ark., 2016; Doldur-Balli ve ark., 2015) 20-30 arasında olacak şekilde belirlendi.

Embriyolardan total RNA ekstrakte edip, bu RNA'dan cDNA sentezledikten sonra muhtemel ortolog genimiz olan Gbgt113 geninin ve diğer genlerin 2, 3, 4, 5, 6 günlük embriyolarda ortaya koyduğu ifade profilini belirlemek için RT-qPCR yapılması planlandı. Hedef genleri normalize etmek için hangi referans geni seçeceğimize literatür taraması yaparak karar verdik. Literatüre göre ideal bir referans gen, farklı deneklerden, farklı dokulardan, farklı gelişim aşamalarından

alınan örneklerde, deneysel tedavilerden sonra bile stabil bir ifade ortaya koymalıdır (Bustin, 2000). Zebrabalıklarında qPCR kullanılarak yapılan araştırmalara ait literatür taramasında daha stabil olduğu için referans gen olarak genelde Actb1 geninin tercih edildiği görülürken bazı çalışmalarda ise Elfa geninin tercih edildiği tespit edilmiştir (McCurley ve Callard, 2008). Bütün bunları dikkate alarak hedef genlerin normalizasyonu için Actb2 ve Elfa referans genlerini seçtik. Deneylerin güvenilirliğini arttırmak ve referans gen kaynaklı hataları elimine etmek için Elfa ve Actb2 referans genleriyle kontrol amaçlı RT-qPCR yaptık. Deneyde her iki referans gen için, hem DNA çıkartılması uygulanan hem de uygulanmayan iki farklı grupta çalıştık. DNA uzaklaştırması yapılarak ve yapılmadan elde edilen 2, 3, 4, 5, 6 günlük embriyo örneklerinin sonuçlarında referans genlerin göreceli ifadelerinin seviyesinde bariz bir fark olmadığı tespit edildi (Şekil 3.5). Fakat Actb2 ve Elfa genlerinin DNA çıkartımı yapılan ve yapılmayan örneklerde ortaya koyduğu ifade profilleriyle korelasyon analizi yapıldığında Actb2 geni DNA çıkartımından etkilenmezken Elfa geninin etkilendiği tespit edildi (Şekil 3.6). Bu sonuçlar DNA çıkartımı yapılmamasının Elfa geni gibi diğer hedef genlerin de ifadesini değiştirebileceğini göstermektedir ve DNA çıkartımının önemine dikkat çekmektedir. Literatür taraması yapıldığında zebrabalığı embriyo ve larvalarında araştırılan genlerin normalizasyonu için hem Actb2 hem de Elfa referans genlerinin kullanıldığı görülse de (McCurley ve Callard, 2008), DNA çıkartımı uygulamasının bu referans genlerin ifadesinde değişiklik yaratıp yaratmadığına dair herhangi bir çalışma bulunamadı. Bizim çalışmamızla literatüre, DNA çıkartımının Elfa referans geninin ifadesinde değişiklik yarattığı gibi başka genlerin ifadelerinde de değişiklik yaratabileceği bilgisi kazandırıldı.

Deneysel hataları elimine etmek için zebrabalığında daha önce tanımlanan ve embriyolardaki ifade profili bilinen Fabp10a geni için RT-qPCR yapıldı. Deneyde Elfa ve Actb2 referans genleri kullanılarak hem DNA çıkartımı yapılan hem de yapılmayan embriyo gruplarının ortaya koyduğu ifade profilleri karşılaştırıldı (Şekil 3.7). Yapılan delta-CT analizlerinden elde edilen sonuçlara göre, Fabp10a geni 2 günlük embriyolarda ifade olmakta ve ilerleyen günlerde bu genin ifadesi gittikçe artmaktadır. Altı günlük embriyolarda ise bu genin ifadesi en yüksek seviyeye

ulaşmaktadır. Literatürde Fabp10a geninin embriyolardaki ifade profilini ortaya koyan bir çalışmada (Venkatachalam ve ark., 2009), bu genin 2 günlük embriyolarda ifade olduğu ve embriyo olgunlaştıkça genin ifadesinin giderek arttığı RT-qPCR ve *in situ* hibridizasyon yöntemleriyle ortaya konmuştur. Fabp10a geni zebrabalığı embriyo ve larvalarında sadece karaciğerde sentezlendiğinden, karaciğer gelişimi ve büyümesi devam ettikçe genin ekspresyonu artmaktadır. Bu durum genin ifadesinde sürekli artış olmasını açıklamaktadır. Zebrabalığındaki Gbgt113 geninin karakterizasyonu daha önce yapılmadığından elimizdeki *in silico* bulgulardan başka bir kaynağımız yoktur. Yaptığımız deneylerde teknik bir hata olmadığını ıspatlamak için, ekspresyon paterni iyi bilinen Fabp10a geni ile karakterizasyonunu hedeflediğimiz genle birebir aynı deneysel yöntemlerle çalışılmıştır. Buna göre Fabp10a geni ile yaptığımız deneyin sonuçları literatürle uyumludur. Böylece izlediğimiz deney protokolünde herhangi bir teknik hata olmadığı görülmüş oldu.

Esas hedef genimiz olan Gbgt113 geni için Elfa ve Actb2 referans genleriyle hem DNA çıkartma yaparak hem de yapmadan elde ettiğimiz RT-qPCR sonuçları karşılaştırıldı (Şekil 3.8). Buna göre DNA çıkartımı yapılmadan elde edilen sonuçlarda Elfa ve Actb2 genleriyle yapılan deneylerin sonuçlarının birbiriyle uyumlu olması gerekirken, ifade profillerinde farklılık olduğu görülmektedir. DNA çıkartımı yapılan ve yapılmayan örneklerin Elfa ve Actb2 referans genleriyle normalizasyonun karşılaştırıldığı korelasyon analizine göre (Şekil 3.9) Elfa geninin referans olarak kullanıldığı deneyde Gbgt113 geninin ifadesinin DNA çıkartımından etkilendiği görüldü. Bundan dolayı farklı referans genlerin kullanımı sonucunda genin ifadesinde farklılık görülmesinin sebebinin referans gen tercihindan kaynaklı olmasından ziyade DNA uzaklaştırma yapılmamasından ve dolayısıyla genomik DNA kaynaklı amplifikasyonların engellenememiş olmasından kaynaklanabileceğini düşündük. Burdan yola çıkarak DNA uzaklaştırması yapılan sonuçların daha güvenilir olduğu kanısına vardık. Her iki referans genle yapılan normalizasyonda DNA çıkartma işlemi uygulanan 3 günlük embriyolardaki Gbgt113 geninin ifade profili 2, 4, 5 günlük embriyolara göre daha yüksektir. Altıncı günde ise en yüksek ifade profili görülmektedir. Ön çalışmalarımızda elde ettiğimiz *in silico* bulgularımıza göre bu genin ifadesi 4. ve 5. günlerde yüksekken (Şekil 3.4),

yaptığımız deneylerde 4. ve 5. günlerde ifadede bir düşüş görülmektedir. *In silico* bulgularla deney sonuçlarımız arasında farklılık görülmesinin sebebi, embriyoların farklı dönemlerde farklı tesislerde toplanması ve dolayısıyla embriyo kalitesinin değişiklik göstermesi olarak düşünüldü. Genin ifade profilinin hangi günlerde kesin olarak daha yüksek olduğunun ortaya konulabilmesi için; ilk olarak aynı zamanlarda birden fazla set oluşturularak toplanan embriyolarda deney yapıp bunların sonuçlarının karşılaştırılması gerekir. Aynı embriyolardan hazırlanan örneklerle yapılan deneyler ve teknik replikaların sonuçlarının karşılaştırılması ile embriyoların farklı zamanlarda toplanmasından kaynaklanabilecek farklılıklar elimine edilmiş olunacaktır. İkinci olarak da farklı zamanlarda toplanmış embriyo setlerinde teknik replika sayısı artırılarak deneyler tekrarlanmalı ve sonuçlar karşılaştırılmalıdır. Buna göre, aynı gün alınan setlerdeki embriyoların sonuçları hem kendi içinde hem de farklı günlerde toplanan embriyoların sonuçlarıyla karşılaştırılarak ifade profilinin kaçınıcı günlerde yükseldiği daha net bir şekilde ortaya konulabilir. Yaptığımız deney sonuçlarıyla *in silico* bulgular birleştirildiğinde insan GLT6D1 geninin zebra balığındaki en muhtemel ortoloğunun dış gelişim döneminden itibaren ifadesi artan Gbgt113 geninin olduğu düşünülmektedir. Fakat bunun daha net bir şekilde ortaya konması için yetişkin zebra balıklarının dış ve dış çevresindeki dokularında bu paralogların ifade değerlerinin tespiti için deneyler yapıp embriyolara ait sonuçlarla karşılaştırılmalıdır. Böylece zebra balığındaki muhtemel ortolog genin dışı ait dokulara spesifik olup olmadığı belirlenmiş olacaktır.

GLT6D1 geninin paraloglarının ortologlarını hedef alarak belirlediğimiz genler arasında bulunan Gbgt111 geni, yayını henüz yapılmamış tek bir çalışmadan elde ettiğimiz *in silico* bulgulardan yola çıkarak değerlendirilmiştir (Şekil 3.4). Bu çalışmaya göre Gbgt111 geni maternal dönemde ifade olmakta ve sadece erken gelişim evrelerinde ihtiyaç duyulan proteinleri sağlamaktadır. Embriyo olgunlaştıkça ifade profilinde ciddi düşüş görülmektedir. Bu bulgulara göre dış gelişim dönemi olan 2. ve 3. günlerde genin ifadesi oldukça düşük olduğundan bu gen esas hedef gen olarak belirlenmemiştir. Bu genin GLT6D1 geninin ortologu olup olamayacağını bulgulamak için, 2, 3, 4, 5, 6 günlük embriyolarda ilgili genin sergilediği ifade profili RT-qPCR yapılarak araştırılmıştır (Şekil 3.12). Deney sonuçlarımıza göre 2,

3, 4, 5, 6 günlük embriyo örneklerinde *in silico* bulgulara benzer şekilde bu genin ifadesinin diğer hedef ortolog genlere göre daha az olduğu görülmektedir. Sadece maternal dönemde ifadesi yüksek seviyelerde olduğu ve gelişimin devam eden günlerinde ifadesi düşük olduğu için Gbgt111 geni esas hedef gen olarak belirlenmemiştir. .

Gbgt114'ün *in silico* bulgularına bakıldığında (Şekil 3.4) ise bu genin embriyogenezin başlangıcından 5. güne kadar yüksek seviyelerde ifade olduğu görülmektedir. DNA çıkartımı uygulanmayan örneklerde yaptığımız RT-qPCR deneyinin sonuçlarına göre (Şekil 3.11) Gbgt114 geni *in silico* bulgulara benzer şekilde 2, 3, 4, 5, 6 günlük embriyo örneklerinin hepsinde yüksek derecede eksprese olmaktadır. Fakat deney sonuçlarımızda DNA çıkartımı uygulanan örneklerin ortaya koyduğu ifadenin inişli çıkışlı bir profil sergilediği görülmektedir. Böyle bir farklılığın ortaya çıkmasının olası sebeplerinden biri örneklerde DNA çıkartımı uygulanmasının, genomik DNA kontaminasyonu kaynaklı amplifikasyonları engellediği için genin ifade profilinde değişiklik oluşturmuş olabileceğidir. DNA çıkartımı uygulanmayan örneklerden elde edilen sonuçlar *in silico* bulgularla daha stabil bir seyir göstermesi açısından benzemektedir. Deneyimizin sonuçlarıyla *in silico* bulgular birleştirildiğinde, Gbgt114 geninin dış gibi herhangi bir dokuya spesifik olmaktan çok ifadesi sürekli yüksek seviyede olan bir gen olduğu görülmektedir. Bu sebeple bu genin de muhtemel ortolog olamayacağı düşünülmüştür. Fakat deney sonuçlarımızda DNA çıkartımı uygulanan ve uygulanmayan grupların ifade profillerinde farklılık görülmesinden dolayı deneyin farklı embriyo gruplarıyla yeniden tekrarlanması daha güvenilir sonuçlar elde edilmesi açısından yararlı olacaktır.

RT-qPCR için tasarladığımız primerler (Çizelge 2.1) Gbgt113 geninin tüm ekzonlarını değil belirli bir kısmını amplifiye ettiğinden, ilgili genin tüm ekzonlarının zebrabalığında ifade olup olmadığını belirlemek için ekzon 1-5 ve 4-7 bölgeleri için 2 ayrı primer (Çizelge 2.2) tasarladık. Tasarlanan primerlerle 6 günlük embriyoları kullanarak gradient PCR (58°C, 60°C, 62°C) yapmamızın sebebi bağlanma sıcaklığını test edip optimum sıcaklık derecesini belirlemektir. Jel elektoroforez

sonuçlarına göre (Şekil 3.13) 62°C’de ekzon 1-5 ve 4-7 bölgelerine ait primerlerin daha radyopak bantlar ortaya koymasının sebebi bu sıcaklık derecesinde daha güçlü ifade olmalarından kaynaklanmaktadır. Fakat jel elektroforez görüntüleri incelendiğinde, Gbgt113 geninin en uzun ekzonu olan 1-7’e ait primerlerin bu sıcaklık derecesinde hiç çalışmadığı görüldü. Bundan dolayı her 3 ekzon bölgesine ait primerlerin ifadesinin görüldüğü 60°C, optimum bağlanma sıcaklığı olarak belirlendi ve daha sonra yapılan tüm PCR deneylerinde bu sıcaklık derecesinde çalışıldı. Ayrıca jel elektroforez görüntüleri değerlendirildiğinde ilgili gen için tasarlanan 3 primerin de alternatif kırılma ortaya koymadığı, yani aynı genden oluşan farklı ürünlere sebep olmadığı görüldü.

Optimum bağlanma sıcaklığı olarak belirlenen 60°C’de Gbgt113 geninin ekzon 1-5 ve 4-7 bölgelerine ait primerler ve 2, 3, 4, 5, 6 günlük embriyo örnekleri kullanılarak jel elektroforez yapıldı (Şekil 3.14). Bu jelin sonuçlarına göre ekzon 4-7 bölgesi için 3, 4, 6 günlük embriyolarda yaklaşık 1000 baz çiftlik kısma denk gelen bölgede fazladan bantlar görülmektedir. Bu bantların görülmesinin olası sebeplerinden biri ekzon 4-7 bölgesinde bulunan intronlardan herhangi birinin bölgeye eklenip çoğaltılmış olmasıdır. Ancak embriyo örneklerine DNA çıkartımı uygulandığı için, fazla bant görülmesinin sebebinin DNA kontaminasyonu olma ihtimali düşüktür. Bundan dolayı bu bantların nonspesifik olma olasılığı daha yüksektir. İfade oranlarına bakıldığında ise; ekzon 4-7 bölgesinde genin ekzon 1-5 bölgesine göre daha fazla ifade olduğu ancak 4-7 ekzon bölgesi için 5. günde bir miktar düşüş olduğu görülmektedir. Ekzon 1-5 bölgesinde 5. gün için ifadede düşme görülmemektedir, bu yüzden 4-7 bölgesi için 5. gündeki düşüklüğün sebebi jel yükleme hatasına bağlı olabilir. 1-5 ekzon bölgesi için ise genin ifadesinin genel olarak daha düşük olduğu görülmektedir. Bu ifade düşüklüğü PCR verimliliğindeki hatadan kaynaklı olabilir. Ancak bunu net olarak belirtebilmek için PCR sonuçlarının verimliliğinin test edilmesi gerekir.

Bu çalışmanın limitasyonlarından bir tanesi zebrabalığı embriyoları kullanmamızdır. Zebrabalığında diş gelişimi 48. saatte başladığı için Gbgt113 geninin agresif periodontitisle olan ilişkisini belirlemek adına bu genin embriyolardaki ifade

profilini ortaya koymak çalışmanın başlangıcı için şarttı. Fakat zebrabalığında diş gelişimi yaklaşık olarak 24-28. günler arasında tamamlandığından, zebrabalığı larvalarının ve erişkin zebrabalıklarının da çalışmaya dahil edilip ilgili genin larva ve erişkinlerdeki ifade profillerinin ortaya konmasıyla daha somut kanıtlar elde edilebilirdi. Böylece diş oluşumunun başlangıç döneminde embriyolardaki ifadesini ortaya koyduğumuz bu genin, diş gelişimi ilerleyip tamamlandığında da ifade olmaya devam edip etmediği kontrol edilebilir.

Bu çalışmayla, agresif periodontitiste etkili olduğu düşünülen gen veya gen polimorfizmleri daha önce hiç çalışılmayan bir hayvan modeli olan zebrabalığında çalışılmış ve böylece literatüre yenilik getirilmiştir. Devam eden bir projenin başlangıç çalışması olan bu araştırma tamamlandığında, insan GLT6D1 geninin zebrabalığındaki muhtemel ortoloğu olan Gbgt113 geninin etkisinin azaltılması veya tamamen susturulmasıyla diş dokuları üzerindeki etkisi incelenebilecektir. Hayvan modeli olarak zebrabalığı tercih edilerek hem hızlı gelişim gösterdiği için zamandan kazanç hem de bu model üzerinde genetik manipülasyonların yapılması daha kolay olduğu için teknik avantaj sağlanmıştır.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Yapılan biyoenformatik analizler sonucunda insan GLT6D1 geninin DNA, mRNA ve protein yapısıyla zebrabalığı Gbgt113 geninin yapısının diğer muhtemel paralog genlere göre daha uyumlu olduğu ve Gbgt113 geninin zebrabalığı embriyolarında diş gelişim dönemi olan 2. günden itibaren ifadesinin görüldüğü tespit edildi. Sonuç olarak agresif periodontitisle ilişkilendirilen GLT6D1 geninin zebrabalığındaki muhtemel ortoloğu Gbgt113'tür.

Zebrabalığında diş gelişimi yaklaşık olarak 24-28. günler arasında tamamlandığından daha ileri çalışmalarda, zebrabalığı larvalarında ve erişkin zebrabalıklarında ilgili genin ifade profillerinin ortaya konmasıyla daha somut kanıtlar elde edilebilir.

ÖZET

Agresif Periodontitiste Etkin GLT6D1 Geninin Zebrabalığındaki Ortoloğunun Tanımlanması

İn vivo yapılan bu araştırmada, GWAS (Genome Wide Association Studies) çalışmaları sonucunda agresif periodontitisle güçlü ilişkiye sahip olduğu düşünülen ve insanda tanımlı GLT6D1 geninin zebrabalığındaki muhtemel transkript varyantlarının tanımlanması ve zebrabalığı embriyolarında bu genin ifade profilinin ortaya konulması amaçlanmıştır.

Çalışmada zebrabalığının AB suşları kullanıldı. Her gün için ayrı olacak şekilde 2, 3, 4, 5, 6 günlük embriyolardan 30ar adet embriyo toplanarak hem DNA çıkartılarak hem de çıkartılmadan RNA izolasyonu yapıldı. İzole edilen total RNA'dan cDNA sentezlendi. Biyoenformatik ön çalışmalardan elde ettiğimiz bulgulara göre GLT6D1 geninin zebrabalığındaki muhtemel ortoloğunun Gbgt113, Gbgt111, Gbgt114 genlerinden biri olabileceği belirlendi ve bu genler için primer dizaynı yapıldı. Elde edilen primerler ve cDNA'larla RT-qPCR amplifikasyonu gerçekleştirildi. Deney sonucunda elde edilen Ct (Threshold cycle) değerleri kullanılarak delta Ct (ΔCt) değerleri hesaplandı. $2^{(-\Delta Ct)}$ metoduyla elde edilen verilere göre grafikler çizildi.

GLT6D1 geninin muhtemel ortoloğu zebrabalığı embriyolarının dış gelişimlerinin başladığı gün olan 2. günde ifadesinde artış görülen Gbgt113 geni olduğu için, bu genin 1-5, 4-7 ve 1-7 ekzon bölgeleri için ayrı primerler tasarlandı. Optimum bağlanma sıcaklığını tespit etmek amacıyla DNA çıkartımı yapılarak elde edilen embriyo örnekleri ve primerler kullanılarak Gradient PCR yapıldı. Belirlenen optimum sıcaklıkta PCR uygulandı. PCR'dan elde edilen ürünlerle jel elektroforezi gerçekleştirildi ve Gbgt113 geninin alternatif kırılma analizi değerlendirildi.

Gbgt113, Gbgt111 ve Gbgt114 genlerinin DNA çıkartımı uygulanan embriyo örneklerinde ortaya koydukları göreceli ifade profillerini belirlemek için Actb2 ve Elfa referans genleriyle, ilgili genlerin RT-qPCR sonuçları karşılaştırıldı. Bu deneyden elde edilen sonuçlara göre 3. ve 6. günlerde Gbgt113 geninin ifadesi artmakta, 6. günde ise maksimum seviyeye ulaşmaktadır. 2, 4, 5 günlük embriyolarda ise genin ifadesi diğer günlere göre daha azdır. Gbgt114 geninin DNA çıkartımı uygulanan embriyo örneklerinde ortaya koyduğu göreceli ifade profilinde 3. ve 6. günlerde ilgili genin ifadesinde artış görülmektedir. Bir diğer araştırılan gen olan Gbgt111 geninin göreceli ifade profili ise, DNA çıkartımı yapılarak elde edilen 2, 3, 4, 5, 6 günlük embriyo örneklerinin hepsinde düşüktür. Gbgt113 geninin alternatif kırılma gösterip göstermediğini değerlendirmek için yaptığımız jel elektroforez deneyine göre, bu gen için tasarlanan 3 primerin de alternatif kırılma ortaya koymadığı yani aynı genden oluşan farklı ürünlere sebep olmadığı tespit edildi.

Çalışmamızın sonuçlarına göre agresif periodontitisle ilişkilendirilen GLT6D1 geninin zebrabalığındaki muhtemel ortoloğu Gbgt113'tür ve bu genin embriyolardaki ifadesi anlamlıdır. Bu tespitle ilgili genin agresif periodontitis üzerindeki rolünü kesinleştirmek için etkisinin azaltılması (knock-down) veya susturulması (knock-out) gibi ileri genetik araştırmalar için temel oluşturan ilk çalışma yapılmış olundu.

Anahtar Kelimeler: Agresif periodontitis, Zebrabalığı, GLT6D1 geni, Ortolog gen

SUMMARY

Identification of Zebrafish Ortholog of GLT6D1 Gene That is Active in Aggressive Periodontitis

Results of GWAS (Genome Wide Association Studies) studies revealed a strong association of GLT6D1 gene with aggressive periodontitis and in this *in vivo* study we aimed to identify possible transcript variants of the gene in zebrafish and to reveal genetic expression profile in zebrafish embryos.

Thirty AB strain embryos from each 2, 3, 4, 5, 6 dpf (fertilizasyondan sonra gün) were collected for total RNA isolation. Total RNA isolation was performed both by DNase treatment and without. cDNA was synthesized from isolated total RNA. According to our findings from bioinformatics studies; we determined that the Gbgt1l3, Gbgt1l1, Gbgt1l4 genes in zebrafish are possible orthologs of the human GLT6D1 gene and designed primers for these genes. RT-qPCR amplification was performed with the primers and cDNAs obtained. The delta Ct (ΔCt) values were calculated using the Ct (Threshold cycle) values obtained as a result of the experiment. Graphics were created according to the $2^{(-\Delta Ct)}$ method.

Since the possible orthologue of the human GLT6D1 gene in zebrafish is the Gbgt1l3 gene which its expression increases on day 2, the day tooth development begins, specific primers for the 1-5, 4-7 and 1-7 exon regions of this gene were designed. Gradient PCR was performed using the DNase treated embryo samples and our designed primers in order to determine optimal annealing temperature. PCR was performed at the specified annealing temperature. Gel electrophoresis was run with these PCR products to evaluate the alternative splicing of the Gbgt1l3 gene.

RT-qPCR results of the DNase treated embryo samples for Gbgt1l3, Gbgt1l1 and Gbgt1l4 genes were compared with the β -actin and Elfa referans gene results in order to determine their relative expression profiles. According to the results obtained from this experiment, the expression of Gbgt1l3 gene increases on days 3 and 6 and reaches its maximum level on the 6th day. Genetic expression of this gene in 2, 4, 5 dpf embryos are lower than in the other days. The relative expression profile of the Gbgt1l4 gene in DNase treated embryo samples shows an increase on days 3 and 6. The relative expression profile of the Gbgt1l1 gene, another investigated gene, is low in all DNase treated 2, 3, 4, 5, 6 dpf embryo samples. According to the gel electrophoresis experiment we runned to evaluate the alternative splicing of the Gbgt1l3 gene, it was determined that all the 3 primers designed for this gene did not reveal alternative splicing, ie, did not cause different products of the same gene.

According to the results of our study, the possible ortholog of the GLT6D1 gene in zebrafish associated with aggressive periodontitis is Gbgt1l3 and the expression of this gene in embryos is significant. Thus, the first study to establish a basis for further genetic investigations such as gene knock-down and gene knock-out has been performed to confirm the association of the related gene with aggressive periodontitis.

Key Words: Aggressive periodontitis, GLT6D1 gene, Zebrafish, Orthologue gene

KAYNAKLAR

- ALBANDAR JM (2014). Aggressive periodontitis: case definition and diagnostic criteria. *Periodontology 2000*, **65**: 13–26.
- ARNOLD WH, NAUMOVA KI, NAUMOVA EA, GAENGLER P (2008). Comparative qualitative and quantitative assessment of biomineralization of tooth development in man and zebrafish (*Danio rerio*). *The Anatomical Record*, **291**: 571-576.
- AVCI ME, KESKUS AG, TARGEN S, ISILAK ME, OZTURK M, ATALAY RC, ADAMS MM, KONU O (2018).1,5,6. Development of a novel zebrafish xenograft model in ache mutants using liver cancer cell lines. *Scientific Reports*, **8**: 1570. doi:10.1038/s41598-018-19817-w.
- BACH FH, AMOS DB (1967). Hu-1: major histocompatibility locus in man. *Science*, **156**: 1506–1508.
- BRAND M, GRANATO M, NUSSLEIN-VOLHARD C (2002). Keeping and Raising Zebrafish. In: *Zebrafish: A Practical Approach*, Ed.: Nusslein-Volhard, C, Dahm, R, 1st Ed., Chapter 1, Oxford University Press, New York, p.:7-37.
- BRUNEEL B, MATHA M, PAESEN R, AMELOOT M, WENINGER WJ, HUYSSSEUNE A (2015). Imaging the zebrafish dentition: from traditional approaches to emerging technologies. *Zebrafish*, **12(1)**:1-10.
- BUSTIN SA (2000). Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol*, **25(2)**:169-193.
- CARPIO Y, ESTRADA MP (2006). Zebrafish as a Genetic Model organism Review. *Biotechnología Aplicada*, **23**: 265-270.
- CARRANZA, F.A., Newman M.G., Takei, H.H., Klokkevold, P.R. (2015). Carranza's Clinical Periodontology. 12th Ed., Elsevier Inc., Missouri, p.:100-120.
- CHAI L, SONG Y-Q, LEUNG WK (2011). Genetic polymorphism studies in periodontitis and Fcc receptors. *J Periodont Res*. doi: 10.1111/j.1600-0765.2011.01437.x.
- DAHLM R (2002). Atlas of Embryonic Stages of Development in the Zebrafish. In: *Zebrafish: A Practical Approach*, Ed.: Nusslein-Volhard, C, Dahm, R, 1st Ed., Appendix 1, Oxford University Press, New York, p.:36.
- DE BRITO RB JR, SCAREL-CAMINAGA RM, TREVILATTO PC, DE SOUZA AP, BARROS SP (2004). Polymorphisms in the vitamin D receptor gene are associated with periodontal disease. *J Periodontol*, **75**: 1090–1095.
- DE SOUZA AP, TREVILATTO PC, SCAREL-CAMINAGA RM, DE BRITO RB JR, LINE SRP (2003). MMP-1 promoter polymorphism: association with chronic periodontitis severity in a Brazilian population. *J Clin Periodontol*, **30**: 154–158.
- DELLER MC, JONES EY (2000). Cell surface receptors. *Current Opinion in Structural Biology*, **10**: 213–219.

- DOLDUR-BALLI F, OZEL MN, GULSUNER S, TEKINAY AB, OZCELİK T, KONU O, ADAMS MM (2015). Characterization of a novel zebrafish (*Danio rerio*) gene, *wdr81*, associated with cerebellar ataxia, mental retardation and dysequilibrium syndrome (CAMRQ). *BMC Neurosc.*, **16**: 96.
- DONOVAN A, BROWNLIE A, ZHOU Y, SHEPARD J, PRATT SJ, MOYNIHAN J, PAW BH, DREJER A, BARUT B, ZAPATA A, LAW TC, BRUGNARA C, LUX SE, PINKUS GS, PINKUS JL, KINGSLEY PD, PALIS J, FLEMING MD, ANDREWS NC, ZON LI (2000). Positional cloning of zebrafish ferroportin1 identifies a conserved vertebrate iron exporter. *Nature*, **403**:776–781.
- DOTTI I, BONIN S (2011). Guidelines for Molecular Analysis in Archive Tissues. Ed.: Stanta G, Springer-Verlag, Italy, s.:87-90. doi: 10.1007/978-3-642-17890-0_18.
- DUARTE PM, BASTOS MF, FERMIANO D, RABELO CC, PEREZ-CHAPARRO PJ, FIGUEIREDO LC, FAVERI M, FERES M (2015). Do subjects with aggressive and chronic periodontitis exhibit a different cytokine/ chemokine profile in the gingival crevicular fluid? *Journal of Periodontal Research*, **50**: 18–27.
- ENSEMBL GENOME BROWSER. Erişim Adresi: [<http://www.ensembl.org/index.html>]. Erişim Tarihi: 14/3/2017.
- EXPRESSION ATLAS. Erişim Adresi: [<https://www.ebi.ac.uk/gxa/experiments/E-ERAD-475>]. Erişim Tarihi: 14/5/2017.
- FIEBIG A, JEPSEN S, LOOS BG, SCHOLZ C, SCHAFER C, RUHLING A, NOTHNAGEL M, EICKHOLZ P, VAN DER VELDEN U, SCHENCK K, SCHREIBER S, GROSSNER-SCHREIBER B (2008). Polymorphisms in the interleukin-1 (IL1) gene cluster are not associated with aggressive periodontitis in a large Caucasian population. *Genomics*, **5**: 309–315.
- FINE DH (1988). Mouthrinses as adjuncts for plaque and gingivitis management. A status report for the American Journal of Dentistry. *American Journal of Dentistry*, **1**: 259–263.
- FLEMMIG TF (1999). Periodontitis. *Ann Periodontol*, **4**: 32-37. doi:10.1902/annals.1999.4.1.32.
- FRIEDRICH RW, JACOBSON GA, CIRCUIT ZP (2010). Neuroscience in Zebrafish. *Curr Biol.*, **20(8)**: R371-R381.
- GILMOUR DT, JESSEN JR, LIN S (2002). “Manipulating gene expression in the zebrafish”. In: Zebrafish: A Practical Approach, Nusslein-Volhard C, Dahm R, (eds.). Oxford: *Oxford University Press*, **121**-43.
- GOVIND P (2011). Model organisms used in molecular biology or medical research. *International Research Journal of Pharmacy*, **2(11)**: 62-65.
- GOYERT SM, FERRERO E, RETTIG WJ, YENAMANDRA AK, OBATA F, LE BEAU MM (1988). The CD14 monocyte differentiation antigen maps to a region encoding growth factors and receptors. *Science*, **239**: 497–500.

- GRASER R, O'HUIGIN C, VINCEK V, MEYER A, KLEIN J (1996). Trans-species polymorphism of class II Mhc loci in danio fishes. *Immunogenetics*, **44**: 36–48.
- GUNJI T, ONOUCHI Y, NAGASAWA T, KATAGIRI S, WATANABE H, KOBAYASHI H, ARAKAWA S, NOGUCHI K, HATA A, IZUMI Y, ISHIKAWA I. (2007). Functional polymorphisms of the FPR1 gene and aggressive periodontitis in Japanese. *Biochem Biophys Res Commun.*, **364(1)**: 7-13.
- HART PH, VITTI GF, BURGESS DR, WHITTY GA, PICCOLI DS, HAMILTON JA (1989). Potential antiinflammatory effects of interleukin 4: suppression of human monocyte tumor necrosis factor alpha, interleukin 1, and prostaglandin E2. *Proc Natl Acad Sci USA*, **86**: 3803–3807.
- HASHIM NT, LINDEN GJ, IBRAHIM ME, GISMALLA BG, LUNDY FT, HUGHES FJ, EL KARIM IA (2015). Replication of the association of GLT6D1 with aggressive periodontitis in a Sudanese population. *J Clin Periodontol*, **42**: 319–324.
- HENNIG BJW, PARKHILL JM, CHAPPLE ILC, HEASMAN PA, TAYLOR JJ (1999). Association of a vitamin D receptor gene polymorphism with localized early-onset periodontal diseases. *J Periodontol*, **70**: 1032–1038.
- HISANO Y, KOBAYASHI N, YAMAGUCHI A, NISHI T (2012a). Mouse SPNS2 functions as a sphingosine-1-phosphate transporter in vascular endothelial cells. *PLoS ONE*, **7**: e38941.
- HISANO Y, NISHI T, KAWAHARA A (2012b). The functional roles of S1P in immunity. *J Biochem* **152**: 305–311.
- HOLLA LI, BUCKOVA D, FASSMANN A, HALABALA T, VASKU A, VACHA J (2002). Promoter polymorphisms in the CD14 receptor gene and their potential association with the severity of chronic periodontitis. *J Med Genet*, **39**: 844–848.
- HOWE K, CLARK MD, TORROJA CF (2013). The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature*, **496(7446)**: 498–503.
- INAGAKI K, KRALL EA, FLEET JC, GARCIA RI (2003). Vitamin D receptor alleles, periodontal disease progression, and tooth loss in the VA dental longitudinal study. *J Periodontol*, **74**: 161–167.
- INGMAN T, TERVAHARTIALA T, DING Y, TSCHESCHE H, HAERIAN A, KINANE DF, KONTTINEN YT, SORSA T (1996). Matrix metalloproteinases and their inhibitors in gingival crevicular fluid and saliva of periodontitis patients. *J Clin Periodontol*, **12**: 1127–1132.
- ITAGAKI M, KUBOTA K, TAI H, SHIMADA Y, MOROZUMI T, YAMAZAKI K (2004). Matrix metalloproteinase-1 and -3 gene promoter polymorphisms in Japanese patients with periodontitis. *J Clin Periodontol*, **31**: 764–769.
- JACKMAN WR, DRAPER BW, STOCK DW (2004). Fgf signaling is required for zebrafish tooth development. *Dev Biol.*, **274(1)**: 139–57.
- JACKMAN WR, YOO JJ, STOCK DW (2010). Hedgehog signaling is required at multiple stages of zebrafish tooth development. *BMC Developmental Biology*, **10**: 119.

- JAMES JA, POULTON KV, HAWORTH SE, PAYNE D, MCKAY IJ, CLARKE FM, HUGHES FJ, LINDEN GJ (2007). Polymorphisms of TLR4 but not CD14 are associated with a decreased risk of aggressive periodontitis. *J Clin Periodontol*, **34**: 111–117.
- KABASHI E, BRUSTEIN E, CHAMPAGNE N, DRAPEAU P (2011). Zebrafish models for the functional genomics of neurogenetic disorders. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis*, **1812(3)**:335-345.
- KAWAHARA A, NISHI T, HISANO Y, FUKUI H, YAMAGUCHI A, MOCHIZUKI N (2009). The sphingolipid transporter spns2 functions in migration of zebrafish myocardial precursors. *Science*, **323**: 524–527.
- KINANE DF, HART TC (2003). Genes and gene polymorphisms associated with periodontal disease. *Crit Rev Oral Biol Med*, **6**: 430–449.
- KOBAYASHI T, SUGITA N, VAN DER POL WL, NUNOKAWA Y, WESTERDAAL NA, YAMAMOTO K, VAN DE WINKEL JG, YOSHIE H (2000). The Fcc receptor genotype as a risk factor for generalized early-onset periodontitis in Japanese patients. *J Periodontol*, **9**: 1425–1432.
- LAINE ML, CRIELAARD W, LOOS BG (2012). Genetic susceptibility to periodontitis. *Periodontology 2000*, **58**: 37–6.
- LAINE ML, JEPSEN S, LOO BG (2014). Progress in the Identification of Genetic Factors in Periodontitis. *Curr Oral Health Rep.*, **1**: 272–278.
- LESLIE EJ, TAUB MA, LIU H, STEINBERG KM, KOBOLD DC, ZHANG Q, CARLSON JC, HETMANSKI JB, WANG H, LARSON DE, FULTON RS, KOUSA YA, FAKHOURI WD, NAJI A, RUCZINSKI I, BEGUM F, PARKER MM, BUSCH T, STANDLEY J, RIGDON J, HECHT JT, SCOTT AF, WEHBY GL, CHRISTENSEN K, CZEIZEL AE, DELEYIANNIS FWB, SCHUTTE BC, WILSON RK, CORNELL RA, LIDRAL AC, WEINSTOCK GM, BEATY TH, MARAZITA ML, MURRAY JC (2015). Identification of Functional Variants for Cleft Lip with or without Cleft Palate in or near PAX7, FGFR2, and NOG by Targeted Sequencing of GWAS Loci. *The American Journal of Human Genetics*. **96**: 1–15.
- LIVAK K, SCHMITTGEN TD (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using RealTime Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods*. **25(4)**: 402–408.
- LOOS BG, JOHN RP, LAINE ML (2005). Identification of genetic risk factors for periodontitis and possible mechanisms of action. *J Clin Periodontol*, **6**: 159–179.
- MACHULLA HKG, STEIN J, GAUTSCH A, LANGNER J, SCHALLER H-G, REICHERT S (2002). HLA-A, B, Cw, DRB1, DRB3/4/5, DQB1 in German patients suffering from rapidly progressive periodontitis (RPP) and adult periodontitis (AP). *J Clin Periodontol*, **29**: 573–579.
- MCCURLEY AT, CALLARD GV (2008). Characterization of housekeeping genes in zebrafish: male-female differences and effects of tissue type, developmental stage and chemical treatment. *BMC Molecular Biology*, **9(102)**: 1-12.

- MONTOSI G, DONOVAN A, TOTARO A, GARUTI C, PIGNATTI E, CASSANELLI S, TRENOR CC, GASPARINI P, ANDREWS NC, PIETRANGELO A (2001). Autosomal-dominant hemochromatosis is associated with a mutation in the ferroportin (SLC11A3) gene. *J Clin Invest*, **108**: 619–623.
- NCBI BLAST GENOME DATA VIEWER. Erişim Adresi: [https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi]. Erişim Tarihi: 10/1/2018.
- NEUES F, ARNOLD WH, FISCHER J, BECKMANN F, GAENGLER P, EPPLE M (2006). The skeleton and pharyngeal teeth of zebrafish (*Danio rerio*) as a model of biomineralization in vertebrates. *Materialwissenschaft und Werkstofftechnik*, **37(6)**: 426–431.
- NIKOLOPOULOS GK, DIMOU NL, HAMODRAKAS SJ, BAGOS PG (2008). Cytokine gene polymorphisms in periodontal disease: a meta-analysis of 53 studies including 4178 cases and 4590 controls. *J Clin Periodontol*, **35**: 754–767.
- NJAJOU OT, VAESSEN N, JOOSSE M, BERGHUIS B, VAN DONGEN JW, BREUNING MH, SNIJDERS PJ, RUTTEN WP, SANDKUIJL LA, OOSTRA BA, VAN DUIJN CM, HEUTINK P (2001). A mutation in SLC11A3 is associated with autosomal dominant hemochromatosis. *Nat Genet*, **28**: 213–214.
- NOACK B, GORGENS H, HOFFMANN T, FANGHANEL J, KOCHER T, EICKHOLZ P, SCHACKERT HK (2004). Nobel mutations in the cathepsin C gene in patients with pre-pubertal aggressive periodontitis and Papillon-Lefèvre Syndrome. *J Dent Res*, **83**: 368–370.
- NUSSLEIN-VOLHARD C, DAHM R (2015). Zebrafish: A Practical Approach. Erişim Adresi: [https://books.google.com/books?id=jfm0QgAACAAJ&pgis=1.]. Erişim Tarihi: 28 Ekim 2015.
- OTA S, KAWAHARA A (2014). Zebrafish: A model vertebrate suitable for the analysis of human genetic disorders. *Congenital Anomalies*, **54**: 8–11.
- SCHAEFER AS, JOCHENS A, DOMMISCH H, GRAETZ C, JOCKEL-SCHNEIDER Y, HARKS I, STAUFENBIEL I, MEYLE J, EICKHOLZ P, FOLWACZNY M, LAINE M, NOACK B, WIJMENG C, LIEB W, BRUCKMANN C, SCHREIBER S, JEPSEN S, LOOS BG. (2014). A large candidate-gene association study suggests genetic variants at IRF5 and PRDM1 to be associated with aggressive periodontitis. *J Clin Periodontol*, **41(12)**: 1122–31.
- SCHAEFER AS, RICHTER GM, GROESSNER-SCHREIBER B, NOACK B, NOTHNAGEL M, EL MOKHTARI NE, LOOS BG, JEPSEN S, SCHREIBER S (2009). Identification of a shared genetic susceptibility locus for coronary heart disease and periodontitis. *PLoS Genet*, **5(2)**: e1000378. Erişim Adresi: [https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000378.].

- SCHAEFER AS, RICHTER GM, NOTHNAGEL M, MANKE T, DOMMISCH H, JACOBS G, ARLT A, ROSENSTIEL P, NOACK B, GROESSNER-SCHREIBER B, JEPSEN S, LOOS BG, SCHREIBER S (2010). A genome-wide association study identifies GLT6D1 as a susceptibility locus for periodontitis. *Hum Mol Genet.*, **19(3)**: 553-562.
- SHAPIRA L, EIZENBERG S, SELA MN, SOSKOLNE A, BRAUTBAR H (1994). HLA A9 and B15 are associated with the generalized form, but not the localized form, of early-onset periodontal diseases. *J Periodontol*, **65**: 219-223.
- STOCK DW (2007). Zebrafish dentition in comparative context. *J. Exp. Zool. (Mol. Dev. Evol.)*, **308B**: 523-549.
- STREISINGER G, WALKER C, DOWER N, KNAUBER D, SINGER F (1981). Production of clones of homozygous diploid zebrafish (*Brachydanio rerio*). *Nature*, **291(5813)**: 293-296.
- SUGITA N, YAMAMOTO K, KOBAYASHI T, VAN DER POL W, HORIGOME T, YOSHIE H, VAN DE WINKEL JG, HARA K (1999). Relevance of FccRIIIa-158V-F polymorphism to recurrence of adult periodontitis in Japanese patients. *Clin Exp Immunol*, **2**: 350-354.
- SUZUKI A, JI G, NUMABE Y, MURAMATSU M, GOMI K, KANAZASHI M, OGATA Y, SHIMIZU E, SHIBUKAWA Y, ITO A, ITO T, SUGAYA A, ARAI T, YAMADA S, DEGUCHI S, KAMOI K. (2004). Single nucleotide polymorphisms associated with aggressive periodontitis and severe chronic periodontitis in Japanese. *Biochem Biophys Res Commun*, **317(3)**: 887-92.
- TAKASHIBA S, NOJI S, NISHIMURA F, OHYAMA H, KURIHARA H, NOMURA Y, TANIGUCHI S, MURAYAMA Y (1994). Unique intronic variations of HLA-DQB gene in early-onset periodontitis. *J Periodontol*, **65**: 379-386.
- TONETTI MS, MOMBELLI A (1999). Early-onset periodontitis. *Ann Periodontol*, **4(1)**: 39-52.
- TURCOT-DUBOIS AL, LE MOULLAC-VAIDYE B, DESPIAU S, ROUBINET F, BOVIN N, LE PENDU J, BLANCHER A. (2007). Long-term evolution of the CAZY glycosyltransferase 6 (ABO) gene family from fishes to mammals-a birth-and-death evolution model. *Glycobiology*, **5**:516-528.
- VAITHILINGAM RD, SAFII SH, BAHARUDDIN NA, NG CC, CHEONG SC, BARTOLD PM, SCHAEFER AS, LOOS BG (2014). Moving into a new era of periodontal genetic studies: relevance of large case-control samples using severe phenotypes for genome-wide association studies. *J Periodont Res.*, **49**: 683-695.
- VAN DER HEYDEN C, HUYSEUNE A (2000). Dynamics of Tooth Formation and Replacement in the Zebrafish (*Danio rerio*) (Teleostei,Cyprinidae). *Developmental Dynamics*, **219**: 486-496.
- VAN DER VELDEN U (2017). What exactly distinguishes aggressive from chronic periodontitis: is it mainly a difference in the degree of bacterial invasiveness?. *Periodontology 2000*, **75**: 24-44.

- VENKATACHALAM AB, THISSE C , THISSE B, JONATHAN M (2009). Differential tissue-specific distribution of transcripts for the duplicated fatty acid-binding protein 10 (fabp10) genes in embryos, larvae and adult zebrafish (*Danio rerio*). *Wright FEBS Journal*, **276**: 6787–6797.
- VERSTRAETEN B, SANDERS E, VAN HENGEL J, HUYSEUNE A (2010). Zebrafish teeth as a model for repetitive epithelial morphogenesis: dynamics of E-cadherin expression. *BMC Developmental Biology*, **10**: 58.
- VERSTRAETEN B, VAN HENGEL J, SANDERS E, VAN ROY F, HUYSEUNE A (2013). N-cadherin is required for cytodifferentiation during zebrafish odontogenesis. *J Dent Res* **92**(4): 365-370.
- VIEIRA AR, ALBANDAR JM (2014). Role of genetic factors in the pathogenesis of aggressive periodontitis. *Periodontology 2000*, **65**: 92–106.
- WIDZIOLEK M, PRAJSNAR TK, TAZZYMAN S, STAFFORD GP, POTEPA J, MURDOCH C (2016). Zebrafish as a new model to study effects of periodontal pathogens on cardiovascular diseases. *Scientific Reports*, **6**: 36023.
- WISE SB, STOCK DW (2010). Bmp2b and bmp4 are dispensable for zebrafish tooth development. *Dev Dyn*, **239**(10): 2534–2546.
- YAMAZAKI K, UEKI-MARUYAMA K, ODA T, TABETA K, SHIMADA Y, TAI H, NAKAJIMA T, YOSHIE H, HERAWATI D, SEYMOUR GJ (2003). Single-nucleotide polymorphism in the CD14 promoter and periodontal disease expression in a Japanese population. *J Dent Res*, **82**: 612–616.
- YOSHIE H, KOBAYASHI T, TAI H, GALICIA JC (2007). The role of genetic polymorphisms in periodontitis. *Periodontology 2000*, **43**: 102–132.
- YOSHIHARA A, SUGITA N, YAMAMOTO K, KOBAYASHI T, MIYAZAKI H, YOSHIE H (2001). Analysis of vitamin D and Fcγ receptor polymorphisms in Japanese patients with generalized early-onset periodontitis. *J Dent Res*, **80**: 2051–2054.
- YUCEL-LINDBERG T, BÅGE T (2013). Inflammatory mediators in the pathogenesis of periodontitis. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, **15**: e7. doi:10.1017/erm.2013.8.
- ZHANG Y, ZHANG Y, ZHENG X, XU R, HE H, DUAN X (2016). Grading and quantification of dental fluorosis in zebrafish larva. *Archives of Oral Biology*, **70**: 16-2. Erişim Adresi: [<http://dx.doi.org/10.1016/j.archoralbio.2016.05.021>].
- ZHENG W, FLAVELL RA (1997). The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells. *Cell*, **89**: 587–596.

EKLER

EK 1. Etik Kurul Kararı



Bilkent Üniversitesi

Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü

BİLKENT ÜNİVERSİTESİ HAYVAN DENEYLERİ ETİK KURUL KARARI

TOPLANTI TARİH : 27.10.2016
TOPLANTI NO : 8
DOSYA NO : 32
KARAR NO : 2016/32

Ankara Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Periodontoloji Bölümü'nde görev yapan Doç.Dr. Gülden Ereş'in proje yürütücüsü olduğu "Agresif periodontitiste etkin GLT6D1 geninin zebra balığındaki ortoloğunun tanımlanması" başlıklı araştırma deney protokolü Bilkent Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nda incelenmiş, yapılan inceleme sonucunda çalışmanın Bilkent Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesi'ne göre uygun bulunarak onaylanmasına katılan üyelerin oy birliği ile karar verilmiştir.

İhsan Gürsel (Başkan)

Ergin Atalar (Üye)

Michelle Adams (Üye)

Can Akçalı (Üye)

Gamze Aykut (Üye)

Alptekin Koçak (Üye) (Katılmadı ve oy kullanmadı)

EK 2. Fotoğraf Kullanma İzni

OXFORD UNIVERSITY PRESS LICENSE TERMS AND CONDITIONS

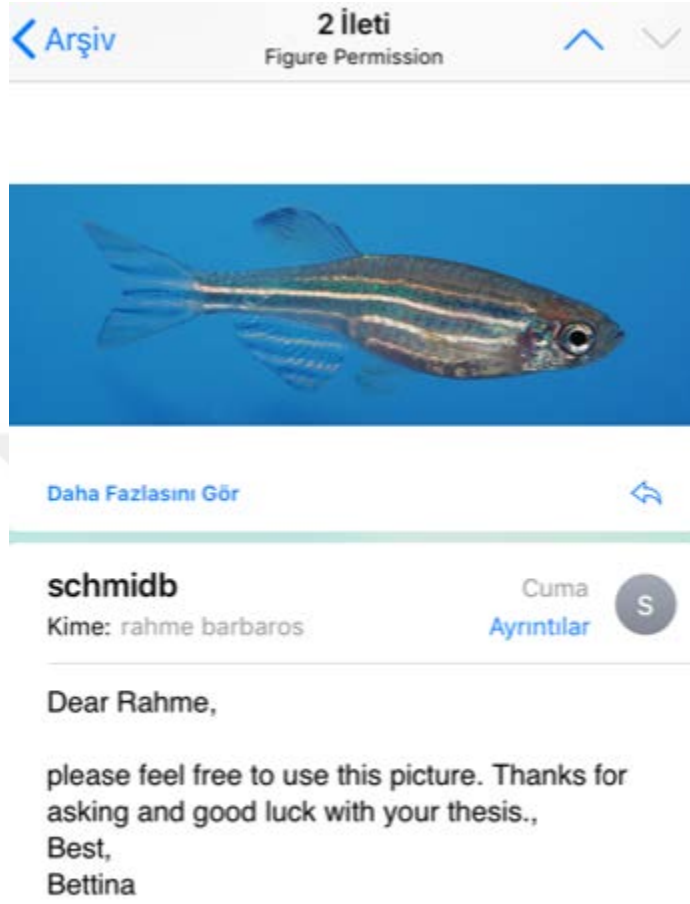
Aug 06, 2018

This Agreement between Mrs. Rahme Barbaros ("You") and Oxford University Press ("Oxford University Press") consists of your license details and the terms and conditions provided by Oxford University Press and Copyright Clearance Center.

License Number	4401050545736
License date	Aug 02, 2018
Licensed content publisher	Oxford University Press
Licensed content publication	Human Molecular Genetics
Licensed content title	A genome-wide association study identifies <i>GLT6D1</i> as a susceptibility locus for periodontitis
Licensed content author	Schaefer, Arne S, Richter, Gesa M.
Licensed content date	Nov 6, 2009
Type of Use	Thesis/Dissertation
Title of your work	Identification of Zebrafish Ortholog of Aggressive Periodontitis Associated GLT6D1 Gene
Publisher of your work	Ankara University Faculty of Dentistry, Department of Periodontology
Expected publication date	Sep 2018
Permissions cost	0.00 EUR
Value added tax	0.00 EUR
Total	0.00 EUR
Title	Identification of Zebrafish Ortholog of Aggressive Periodontitis Associated GLT6D1 Gene
Instructor name	Gulden Eres
Institution name	Ankara University Faculty of Dentistry, Department of Periodontology
Expected presentation date	Sep 2018
Portions	Figure 2 on page 558

Specific Languages	Turkish
Requestor Location	Mrs. Rahme Barbaros Bahcelievler 52. Street Cankaya/ANKARA Ankara, 06460 Turkey Attn: Mrs. Rahme Barbaros
Publisher Tax ID	GB125506730
Billing Type	Invoice
Billing Address	Mrs. Rahme Barbaros Bahcelievler 52. Street Cankaya/ANKARA Ankara, Turkey 06460 Attn: Mrs. Rahme Barbaros
Total	0.00 EUR

EK 3. Fotoğraf Kullanma İzni



ÖZGEÇMİŞ

I. Bireysel Bilgiler

Adı : Rahme
Soyadı : Barbaros
Doğum yeri ve tarihi : Köşklüçiftlik/LEFKOŞA, 14.03.1990
Uyruğu : K.K.T.C.
Medeni durumu : Bekar
İletişim adresi : Bahçelievler Mah. 52. Sok. No 47/2
Çankaya/ANKARA
E-posta : rahme_barbaros@hotmail.com
Telefon : 0 530 174 72 99

II. Eğitim Bilgileri

2015-2018 : Ankara Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi
Periodontoloji Anabilim Dalı
2008-2013 : Ankara Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi
Diş Hekimliği Lisans Eğitimi
2004-2007 : Türk Maarif Koleji
2004-2001 : Bayraktar Türk Maarif Koleji
Yabancı Dil : İngilizce

III. Ünvanlar

2013 : Diş Hekimi

IV. Mesleki Deneyim

2013-2014 : Özel Muayenehanecilik
2016-2018 : Miadent Ağız ve Diş Sağlığı Merkezi

V. Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar
Türk Diş Hekimleri Birliği

VI. Bilimsel İlgi Alanları

Uluslararası Bilimsel Toplantılarda Takdim Edilen ve Bildiri Kitabında Basılan Poster Bildirileri

BARBAROS R, BAGİS N, TERZIOGLU H (2016). Rehabilitation Of Partial Edentulous Patients With Dental Implant Application (Pieg 8. Uluslararası Oral İmplantolojide İleri Protokoller Sempozyumu, 19-22 Mayıs 2016, Antalya, Türkiye)

Ulusal Bilimsel Toplantılarda Takdim Edilen ve Bildiri Kitabında Basılan Poster Bildirileri

YILMAZ N, BEZGİN T, **BARBAROS R** (2017). Kuron-Kök Kırığının Multidisipliner Tedavisi: 2 Olgu Sunumu (Türk Pedodonti Derneği 24. Bilimsel Kongresi, 19-22 Ekim 2017, Antalya, Türkiye)

Uluslararası Dergilerde Yayınlanan Makaleler

BAGİS N, **BARBAROS R**, YİLDİZ H (2018). Application of Botulinum Toxin Injection in Symmetric and Asymmetric Gummy Smile Cases. *Int J Experiment Dent Sci*, **7(1)**:1-4.

Ulusal Dergilerde Yayınlanan Makaleler

NEMATİ ATTAR P, **BARBAROS R** (2018). İleri Endodontik-Periodontal Sorunlu Mandibular Molar Dişin Yönlendirilmiş Doku Rejenerasyon Tekniği ile Tedavisi: Vaka Raporu. Ankara Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi

Katıldığı Bilimsel Sempozyum ve Kongreler

- Europerio8 Uluslararası Periodontoloji Kongresi, 3-6 Haziran 2015, Londra, İngiltere

- Türk Periodontoloji Derneği 45. Bilimsel Kongresi, 12-14 Kasım 2015, Ankara, Türkiye
- Türk Periodontoloji Derneği 46. Bilimsel Kongresi, 5-6 Mayıs 2016, İzmir, Türkiye
- Pieg 8. Uluslararası Oral İmplantolojide İleri Protokoller Sempozyumu, 19-22 Mayıs 2016, Antalya, Türkiye
- Pieg 10. Uluslararası Oral İmplantolojide İleri Protokoller Sempozyumu, 10-13 Mayıs 2016, Antalya, Türkiye
- Europerio9 Uluslararası Periodontoloji Kongresi, 20-23 Haziran 2018, Amsterdam, Hollanda

VI. Bilimsel Etkinlikleri

Devam Etmekte Olan Projeler

Proje Adı: Agresif Periodontitiste Etkin GLT6D1 Geninin Zebrabalığındaki Ortoloğunun Tanımlanması, Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü

Proje No: 17B0234001

Proje Tipi: Bağımsız Proje

Proje Türü: Sağlık

Araştırmacılar: Doç. Dr. Gülden Ereş, Doç. Dr. Özlen Konu, Dt. Rahme Barbaros, Dt. Canan Boz, Arş. Gör. Ayşe Gökçe Keşküş, Arş. Gör. Tuğberk Kaya, Arş. Gör. Ayça Dilara Yılmaz

Proje Başlangıç – Bitiş Tarihleri: 03.04.2017 - 03.04.2020